



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARIANE DA SILVA LISTON

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO E APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Origanum vulgare L. COMO AGENTE ANTIMICROBIANO EM SURURU
(*Mytella falcata*).**

São Luís
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARIANE DA SILVA LISTON

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO E APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Origanum vulgare L. COMO AGENTE ANTIMICROBIANO EM SURURU
(*Mytella falcata*).**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Maranhão para
obtenção do título de Mestre em Química.

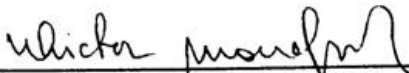
Orientador: Prof. Dr. Victor Elias
Mouchrek Filho

São Luís
2013

Título: "ESTUDO E APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ORIGANUM VULGARE LINNAEUS* COMO AGENTE ANTIMICROBIANO EM SURURU"

MARIANE DA SILVA LISTON
Aprovado em 29 de novembro de 2013

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr Victor Elias Moucherek Filho (Orientador UFMA)



Prof. Dr. Odair dos Santos Monteiro (UFMA)



Prof. Dr. Adenilde Ribeiro Nascimento (UFMA)

DEDICO ESTE TRABALHO

*À minha mãe, **Maria José da Silva Liston**, por estar sempre presente em minha vida, com seus preciosos conselhos e carinho, superando qualquer distância física.*

*Ao meu pai, **Darci Luis Liston**, pelo amor, oportunidades e educação que me proporcionou.*

*Ao meu esposo **Leandro Cabral da Silva**, pelo amor, confiança, apoio, incentivo e pelo grande exemplo de determinação que me representa.*

*Aos meus amados filhos, **Felipe e Cássia**, que são a alegria, a luz e o sentido de minha vida.*

*À minha irmã, **Josiane da Silva Liston**, pela amizade e a alegria compartilhada.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho, pela orientação deste trabalho, apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Odair dos Santos Monteiro, pelos preciosos ensinamentos, ajuda e amizade.

À Prof^a. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento, pela orientação na elaboração deste trabalho.

Aos colegas de Mestrado, especialmente os amigos Ildenice Monteiro, Gilson Vitorino e Marcos Moura, pelas discussões, pela ajuda, amizade e compartilhamento de informações.

À Jéssica Verônica Feitoza pela colaboração e amizade.

À equipe dos laboratórios do Pavilhão Tecnológico, em especial Amanda, Prof^a. Paula e Vanessa pelo apoio e ajuda prestada.

A todos que de alguma forma me ajudaram, meus sinceros agradecimentos.

**“Não deseje que as coisas sejam mais
fáceis – deseje ser mais forte.”**

(Jim Rohn)

RESUMO

Óleos essenciais (OEs) são extratos naturais de plantas, sendo muitos deles ativos como antimicrobianos. O óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) (OEO) possui um promissor campo de aplicação como conservante de alimentos. Diversos estudos *in vitro* e de aplicação têm sido feitos para avaliar a atividade de OEs como antimicrobianos em alimentos, no entanto não são encontrados na literatura dados de pesquisas de aplicação em mariscos. Neste estudo avaliamos a composição química do OEO e seu efeito antibacteriano em mariscos *in natura* refrigerados da espécie *Mytella falcata*, conhecidos como sururu. Os constituintes químicos do OE estudado foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e para a atividade realizamos as análises de contagem de *Escherichia coli* e bactérias mesófilas totais, teor de bases voláteis totais e pH do sururu. A adição de OEO a 1,4% resultou na completa inibição da *E. coli* inoculada, diminuição do crescimento de bactérias mesófilas totais e tornou o processo de deterioração mais lento. A atividade do OEO é atribuída principalmente ao seu componente majoritário, o carvacrol, que possui atividade antibacteriana. Os resultados obtidos indicam que o OEO pode ser aplicado no auxílio da extensão do prazo de validade e segurança de sururus *in natura*.

Palavras-chave: Óleos essenciais. Orégano (*Origanum vulgare* L.). Sururu (*Mytella falcata*). *Escherichia coli*. Conservação de alimentos.

ABSTRACT

Essential oils (OEs) are natural plant extracts and many of them are active as antimicrobials. *Origanum vulgare* L. (oregano) essential oil (OEO) has a promising application field as a food preservative. Several *in vitro* and application studies has been carried to evaluate the activity of OEs as antimicrobials in foods, but are not found in the literature survey data application in mussels. In this study we evaluated the chemical composition and the antibacterial effect of OEO in fresh chilled mussels from *Mytella falcata* species. The chemical constituents of the studied OE were identified by gas chromatography-mass spectrometry and for activity we analyzed the count of *Escherichia coli* and aerobic mesophilic bacteria, total volatile bases and pH. The addition of OEO at 1.4% resulted in complete inhibition of *E. coli* inoculated, reduced growth aerobic plate count bacteria and inhibit the process of deterioration. The activity of the OEO is attributed mainly to its major component, carvacrol, which has recognized antibacterial activity. The results indicate that the OEO can be applied to support of the extension of shelf life and safety of fresh mussels.

Keyword: Essential oil. Oregano (*Origanum vulgare* L.). Mussel (*Mytella falcata*). *Escherichia coli*. Food preservation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Sururu, <i>Mytella falcata</i> d’Orbiginy 1842, sem a casca	24
Figura 2 – Extrator de Clevenger	31
Figura 3 - Pacote de orégano orgânico desidratado.....	33
Figura 4 – Cinética de extração do óleo essencial de orégano	43
Figura 5 – Óleo essencial de orégano puro e óleo essencial de orégano solubilizado em etanol 90%	44
Figura 6 – Cromatograma do óleo essencial de orégano.....	45
Figura 7 – Espectros de massas da (A) proposta de identificação através das espectrotescas NIST e WILEY e de (B) composto do pico 5, com TR=6,498; (C) fórmula estrutural do 1-octen-3-ol.	49
Figura 8 – Espectros de massas da (A) proposta de identificação através da espectroteca NIST e WILEY e do (B) composto do pico 8, com TR=7,836; (C) fórmula estrutural do <i>m</i> -cimeno.	50
Figura 9 – Espectros de massas da (A) proposta de identificação através da espectroteca NIST e WILEY e do (B) composto do pico 16, com TR=16,894; (C) fórmula estrutural do carvacrol.	51
Figura 10 – Gráfico do desenvolvimento da <i>E. coli</i> inoculada em sururus submetidos a diferentes tratamentos.....	53
Figura 11 – Gráfico do desenvolvimento das bactérias mesófilas totais em sururus in natura submetidos a diferentes tratamentos.....	55
Figura 12 – Gráfico do pH de sururus in natura submetidos a diferentes tratamentos .	57
Figura 13 – Gráfico do teor de BVT em sururus in natura submetidos a diferentes tratamentos	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos tratamentos aplicados aos sururus.....	36
Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do óleo essencial de orégano e comparação com dados de referência.	44
Tabela 3 – Compostos identificados na amostra de óleo essencial de orégano.....	46
Tabela 4 – Função química dos compostos presentes no óleo essencial de orégano. ...	47
Tabela 5 – Estabilidade da solução de óleo essencial de orégano preparada com os tensoativos Tween 20 e Tween 80 em diferentes concentrações.	52
Tabela 6 - Desenvolvimento da <i>E. coli</i> inoculada em sururus submetidos a diferentes tratamentos	53
Tabela 7 - Desenvolvimento das bactérias mesófilas totais em sururus <i>in natura</i> submetidos a diferentes tratamentos.....	55
Tabela 8 – Gráfico do pH de sururus <i>in natura</i> submetidos a diferentes tratamentos. .	56
Tabela 9 - Teor de BVT em sururus <i>in natura</i> submetidos a diferentes tratamentos....	57
Tabela 10 – Composição química do sururu fresco em porcentagem	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%A	Porcentagem da Área Normalizada
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
BPX5%	5% Fenil Polisilfenileno-Siloxano
BVT	Bases Voláteis Totais
CG	Cromatografia Gasosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DP	Desvio Padrão
EM	Espectrometria de Massas
EMB	Eosina Azul de Metileno
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IC	Intervalo de Confiança
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
IR	Índice de Retenção
M	Massa Molecular
m/z	Relação Massa/Carga
MSD	Detector Seletivo de Massa
NIST	National Institute of Standards and Technology
OE	Óleo Essencial
OEO	Óleo Essencial de Orégano
p	Valor-p
PA	Para Análise
PCA	Plate Count Agar
pH	Potencial Hidrogeniônico
TR	Tempo de Retenção
TSA	Ágar Triptona de Soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia

UFMA	Universidade Federal do Maranhão
USP	Universidade de São Paulo
v/v	Volume/Volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Aspectos gerais sobre a espécie <i>Origanum vulgare</i> Linnaeus	19
3.2 Óleos essenciais	20
3.2.1 Definições e características	20
3.2.2 Aplicações dos óleos essenciais	23
3.3 Pescados e o Sururu (<i>Mytella falcata</i> d'Orbiginy 1842).....	24
3.4 Qualidade microbiológica de pescados	25
3.4.1 <i>Escherichia coli</i>	26
3.5 Qualidade físico-química de pescados <i>in natura</i>	27
3.6 Congelamento	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Material.....	30
4.1.1 Equipamentos e acessórios.....	30
4.1.2 Reagentes e meios de cultura	32
4.2 Metodologia	33
4.2.1 Obtenção do óleo essencial de orégano	33
4.2.2 Caracterização física do óleo essencial	34
4.2.3 Caracterização química e quantificação dos componentes.....	35
4.2.4 Avaliação da eficácia do óleo essencial de orégano quando aplicado como um conservante em sururu	36
4.2.4.1 Preparo das soluções de óleo essencial.....	36

4.2.4.2	Obtenção das amostras de sururu.....	37
4.2.4.3	Determinação da atividade do OE frente à <i>Escherichia coli</i> em sururu	38
4.2.4.3.1	Tratamento da cepa e preparo do inóculo de <i>E. coli</i>	38
4.2.4.3.2	Preparo das amostras de sururu	38
4.2.4.3.3	Contagem das células de <i>Escherichia coli</i>	39
4.2.4.4	Determinação da atividade do OE frente a bactérias mesófilas totais de sururu <i>in natura</i> e estabilidade físico-química	39
4.2.4.4.1	Preparo das amostras de sururu	39
4.2.4.4.2	Contagem das células de bactérias mesófilas totais.....	40
4.2.4.4.3	pH.....	40
4.2.4.4.4	Bases voláteis totais.....	40
4.2.5	Determinação da composição química do sururu	40
4.2.5.1	Umidade – Secagem direta em estufa a 105°C.....	41
4.2.5.2	Cinzas – Resíduo por Incineração	41
4.2.5.3	Lipídios – Extração direta em Soxhlet	41
4.2.5.4	Proteína – método micro-Kjeldahl	42
4.2.5.5	Determinação do teor de carboidrato.....	42
4.2.6	Análise estatística.....	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Rendimento e características físicas do óleo essencial.....	43
5.2	Caracterização química do óleo essencial de orégano	44
5.3	Eficácia do óleo essencial de orégano quando aplicado como um conservante em sururu	52
5.3.1	Preparo das soluções de óleo essencial (teste de solubilização).....	52
5.3.2	Atividade do OE frente à <i>Escherichia coli</i> em sururu.....	52
5.3.3	Atividade do OE frente à bactérias mesófilas totais de sururu <i>in natura</i> e estabilidade físico-química.....	54

5.4	Composição química do sururu	60
6.	CONCLUSÕES	62
7.	REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

Extratos naturais de plantas condimentares, como os óleos essenciais (OEs), são usados em alimentos e bebidas como aromatizantes, porém estudos mais recentes vêm sugerindo seu uso em alimentos atuando também como agentes antimicrobianos (BURT, 2004). OEs são ativos contra bactérias gram negativas e gram positivas em uma ampla faixa de pH e concentrações de cloreto de sódio. Seu mecanismo de ação não é específico devido ao grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos OEs (BURT, 2007). Muitos OEs obtidos de plantas têm mostrado potencial para esse propósito em experimentos *in vitro* (WOJDYLO; OSZMIANSKI; CZEMERYYS, 2007; PEREIRA, 2006; KLOUCEK *et al.*, 2012; RODRIGUES, 2002). Já existem também muitos estudos de aplicação sobre a eficácia de OEs como antimicrobianos em alimentos como carnes frescas, produtos cárneos, aves e alguns vegetais (BURT, 2004; NYCHAS; SKANDAMIS, 2000; KOUTSOUMANIS *et al.*, 1999; TSIGARIDA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2012), entretanto há pouca informação sobre a aplicação em frutos do mar, como os mariscos.

Origanum vulgare Linnaeus (orégano), uma planta da família das Lamiaceae, é um condimento muito conhecido internacionalmente, usado como aromatizante de muitos pratos além de possuir várias aplicações medicinais (LORENZI; MATOS, 2008). Com base em diversas pesquisas, essa planta apresenta-se como um dos condimentos mais ativos já testados. O óleo essencial de orégano (OEO) contém compostos fenólicos, sendo o timol e seu isômero, o carvacrol, comumente encontrados como compostos majoritários (TOMA; BARICEVIC, 2002). OEO, bem como o timol e o carvacrol, rompem a membrana celular das bactérias, causando sua permeabilização (LAMBERT *et al.*, 2001).

Pescados e frutos do mar são alimentos altamente perecíveis. Moluscos bivalves são organismos filtrantes o que os leva a concentrar micro-organismos da água em que vivem. A preferência do consumidor por produtos minimamente processados tem provocado a queda do consumo de pescados enlatados e curados. Portanto o uso de embalagens de atmosfera modificada e o uso de conservantes em pequenas quantidades têm aumentado (GRAM, 2010).

Isoladamente, nenhum método instrumental é capaz de determinar o estado de deterioração do pescado. Por isso, são aplicados em conjunto métodos microbiológicos, químicos e sensoriais para esse propósito. O crescimento de bactérias deteriorantes específicas está bem correlacionado com a produção dos metabólitos responsáveis pelo aroma desagradável e a rejeição sensorial de pescados deteriorados. Porém a contagem de bactérias mesófilas totais ainda tem sido requerida obrigatoriamente pelas normas que tratam sobre a qualidade de pescados, já que a atividade microbiana de forma geral é normalmente responsável pela deterioração do pescado *in natura* (DALGAARD, 2000). Alterações químicas em pescados durante a estocagem podem ser indicadores úteis de qualidade ou deterioração. A deterioração bacteriana e enzimática resulta na formação de bases voláteis, particularmente trimetilamina, dimetilamina e amônia. A quantidade de bases voláteis totais (BVT) presente em pescados são comumente usadas como indicador de deterioração (IAL, 2008). O pH também é um indicador significativo de deterioração, especialmente no caso de mariscos, pois devido ao seu teor relativamente alto de glicogênio, sua deterioração é basicamente fermentativa o que provoca redução do pH (JAY, 2005).

A bactéria *E. coli*, uma patógena de origem alimentar, é um bacilo gram negativo, tipicamente coloniza o trato gastrointestinal humano (JAY, 2005). Diversas cepas de *E. coli* extremamente adaptadas adquiriram fatores de virulência e podem causar vários tipos de doenças, como diarreias e infecções extraintestinais (KAPER, 2004). Essa bactéria pode ser transmitida através de água ou alimentos contaminados. Todos os anos diversos surtos provocados por alimentos contaminados por *E. coli* são relatados. Frutos do mar são absolutamente susceptíveis à contaminação por essa bactéria quando capturados em águas contaminadas ou quando processados inapropriadamente (NASCIMENTO, 2004).

O congelamento é um antigo método de conservação de alimentos. Ele reduz a atividade de micro-organismos deteriorantes em alimentos além de poder eliminá-los parcialmente, resultando em uma significativa extensão do prazo de validade de pescados (ARCHER, 2004; GRAM; DALGAARD, 2002). Entretanto algumas bactérias são extremamente resistentes ao efeito do congelamento e podem sobreviver muito bem, dependendo de sua natureza e do tipo da matriz alimentícia (ARCHER, 2004).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a composição química e algumas propriedades físico-químicas do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) e estudar o efeito antimicrobiano do mesmo em sururus (*Mytella falcata*) *in natura* mantidos sob refrigeração, através de parâmetros microbiológicos e físico-químicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a composição química e algumas propriedades físico-químicas do óleo essencial das folhas de *Origanum vulgare* (orégano) e estudar o efeito antimicrobiano do mesmo em sururus (*Mytella falcata*) *in natura* mantidos sob refrigeração, através de parâmetros microbiológicos e físico-químicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar extração do óleo essencial das folhas de orégano por hidrodestilação utilizando o aparato de Clevenger.
- Determinar o rendimento e parâmetros físico-químicos do óleo essencial obtido.
- Caracterizar quimicamente e quantificar os componentes do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.
- Estabelecer as melhores condições de aplicação do óleo essencial em função de sua solubilização/ emulsificação do em solução aquosa.
- Analisar e comparar a atividade antibacteriana do óleo essencial de orégano frente à *Escherichia coli* em sururu durante estocagem sob refrigeração.
- Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de orégano frente à biota autóctone de micro-organismos de sururu em estocagem sob refrigeração utilizando os parâmetros: contagem total de bactérias mesófilas, pH e bases voláteis totais.
- Comparar atividade do óleo essencial de orégano com um método de conservação tradicional, o congelamento.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais sobre a espécie *Origanum vulgare* Linnaeus

Origanum vulgare Linnaeus, conhecido como orégano, é uma planta herbácea, perene, aromática, de 30-50 cm de altura e pertencente à Família das Lamiaceae. Suas folhas medem de 1-2 cm, suas flores são de esbranquiçadas a violáceas (LORENZI; MATOS, 2008). O gênero *Origanum* possui diversas espécies, sendo a maioria delas originárias da região do Mediterrâneo (RODRIGUES, 2002) e atualmente cultivadas na Europa, Ásia e América (SOUZA, 2006). No Brasil o orégano é cultivado nas regiões Sul e Sudeste.

Suas folhas e flores são usadas como condimento, na maioria das vezes na forma desidratada. O orégano possui um odor agradável, herbáceo, intenso, de sabor quente e queimado. Para fins aromáticos, utilizam-se as folhas picadas em pedaços bem pequenos (RODRIGUES, 2002). Na composição química de suas folhas há até 1% de óleo essencial, o qual é usado na composição de aromatizantes de alimentos e perfumes (LORENZI; MATOS, 2008). Com base em diversas pesquisas, essa planta apresenta-se como um dos condimentos mais ativos já testados. O OEO contém compostos fenólicos, sendo o timol e seu isômero, o carvacrol, comumente encontrados como compostos majoritários (TOMA; BARICEVIC, 2002). Souza (2006) relata o carvacrol (68,06%) como o componente majoritário do óleo essencial de orégano, seguido de *p*-cimeno (15,91%), α -pineno (2,56%) e mirceno (1,87%). OEO, bem como o timol e o carvacrol, rompem a membrana celular das bactérias, causando sua permeabilização (LAMBERT *et al.*, 2001).

O orégano tem sido usado na medicina e na culinária por centenas de anos. A literatura atribui a essa planta propriedades digestivas, analgésicas, espasmolíticas, bem como de expectorante brando (CHEVALLIER, 1996).

Diversos estudos têm abordado a atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante do óleo essencial de orégano (WOJDYLO, 2007; PEREIRA, 2006; KLOUCEK, 2012; RODRIGUES, 2002; SOUZA, 2006) e sua aplicação em alimentos tem se mostrado promissora (BURT, 2007; NYCHAS, 2000; KOUTSOUMANIS *et al.*, 1999; TSIGARIDA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2012).

3.2 Óleos essenciais

3.2.1 Definições e características

Óleos essenciais (OEs) são produzidos no metabolismo secundário das plantas, são constituídos de misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES *et al.*, 1999). São assim chamados devido a sua aparência oleosa, no entanto sua estrutura química difere da estrutura de óleos vegetais ou minerais. Williams (1996) classificou os óleos em relação a suas composições químicas, definindo OEs como mistura de terpenos e compostos oxigenados, acompanhados de alguns outros compostos orgânicos. Enquanto que a classe dos óleos vegetais fixos compreende ésteres de glicerol e ácidos graxos de cadeia longa e a dos óleos minerais, misturas de hidrocarbonetos de alto peso molecular. Segundo Simões *et al.* (1999) outras importantes características dos OEs são a solubilidade em solventes orgânicos apolares, solubilidade limitada em água, sabor ácido e picante, coloração geralmente amarelada, baixa estabilidade e possuir atividade óptica.

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é um composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços) (SIMÕES *et al.*, 1999).

Segundo a definição da ANVISA (BRASIL, 2007) os OEs são obtidos por processos físicos e podem se apresentar isoladamente ou misturados, retificados (submetidos à destilação fracionada), desterpenados ou concentrados (parcialmente desterpenados). Diversos métodos de extração são aplicados na obtenção de OEs, sendo os mais comuns, a prensagem e a destilação. O processo de expressão ou prensagem é aplicado ao pericarpo de frutos cítricos, sendo esse um processo mecânico. Nos processos de destilação, hidrodestilação (direto) ou arraste a vapor (indireto), a planta fica em contato com água em ebulição ou vapor atravessa a camada plantas sobre superfície perfurada, respectivamente. Em ambos os casos o OE vaporizado é arrastado pelo vapor de água e é condensado em seguida (WILLIAMS, 1996). Em pequena escala é muito utilizado o aparelho Clevenger para o processo de hidrodestilação, classificado como um método de destilação direto. Mais recentemente, métodos alternativos

utilizando dióxido de carbono supercrítico ou água subcrítica vêm sendo estudados e utilizados. Apesar do requerimento de equipamentos mais sofisticados, esses também são métodos limpos, por não usarem solventes, e apresentam vantagens em termos de rendimento, tempo de extração e provocarem menos alterações na composição do óleo essencial (GÁMIZ-GRACIA; CASTRO, 2000; KHAJEH *et al.*, 2004; EIKANI *et al.*, 2007).

A composição dos OEs é determinada pela genética da planta, porém condições ambientais e de cultivo são capazes de causar variações significativas. Estudos vêm mostrando a variação da composição de óleos em função da estação do ano (ANWAR, 2008), de condições de ambientais como altitude e disponibilidade de água (RUSSO *et al.*, 2013) e estágio fenológico da planta (JORDÁN *et al.*, 2013), por exemplo. O processo de obtenção também pode influir nesta composição, pois na destilação, a água, a acidez e a temperatura podem provocar hidrólise de ésteres, rearranjos, isomerização, racemização e oxidações (SIMÕES *et al.*, 1999). Castro e Gámiz-Gracia (2000) avaliou e comparou a composição química do óleo essencial de erva-doce, resultantes de extrações por hidrodestilação, água subcrítica e solvente, e encontrou diferentes teores de cada componente identificado dependendo do método de extração.

OEs podem apresentar problemas de qualidade devido à falsificação ou adulteração ou em função de sua matéria-prima. Simões *et al.* (1999) afirma que além da variabilidade ocorrente em função das condições de cultivo da planta, são comuns erros de identificação da mesma, não sendo raras confusões. No caso do orégano, além da espécie *Origanum vulgare* L. oriunda da Grécia, há outras espécies também chamadas vulgarmente de orégano, como *Corydanthus capitatus*, da Espanha e o *Origanum onites* L. da Turquia (SIMÕES *et al.*, 1999).

Para se avaliar a qualidade de óleos essenciais, os mesmos podem ser submetidos a análises de solubilidade em etanol, índice de refração, poder rotatório, densidade, determinação dos índices de acidez, de ésteres, de carbonilas além de análises cromatográficas (SIMÕES *et al.*, 1999). Nessa última classe de análises destaca-se a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas:

- **Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)**

O método da cromatografia gasosa (CG) é usado para separar os compostos do óleo essencial e através da espectrometria de massas (EM) realiza-se a identificação desses compostos (MARRIOTT, 2001).

Marriott (2001) evidenciou os motivos pelos quais a CG é o método mais utilizado para a separação dos componentes dos óleos essenciais. O CG opera na faixa de massa molecular de dois (hidrogênio molecular) a 1500 unidades de massa. Dentro dessa faixa os compostos elegíveis a serem cromatografados são classificados como gases permanentes (muito voláteis), compostos voláteis (massa molecular acima de 200) e os semi-voláteis (aqueles com massas molares maiores). Os compostos constituintes dos OEs variam de voláteis a semi-voláteis. Os terpenóides situam-se em uma faixa de massa molar particularmente adequada à análise por CG. Além disso, esses compostos também são considerados estáveis à passagem pelo injetor aquecido e pela coluna cromatográfica.

Os OEs são constituídos de um grande número de compostos diferentes, os quais possuem índices de retenção muitas vezes semelhantes, por isso são esperadas algumas sobreposições no cromatograma. Para solucionar possíveis sobreposições, buscam-se tecnologias que melhorem a separação, aumentando o espaço entre os compostos. Por isso colunas capilares e quírais substituíram as colunas empacotadas em CG para OEs. (MARRIOTT, 2001). Simões *et al.* (1999) relata que a análise de um óleo de menta realizada em 1967 com uma coluna empacotada apresentou 12 picos separados, enquanto que análises realizadas com coluna capilar apresentam, tipicamente, acima de 100 picos separados.

Na espectrometria de massas um composto é ionizado, os íons são separados na base da razão massa/carga e o número de íons que correspondem a cada unidade de massa/carga é registrado na forma de um espectro. Na técnica de impacto de elétrons, o espectrômetro de massas bombardeia com um feixe de elétrons de alta energia as moléculas que estão na fase vapor e registra o espectro dos íons positivos, depois de separados na base da razão massa/carga (SILVERSTEIN, 2007). O EM geralmente indica a massa molecular e padrão de fragmentação do composto. A massa molecular indica a classe da substância. E o padrão de fragmentação pode ser comparado a uma

biblioteca de espectros de massa. Assim o computador propõe, com determinado grau de probabilidade a identidade da substância. E para dar mais segurança a essa identificação, deve levar-se em consideração também os dados de retenção (SIMÕES *et al.*, 1999).

Os espectrômetros de massas são muito úteis na identificação de compostos orgânicos de espectro de massas conhecido ou não. Para compostos conhecidos, uma busca computadorizada, compara o espectro de massas do composto com uma biblioteca. No caso de compostos desconhecidos, as informações sobre o íon molecular, a sequência de fragmentação e evidências de outros tipos de espectrometria, podem levar a identificação de novos compostos (SILVERSTEIN, 2007).

3.2.2 Aplicações dos óleos essenciais

Os OEs presentes em várias plantas estão relacionados a funções necessárias a sobrevivência do vegetal, exercendo atividade contra micro-organismos e predadores, e na atração de insetos e outros agentes fecundadores. Na prática médica popular os óleos essenciais possuem larga tradição de uso (RAMOS *et al.*, 2000). Os OEs são muito explorados pela indústria de cosméticos e perfumes. Sua aplicação terapêutica se iniciou em função de suas propriedades aromáticas. As pesquisas sobre suas propriedades farmacológicas e sua atividade como conservante alimentício vem apresentando resultados promissores.

Apesar de haver muitos compostos químicos descritos como potenciais conservantes de alimentos, apenas uma parte deles é permitida em função de serem seguros ao consumo humano e de serem de fato ativos quando aplicados aos alimentos (JAY, 2005). Alguns condimentos possuem atividade antimicrobiana. Segundo Jay (2005), isso se deve a presença de compostos químicos específicos os quais estão normalmente presentes nos OEs desses condimentos.

As concentrações mínimas necessárias para atingir o efeito antimicrobiano desejado, relatadas na literatura, apresentam grandes variações, as quais são atribuídas à variação da composição dos OEs e aos diferentes métodos de se realizar a avaliação. Porém apesar das dificuldades de se comparar os resultados, a atividade de diversos

OEs é incontestável. No entanto os mesmos são menos efetivos em alimentos do que em meios de cultura (JAY, 2005). Por essa razão testes de aplicações são necessários para esclarecer se a utilização de óleos essenciais como conservantes é realmente viável.

Devido ao seu alto potencial antimicrobiano, o óleo essencial de orégano tem sido considerado uma alternativa promissora de conservante natural para uso em alimentos. O estudo de Nychas e Skandamis (2000) demonstrou que óleo essencial de orégano foi capaz de inativar *E. coli* e ao mesmo tempo ser aceitável organolepticamente, quando aplicado em salada de berinjela, na concentração de 0,7%.

3.3 Pescados e o Sururu (*Mytella falcata* d'Orbiginy 1842)

A literatura de microbiologia, físico-química e processamento de alimentos utiliza o termo Pescados ou Frutos do Mar para designar peixes, crustáceos e moluscos comestíveis de água doce ou salgada, morna ou fria. No presente trabalho será utilizado o termo Pescados para designar o tipo de alimento em que o sururu se classifica.

Figura 1 – Sururu, *Mytella falcata* d'Orbiginy 1842, sem a casca.



Fonte: AUTOR, 2013

Mytella falcata d'Orbiginy 1842, conhecido como sururu, é um molusco bivalve, comestível, possui concha de aproximadamente oito centímetros, sendo encontrado com frequência no Nordeste brasileiro. Na costa do estado do Maranhão tem uma ocorrência

significativa e as espécies principais são o “sururu-de-pasta” (*Mytella falcata* d’Orbigny) e o “sururu-de-dedo” (*Mytella guyanensis*) (NASCIMENTO, 2004).

Conforme apresentado na Figura 1, a parte comestível, no interior da casca, apresenta coloração de amarela à marrom, tamanho de aproximadamente um centímetro e textura rígida.

Os moluscos (ostras, mexilhões, mariscos, lulas e vieiras) diferem da composição química dos peixes por apresentarem um teor significativo de carboidratos, na forma de glicogênio, em sua composição (JAY, 2005).

Furlan *et al.* (2007) encontrou teores de até 7,22% e 10,73% de carboidratos e proteínas, respectivamente, em mariscos da espécie *Perna perna* cultivados em Ubatuba - SP. Já Lemos *et al.* (1989) encontrou teor de proteína de até 20,80% e não relatou o teor de carboidratos, em sururus (*Mytella falcata*) capturados em São José de Ribamar - MA. Watt e Merrill (1950 apud Jay, 2005, p. 123) relata que a carne de marisco tem aproximadamente 12,8% de proteínas e 3,4% de carboidratos. Assim observa-se que os sururus apresentam teor de proteínas superior a demais espécies também classificadas como mariscos.

3.4 Qualidade microbiológica de pescados

A biota de pescados em geral reflete a água onde esses animais vivem. Além da água do local de origem, os micro-organismos são adquiridos da água de lavagem, durante a manipulação e processamento desses alimentos (JAY, 2005). Pescados são alimentos altamente perecíveis. Moluscos bivalves são organismos filtrantes o que os leva a concentrar micro-organismos do meio aquático. O processo de depuração é usado para reduzir a carga de contaminantes, mas sua eficácia é questionável em relação à redução de bactérias (MURCHIE *et al.*, 2005). A preferência do consumidor por produtos minimamente processados tem provocado a queda do consumo de pescados enlatados e curados. Portanto o uso de embalagens de atmosfera modificada e o uso de conservantes em pequenas quantidades têm aumentado (GRAM, 2010).

Nascimento (2004) isolou *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Staphylococcus* de sururu (*Mytella falcata*) e afirmou que moluscos

bivalves podem representar um grave risco para a saúde pública, principalmente quando capturados em águas poluídas e conservados de forma inadequada.

Segundo Jay (2005) a deterioração de moluscos é principalmente fermentativa devido ao teor de carboidratos alto em relação a outros pescados. Por essa razão o decaimento do pH caracteriza a deterioração desses moluscos.

3.4.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é a espécie de micro-organismos predominante da flora intestinal de animais de sangue quente. Pertence à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo gram-negativo, não esporulado e capaz de fermentar glicose com produção de ácido e gás (FRANCO, 2008). A *Escherichia coli* é reconhecida como um patógeno de origem alimentar desde 1971 (JAY, 2005). Este bacilo gram negativo, tipicamente coloniza o trato gastrointestinal humano e raramente causa doenças em condições normais. Entretanto, há diversas cepas de *E. coli* extremamente adaptadas que adquiriram fatores de virulência e podem causar vários tipos de doenças (KAPER, 2004). Oito grupos de *Escherichia coli* são bem conhecidos e estudados com base no seu mecanismo de ação e manifestações clínicas. Esses grupos são classificados como diarreio gênica *E. coli* ou extraintestinal *E. coli*. Outros grupos têm sido identificados, porém seu mecanismo de patogenicidade ainda não são bem conhecidos (CROXEN; FINLAY, 2010).

Segundo ICMSF (1999) a determinação de *Escherichia coli* constitui um critério melhor do que a determinação de coliformes fecais para indicar o risco potencial de contaminação de pescados e moluscos. Franco (2008) afirma que é importante avaliar o significado da presença de *Escherichia coli* em um alimento sob dois aspectos: primeiro por indicar que o alimento teve contaminação fecal e, portanto está em condições higiênicas insatisfatórias; segundo por que diversas linhagens de *Escherichia coli* são comprovadamente patogênicas para o homem e para os animais.

Os sorotipos de *Escherichia coli* relacionados com enfermidades diarreicas no homem ou surtos de intoxicações alimentares são denominados *Escherichia coli* enteropatogênicas. Para provocar essas enfermidades, são necessárias altas doses desses

micro-organismos. Para que haja uma multiplicação abundante, os alimentos devem estar contaminados massivamente ou devem ter sido conservados de forma inadequada. A temperatura ótima de crescimento desses micro-organismos é de 37°C, podendo crescer no intervalo de 10 a 40°C. Seu pH ótimo de crescimento é de 7,0 a 7,5, sendo o pH mínimo de crescimento de 4,0 e o máximo de 8,5. A *Escherichia coli* é relativamente termossensível e pode ser destruída com facilidade em temperaturas de pasteurização ou cocção adequada (FRAZIER, 1993).

3.5 Qualidade físico-química de pescados *in natura*

Pescado fresco ou *in natura* é aquele que sofreu apenas o resfriamento como método de conservação e que preserva suas características sensoriais inalteradas. Isoladamente, nenhum método instrumental é capaz de determinar o estado de deterioração do pescado. Por isso, são aplicados em conjunto métodos microbiológicos, químicos e sensoriais para esse propósito. O crescimento de bactérias deteriorantes específicas está bem correlacionado com a produção dos metabólitos responsáveis pelo aroma desagradável e a rejeição sensorial de pescados deteriorados. Porém a contagem de bactérias mesófilas totais ainda tem sido requerida obrigatoriamente pelas normas que tratam sobre a qualidade de pescados, já que a atividade microbiana de forma geral é normalmente responsável pela deterioração do pescado *in natura* (DALGAARD, 2000). Algumas determinações físico-químicas são capazes de avaliar a qualidade do pescado fresco, como a potenciométrica do pH e a de bases voláteis totais (IAL, 2008).

Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre o pH. A medida do pH em pescados é um dado indicativo do estado de conservação do pescado (IAL, 2008). Jay (2005) cita que a determinação do pH para avaliação do avanço do processo de deterioração de moluscos (mariscos, ostras e mexilhões), é mais significativa do que a determinação de bases voláteis totais devido ao teor de carboidratos normalmente apresentado por essas espécies.

A deterioração do pescado refrigerado devido à ação de enzimas e bactérias resulta na produção de diversos compostos nitrogenados, particularmente trimetilamina, dimetilamina e amônia. A porcentagem de bases voláteis pode ser uma indicação do grau de conservação do pescado (IAL, 2008).

Furlan (2007) avaliou a estabilidade físico-química de mexilhões e através dos parâmetros de pH e bases voláteis totais, observou parâmetros aceitáveis até o quarto dia de estocagem refrigerada à 10°C.

3.6 Congelamento

O congelamento é um antigo método de conservação de alimentos. Ele reduz a atividade de micro-organismos deteriorantes em alimentos além de poder eliminá-los por efeitos físicos e químicos, resultando em uma significativa extensão do prazo de validade de pescados (ARCHER, 2004; GRAM; DALGAARD, 2002). Apesar da maioria das reações de deterioração físicas e bioquímicas serem significativamente reduzidas em temperaturas abaixo de -18°C, muitas delas podem ser aceleradas entre 0 e -15°C devido ao aumento da concentração de solutos na fase aquosa não congelada. O processo de congelamento rápido minimiza a ocorrência dessas reações deteriorativas. O congelamento pode ainda eliminar ou injuriar uma grande parte da população de micro-organismos presente, sendo que a combinação entre um método de congelamento rápido e um descongelamento lento, provoca o melhor efeito na eliminação de micro-organismos (RIVAS, 2010).

Entretanto algumas bactérias são extremamente resistentes ao efeito do congelamento. Bactérias gram negativas são mais sensíveis ao congelamento do que gram positivas, mas algumas podem sobreviver muito bem em congelados, dependendo de sua natureza e do tipo da matriz alimentícia (ARCHER, 2004). Assim este método não é seguro para eliminação de bactérias patogênicas. Digirolamo *et al.* (2006), verificaram que 48 horas de congelamento foram suficientes para eliminar 99% de um inóculo de *Salmonella* em ostras, mas a *E. coli* provou ser menos sensível ao método, apresentando de 10 a 30% de sobrevivência. Vieira *et al.* (2009) mostrou que carne congelada por 90 dias apesar de não aparentar deterioração, teve a contagem de bactérias psicotróficas aumentada, provavelmente favorecida pelo processo de descongelamento. Heir *et al.* (2013) obteve a redução de 0,7 a 2,6 log de UFC na contagem da bactéria *E. coli* Shiga toxogênica em salsichas submetidas ao congelamento. Sendo assim, sem o uso de métodos coadjuvantes, o congelamento não é eficaz para garantir a segurança deste alimento.

Pescados são alimentos altamente perecíveis, por isso o congelamento é um método bastante adequado para sua conservação. Porém, reações de oxidação podem continuar acontecendo mesmo no pescado congelado, levando a formação de off-flavors. O congelamento também provoca danos a estrutura das proteínas, o que pode levar a perda de líquido e alterações de textura (RIVAS, 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Físico-Química e no Laboratório de Microbiologia de Água e Alimentos do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Utilizou-se também a prestação de serviço da Central Analítica da USP para a realização da análise de cromatografia gasosa e espectrometria de massas.

4.1 Material

4.1.1 Equipamentos e acessórios

- **Extrator de Clevenger**

Foi utilizado um extrator de Clevenger de vidro, acoplado a um balão de fundo redondo de 6000 mL, acoplado a uma manta elétrica, conforme a Figura 2. A água utilizada no condensador era resfriada a 10°C em um banho ultratermostático do fabricante Quimis e circulava em circuito fechado.

- **Balança analítica**

Foi usada uma balança analítica, do fabricante Marte modelo AL500, para a determinação da massa de orégano utilizado nas extrações. E uma balança analítica do fabricante BEL Engineering modelo M333 para preparo de soluções e demais análises.

- **Analizador da umidade**

Para determinação da umidade do orégano foi utilizado um analisador de umidade por infravermelho, modelo IV2500 do fabricante Gehaka.

- **Centrífuga**

Foi utilizada uma centrífuga, do fabricante Centribio, para separar o OE do resíduo de água e hidrolatos.

- **Refratômetro**

Foi utilizado um refratômetro marca AABE, modelo 2 WAJ, para a medida do índice de refração.

Figura 2 – Extrator de Clevenger



Fonte: AUTOR, 2013

- **Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas**

O óleo essencial foi analisado por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas por impacto de elétrons e analisador íon (CG-EM) da Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP).

- **Digestor de Nitrogênio**

As determinações de proteínas e bases voláteis totais foram feitas utilizando-se um destilador de nitrogênio modelo MA-036 do fabricante Marconi.

- **Mufla**

Para determinação do teor de cinzas do sururu foi utilizada uma mufla do fabricante GP Científica.

- **Microdigestor**

Para a determinação do teor de proteínas do sururu foi utilizado um microdigestor Kjeldahl do fabricante Quimis.

- **Estufa de secagem**

Para secagem de vidrarias e determinação do teor de umidade do sururu foi utilizada uma estufa de secagem modelo 515 do fabricante Fanem.

- **Chapas de aquecimento**

Para determinação do teor de lipídeos do sururu foi utilizado um rack de chapas de aquecimento modelo 11.36 do fabricante Prodicil.

- **Equipamentos para análises microbiológicas**

Foram utilizados os equipamentos do Laboratório de Microbiologia de Águas e Alimentos do Pavilhão Tecnológico: balança semi-analítica, estufas de cultura, geladeira para refrigerar amostras, autoclave vertical, capela de fluxo laminar e agitador de tubos tipo Vortex.

- **Vidrarias**

Ampolas, tubos de ensaio, tubos para centrifuga, picnômetro, micropipetas, pipetas, béqueres, balões volumétricos, placas de pétri, tubos de destilação (micro-kjeldahl), provetas, buretas, condensadores, balões de vidro, balões e condensadores tipo soxhlet, buretas e funis.

4.1.2 Reagentes e meios de cultura

Sulfato de sódio anidro, Tween-80, Tween-20, álcool etílico, ácido bórico, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido tricloroacético, óxido de magnésio, vermelho de metila, azul de metileno, verde de bromocresol, hexano, hidróxido de sódio, selênio e sulfato de potássio.

Plate Count Agar (PCA), Ágar Triptona de Soja (TSA), Caldo Brain Heart Infusion (BHI) e Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB).

4.2 Metodologia

A seguir são descritas as metodologias utilizadas para desenvolver esse trabalho, a qual envolveu as seguintes etapas:

- Obtenção do óleo essencial de orégano;
- Caracterização química e física do óleo essencial de orégano;
- Avaliação da eficácia do óleo essencial de orégano quando aplicado como um conservante em sururu (*Mytella falcata*);
- Determinação da composição química do sururu.

4.2.1 Obtenção do óleo essencial de orégano

- Obtenção do orégano

Foram adquiridas as folhas de orégano orgânico desidratadas da empresa ARVOREDO BRASIL – COOPAFLORA, Turvo, Paraná, em Maio de 2012 (Figura 3). A empresa forneceu um certificado atestando que as amostras foliculares adquiridas pertenciam à espécie *Origanum vulgare*. As mesmas foram armazenadas em temperatura ambiente, em embalagens plásticas de 1 quilo, até o momento da extração.

Figura 3 - Pacote de orégano orgânico desidratado



Fonte: AUTOR, 2012

- **Extração do óleo essencial**

A extração foi feita pelo processo de hidrodestilação, utilizando o aparelho extrator de Clevenger no Pavilhão Tecnológico da UFMA. Em cada extração, cerca de 220 gramas da planta desidratada foi colocada em um balão de fundo redondo de 6000 mL com cerca de 2000 mL de água destilada. Utilizou-se como fonte de aquecimento uma manta elétrica e acoplou-se o balão ao aparelho de Clevenger e a um condensador. No condensador circulava água refrigerada a 10°C por um banho termostático. Após 3 horas de destilação, o óleo essencial era recolhido do aparelho Clevenger. Para sua secagem foi feita uma percolação com sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro e centrifugação. O óleo seco foi acondicionado em ampolas de vidro âmbar em geladeira.

- **Determinação da cinética de extração**

O melhor tempo de extração foi determinado em função do rendimento do óleo essencial em função do tempo. Para isso, utilizou-se o mesmo sistema anterior de extração, com as mesmas condições, variando os tempos de extração: 30, 60, 90, 120 e 180 minutos. Ao aproximar-se a cada tempo pré-determinado, desligava-se a fonte geradora de calor, anotava-se e media-se o volume em mililitros do óleo extraído.

- **Rendimento do óleo essencial**

Para o cálculo do rendimento de cada extração de óleo foi calculado o rendimento de óleo essencial na razão massa de óleo essencial pela massa de planta em base livre de umidade. Para isso foi determinada a umidade das folhas de orégano de cada pacote adquirido, antes das extrações. Para essa determinação utilizou-se o analisador de umidade por infravermelho do fabricante Gehaka.

4.2.2 Caracterização física do óleo essencial

Para a caracterização das propriedades físico-químicas e composição química do óleo essencial, foram realizadas as seguintes análises:

- **Densidade**

A densidade do óleo essencial foi determinada utilizando-se um picnômetro de 1,0 mL, previamente seco, tarado e aferido, onde foram adicionadas e pesadas as amostras do óleo essencial (25°C).

- **Solubilidade em etanol (70% e 90%)**

Foi determinada a solubilidade utilizando-se soluções de etanol/água a 70% e 90% (v/v) mantendo-se constante o volume de óleo (25 µL) e adicionando-se proporcionalmente volumes crescentes da solução alcoólica até se atingir a completa solubilização.

- **Índice de refração**

O índice de refração foi determinado em refratômetro de Abbé e a temperatura corrigida para 20°C (IAL, 2008).

- **Cor e aparência**

A cor foi avaliada visualmente sob um fundo branco. A aparência foi avaliada em relação à transparência ou limpidez.

4.2.3 Caracterização química e quantificação dos componentes

Para a determinação da composição química do óleo essencial, foi utilizada a análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Esta análise foi realizada pela Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP). O óleo essencial foi analisado em cromatógrafo a gás acoplado a detector seletivo de massa – GC/MSD (Shimadzu, modelo QP5050A), usando uma coluna capilar BPX5 5% (30 m x 0.25 mm x 25 µm), gás de arraste hélio, e uma taxa de fluxo de 2,5 mL/min, no modo de impacto de elétrons em modo split. O gradiente de temperatura usado foi: 60°C (4 min) – 5°C/ 2 min – 320°C (2 min). A temperatura da interface foi mantida à 280°C. A identificação dos compostos foi realizada por comparação computadorizada dos espectros de massas obtidos com os das bibliotecas

Wiley e Nist. Os teores dos compostos foram então expressos em percentuais de áreas dos picos normalizados.

4.2.4 Avaliação da eficácia do óleo essencial de orégano quando aplicado como um conservante em sururu

Para a avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de orégano frente à *Escherichia coli* e bactérias mesófilas totais do sururu foi realizado um estudo do efeito do OE sobre a viabilidade das células microbianas após períodos de estocagem refrigerada. Também foram feitas as análises de pH e bases voláteis totais para avaliação do impacto na estabilidade físico-química. Em paralelo foram preparados controles sem adição do OE e utilizando-se método de conservação tradicional (congelamento), para efeito de comparação. A Tabela 1 resume os tratamentos aplicados aos sururus nos testes de avaliação da eficácia do OEO como agente antimicrobiano.

Tabela 1 - Resumo dos tratamentos aplicados aos sururus

Tratamento – Sigla	Concentração de OEO da solução aplicada	Condição de estocagem
1 – Controle	0%	Refrigeração (~ 4°C)
2 – OEO 0,7%	0,7%	Refrigeração (~ 4°C)
3 – OEO 1,4%	1,4%	Refrigeração (~ 4°C)
4 – Congelado	0%	Congelamento (~ -15°C)

Os seguintes procedimentos foram realizados:

4.2.4.1 Preparo das soluções de óleo essencial

Quando uma porção de óleo essencial é adicionada a um meio aquoso, uma fase oleosa separa-se da fase aquosa. Segundo Burt (2007) a estabilização da solução de óleo essencial em caldo de meio de cultura, melhora suas propriedades antimicrobianas. Uma vantagem a mais de se estabilizar a solução é a redução da concentração requerida de

óleo essencial, assim reduzindo também o aroma herbáceo. Isso amplia a perspectiva de se utilizar óleos essenciais como antimicrobianos em alimentos.

Foram realizados testes prévios de solubilização do OE em água utilizando-se os emulsificantes de grau alimentício: Tween 20 e Tween 80. Foram preparados tubos de ensaio com óleo essencial e água destilada na concentração de 40 $\mu\text{L/mL}$. Foi escolhida uma concentração acima da máxima concentração a ser usada em todo experimento para que a questão da solubilização fosse avaliada em uma condição mais crítica. Adicionaram-se diferentes quantidades dos emulsificantes em cada tubo, promovendo em seguida uma agitação vigorosa por um minuto com auxílio de um agitador de tubos do tipo vortex. Observou-se a estabilidade das emulsões obtidas nos tempos zero (imediatamente após a agitação), 10 minutos e 24 horas. A metodologia de solubilização adotada se baseou no método utilizado por Souza, 2006.

As concentrações das soluções que foram aplicadas no sururu foram calculadas em função do teor de carvacrol (composto majoritário) do óleo essencial de orégano utilizado e da concentração mínima necessária desse componente para inibição da bactéria *E. coli* (LARRAÍNZA, 2012). Selecionou-se para este trabalho concentrações de OEO que contivessem o teor de carvacrol 10 e 20 vezes maior do que a MIC deste composto para a *E. coli*.

As soluções de óleo essencial (0,7% e 1,4%) foram feitas através da diluição de uma solução mãe de 14%. As mesmas foram preparadas em tubos de ensaio com água estéril e o tensoativo Tween 80 (30 mg.mL^{-1}).

4.2.4.2 Obtenção das amostras de sururu

A matéria-prima utilizada como substrato para o crescimento da *Escherichia coli* e avaliação da eficácia do OE de orégano como conservante foi o sururu. O mesmo foi adquirido, sem a casca, na feira do bairro São Francisco de São Luís - MA. Diversas aquisições foram feitas para a realização de todos os testes, bem como suas repetições. As amostras foram transportadas imediatamente para o laboratório, em caixa térmica. Antes das análises o sururu foi lavado em água corrente por 10 minutos para eliminação de resíduos físicos, como pedaços de concha, algas e areia.

4.2.4.3 Determinação da atividade do OE frente à *Escherichia coli* em sururu

O OE, em diferentes concentrações, foi aplicado às amostras de sururus previamente tratadas e inoculadas com *Escherichia coli*. Foram feitos controles positivos (sururus contaminados sem OE) e um negativos (sururus não contaminados sem OE), que foram refrigerados. Também foram preparados controles com um método de conservação tradicional, o congelamento.

4.2.4.3.1 Tratamento da cepa e preparo do inóculo de *E. coli*

A cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 utilizada nessa pesquisa foi fornecida pelo Laboratório de Microbiologia de Águas e Alimentos do Pavilhão Tecnológico da UFMA. Inicialmente as cepas foram estocadas em Ágar Triptona de Soja (TSA / Merck) 1%. A bactéria foi transferida para crescimento em tubos de 1,0 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI / Merck) por 24h à 35°C. A pureza da cepa foi confirmada pela inoculação das células crescidas no caldo, através de alça de platina, para o ágar eosina azul de metileno (Ágar EMB / HIMEDIA) incubado por 24h à 35°C. Todas as colônias deveriam apresentar coloração escura com brilho metálico. Algumas colônias isoladas foram selecionadas e transferidas para TSA inclinado e incubadas por 48h à 35°C. A massa de célula crescida em TSA foi transferida com auxílio de uma alça de platina para tubos de Caldo BHI até atingir-se turbidez equivalente a 0,5 Mc Farland que equivale a uma carga de aproximadamente 10^8 UFC. mL⁻¹ (NASCIMENTO, 1996).

4.2.4.3.2 Preparo das amostras de sururu

As amostras de sururu foram submetidas a um tratamento térmico em água fervente (10 minutos/ 100°C) para eliminação de sua carga inicial de micro-organismos. Antes da inoculação das bactérias, uma amostra foi retirada para confirmação da eliminação da contaminação bacteriana, conforme descrito no item 4.2.4.4.2.

Após tratamento térmico, amostras de sururus (10g) foram colocadas em frascos plásticos estéreis de 50 mL. Cada frasco recebeu 2 mL do inóculo de *E. coli* e 8 mL de solução de OEO ou 8 mL de água estéril, para obter-se concentração final de 0,7% e 1,4% (v/v) e 0% (controle), respectivamente. Esse volume foi estipulado no intuito de manter o sururu suficientemente imerso. Visando a comparação com um método convencional de conservação, foram preparadas amostras sem OEO que foram

congeladas. Os frascos foram agitados manualmente por 1 minuto para homogeneização do OEO adicionado. Todo o procedimento foi conduzido de maneira asséptica (MEJHOLM, 2002; SOUZA, 2006). Estas amostras foram refrigeradas (4°C) ou congeladas (-15°C), conforme esquema da Tabela 1 e analisadas para contagem de *E. coli* durante 7 dias.

4.2.4.3.3 Contagem das células de *Escherichia coli*

Para cada tratamento, 10 g de amostra foram pesadas em frascos estéreis contendo 90 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl) e agitados vigorosamente por 1 minuto. A solução (1,0 mL) foi diluída em série em tubos de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina estéril. Conforme a técnica *spread-plate*, 0,1 mL de cada diluição, de cada amostra, foi inoculado em placas de EMB ágar para contagem de *E. coli*. As placas foram incubadas por 24 h à 35°C, e as colônias foram contadas após a incubação (VANDERZANT; SPLITTSTOESSER, 2001).

4.2.4.4 Determinação da atividade do OE frente a bactérias mesófilas totais de sururu *in natura* e estabilidade físico-química

As soluções de OE foram aplicadas às amostras de sururu *in natura*. Foram preparados controles sem OE e também controles usando um método de conservação tradicional, o congelamento.

4.2.4.4.1 Preparo das amostras de sururu

Amostras de sururus *in natura* (20g) foram colocadas em frascos plásticos estéreis de 50 mL. Cada frasco recebeu 20 mL de solução de concentração de 0,7% e 1,4% (v/v) de OEO ou 20 mL de água estéril (controle). Visando a comparação com um método convencional de conservação, foram preparadas amostras sem OEO que foram congeladas. Os frascos foram agitados manualmente por 1 minuto para homogeneização do OEO adicionado. Estas amostras foram refrigeradas (4°C) ou congeladas (-15°C), conforme esquema da Tabela 1 e analisadas para contagem de bactérias mesófilas totais, pH e bases voláteis totais durante 10 dias.

4.2.4.4.2 Contagem das células de bactérias mesófilas totais

Para cada tratamento, 10 g de amostra foram pesadas em frascos estéreis contendo 90 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl) e agitados vigorosamente por 1 minuto. A solução (1,0 mL) foi diluída em série em tubos de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina estéril. Conforme a técnica *pour-plate*, 1,0 mL de cada diluição, de cada amostra, foi inoculado em placas de Pétri que receberam o plate count ágar (PCA / MERCK). As placas foram incubadas por 48h à 35°C e as colônias foram contadas após a incubação (VANDERZANT; SPLITTSTOESSER, 2001).

4.2.4.4.3 pH

O pH dos sururus foi determinado conforme metodologia descrita no manual de Métodos de Análises de Pescados da Embrapa (FOGAÇA *et al.*, 2009).

Foram pesadas 10 g de cada amostra. Cada alíquota foi homogeneizada em liquidificador e diluída em 40 mL de água. A medida do pH foi feita em peagômetro previamente calibrado.

4.2.4.4.4 Bases voláteis totais

Para cada tratamento, homogeneizou-se 20 gramas de amostra em 60 mL de ácido tricloroacético 5%. Filtrou-se a mistura em papel de filtro quantitativo para obtenção de um extrato claro. O nitrogênio proteico era precipitado. Com uma pipeta transferia-se 10 mL do extrato para um tubo de micro Kjeldahl e adicionava-se 1,0 g de óxido de magnésio (alcalinizante) e 20 mL de água destilada. Destilava-se por arraste a vapor e o destilado era recolhido em 20 mL de ácido bórico a 4% com indicador misto (verde de bromocresol e vermelho de metila). Amônia e aminas voláteis foram tituladas com solução de ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹ padronizada até a viragem para coloração avermelhada (BRASIL, 1999).

4.2.5 Determinação da composição química do sururu

Por haver poucos dados na literatura a respeito do sururu e para auxiliar no entendimento das possíveis interações físico-químicas que pode haver entre o sururu e o óleo essencial aplicado, determinou-se a composição centesimal do mesmo.

4.2.5.1 Umidade – Secagem direta em estufa a 105°C

A umidade representa a água contida no alimento. Sua determinação é feita através perda de peso sofrida pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água é removida. Nesta determinação, aproximadamente 5,0 gramas de amostra foram pesadas em capsulas de porcelana previamente tarada e aquecidas em estufa a 105°C por 3 horas (IAL, 2008).

4.2.5.2 Cinzas – Resíduo por Incineração

Cinzas é o nome dado ao resíduo obtido pelo aquecimento de um produto a temperatura de 550 a 570°C. Para esta determinação, foram pesadas aproximadamente 3,0 gramas da amostra em capsulas de porcelana previamente taradas. A amostra foi carbonizada sobre o aquecimento brando da chama de um bico de bunsen e posteriormente incinerada em uma mufla a 570°C por 4 horas. As capsulas foram resfriadas em dessecador e pesadas (IAL, 2008).

4.2.5.3 Lipídios – Extração direta em Soxhlet

Os lipídios são compostos orgânicos altamente energéticos, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Incluem-se na classe dos lipídios os óleos, gorduras, fosfolipídios, ceras, ácidos graxos e esteróis. A determinação de lipídios é feita através de uma extração com solvente orgânico.

Para esta determinação foram pesadas amostras de 5 gramas de sururu em cartucho de Soxhlet, o qual foi tampado com algodão. O cartucho foi colocado dentro de um extrator de Soxhlet, o qual foi acoplado a um balão de fundo chato previamente tarado a 105°C. Adicionou-se o solvente hexano e conectou-se o conjunto a um condensador de bolas. Realizou-se a extração por aquecimento contínuo em chapa elétrica por 6 horas. Após a extração removeu-se o cartucho, recuperou-se o hexano e o balão com o resíduo extraído foi levado para evaporação do resíduo de hexano uma estufa a 105°C por uma hora. O balão foi resfriado em dessecador e pesado (IAL, 2008).

4.2.5.4 Proteína – método micro-Kjeldahl

Aproximadamente 0,100 gramas de amostra foram pesadas em papel de seda livre de nitrogênio e transferidas para tubos de digestão micro-Kjeldahl. Acrescentou-se 2 mL de ácido sulfúrico PA e 0,5 gramas dos catalisadores selênio e sulfato de potássio. Realizou-se digestão em bloco digestor a 360°C por 2 horas.

Adicionou-se 2 mL de água destilada ao tubo com a amostra digerida e o mesmo foi acoplado ao destilador de nitrogênio. Adicionou-se 15 mL de hidróxido de sódio 40%. E realizou-se a destilação por quatro minutos, recolhendo-se o destilado em um erlenmeyer com 25 mL de ácido clorídrico 0,02 mol.L⁻¹, 5 gotas do indicador vermelho de metila e 1 gota de azul de metileno. O destilado recolhido no erlenmeyer foi titulado com hidróxido de sódio 0,02mol.L⁻¹ (FAE, 1995).

4.2.5.5 Determinação do teor de carboidrato

O teor de carboidrato foi calculado pela diferença entre o total da amostra (100%) e os teores de proteína, lipídios, umidade e cinza obtidos conforme descritos anteriormente (BRASIL, 2003).

4.2.6 Análise estatística

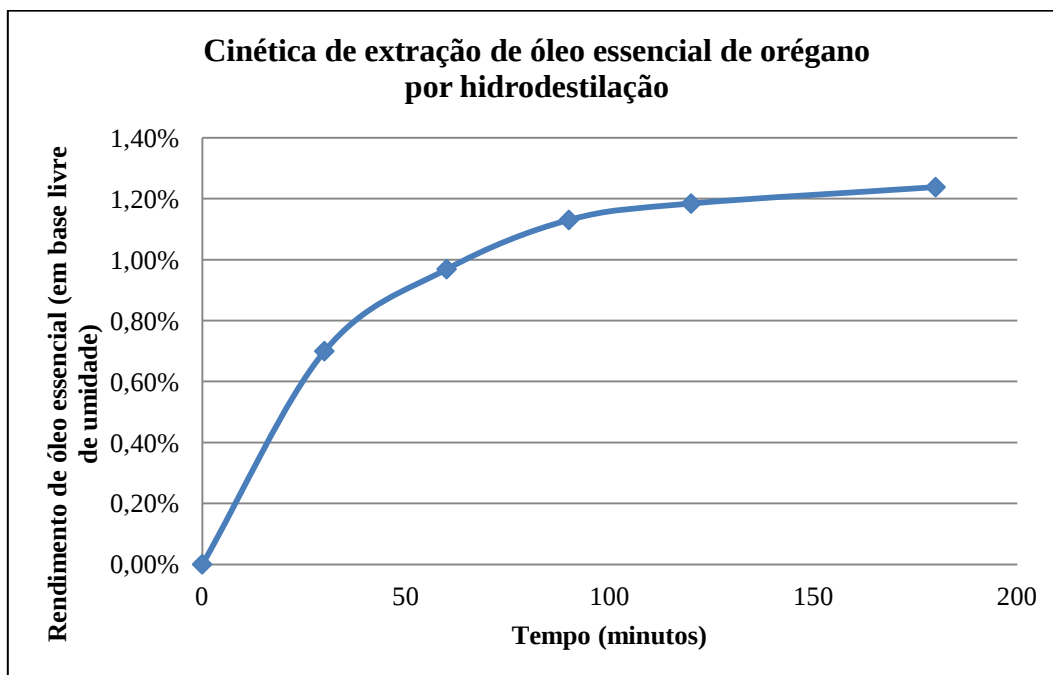
Análises microbiológicas foram feitas em duplicata e físico-químicas em três repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, ANOVA para fator duplo com repetição usando o programa de análise estatística Action versão 2.5.197.344 (ESTATCAMP, 2013). Diferenças entre os tratamentos das amostras foram determinadas aplicando-se o teste de comparação múltipla de Tukey. Diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento e características físicas do óleo essencial

A massa de 4 kg de orégano desidratado foi processada em dezoito extrações por hidrodestilação, obtendo-se aproximadamente 39 mL de óleo essencial de orégano. O rendimento médio, em base livre de umidade, foi de $1,17\% \pm 0,298$. O rendimento obtido é similar ao encontrado por Busatta, 2006. A figura 4 mostra a cinética de extração. Entre 120 e 180 minutos, o rendimento se estabiliza, justificando a utilização de 3 horas de extração.

Figura 4 – Cinética de extração do óleo essencial de orégano



A Tabela 2 apresenta um resumo das características físico-químicas determinadas neste trabalho e dados de referências bibliográficas consultadas para comparação. Observa-se que os resultados obtidos estão coerentes com a literatura consultada.

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do óleo essencial de orégano e comparação com dados de referência.

Propriedades	Resultados	Referências
Densidade (g.mL ⁻¹)	0,938 ± 0,028	0,92 (BUSATA, 2006)
Índice de refração (20°C)	1,495 ± 0,000	1,508 (SOUZA, 2006)
Solubilidade em álcool a 90% (v/v)	01:01	Não disponível
Rendimento (%)	1,17 ± 0,298	1,3 ± 0,16 (BUSATA, 2006)
Cor	Amarelo	Amarelo (SOUZA, 2006)
Aparência	Límpido	Límpido (SOUZA, 2006)

O óleo essencial não se solubilizou em solução de etanol a 70%. Foi obtida a solubilização do mesmo em solução de etanol a 90% na proporção de uma parte de óleo para uma parte de solução de etanol conforme exibido na Figura 5.

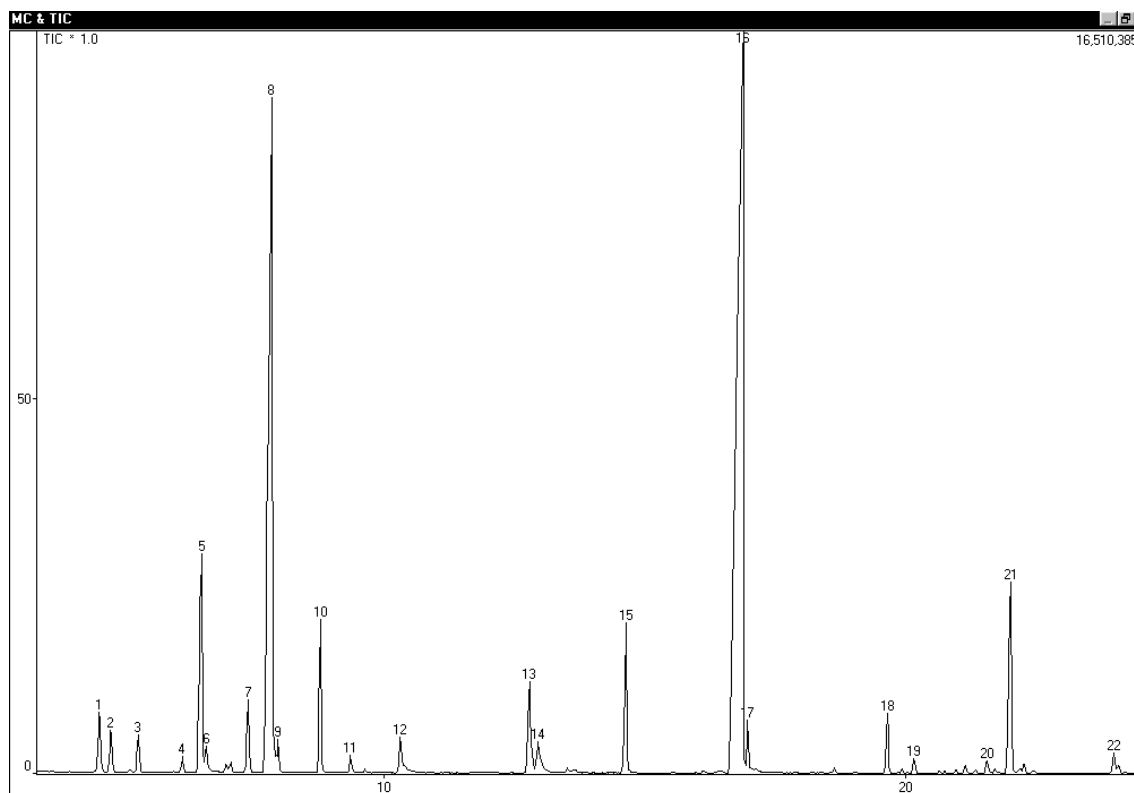
Figura 5 – Óleo essencial de orégano puro e óleo essencial de orégano solubilizado em etanol 90%



Fonte: AUTOR, 2012.

5.2 Caracterização química do óleo essencial de orégano

A Figura 6 mostra o cromatograma obtido pela técnica de separação de cromatografia gasosa. A amostra injetada foi separada em 22 picos. Pela normalização da área de cada pico calculou-se o teor relativo de cada componente.

Figura 6 – Cromatograma do óleo essencial de orégano.

Fonte: AUTOR, 2013

Através da espectrometria de massas realizou-se a identificação dos picos. Obteve-se identificação precisa de todos os picos. Adams, 2005 foi utilizado como referência para consulta e transcrição dos nomes usuais dos compostos identificados. A Tabela 3 mostra um resumo dos dados da identificação química dos componentes do óleo essencial de orégano. A Tabela 4 apresenta a composição do óleo essencial estudado conforme suas funções químicas.

Tabela 3 – Compostos identificados na amostra de óleo essencial de orégano.

Pico ¹	Compostos	TR ² (min.)	IR ³	%A ⁴
1	α -Felandreno	4.529	4.452	1,22
2	2-Pineno	4.750	4.618	0,83
3	Canfeno	5.274	5.202	0,79
4	β -Pineno	6.121	6.052	0,32
5	1-octen-3-ol	6.498	6.377	6,18
6	3-Octanona	6.593	6.552	0,43
7	α -terpineno	7.386	7.318	1,6
8	<i>m</i> -Cimeno	7.836	7.652	24,17
9	1,8-Cineol	7.965	7.893	0,71
10	γ -Terpineno	8.778	8.702	2,94
11	(Z)- β -Terpineol	9.348	9.277	0,43
12	α -Terpinoleno	10.308	10.235	0,77
13	Borneol	12.788	12.693	2,81
14	Terpineol-4	12.955	12.910	1,01
15	Timol metil éter	14.650	14.543	3,15
16	Carvacrol	16.894	16.602	45,74
17	Timol	16.982	16.952	0,69
18	trans-Cariofileno	19.665	19.585	1,16
19	α -humuleno	20.170	20.102	0,28
20	1,4-Metanoazuleno	21.577	21.510	0,22
21	β -Bisaboleno	22.027	21.910	4,22
22	(+)-espatulenol	24.014	23.943	0,33

Nota: ¹Número do pico pela ordem de eluição da coluna; ²Tempo de retenção dos compostos na coluna em minutos; ³Índice de retenção; ⁴%A: Porcentagem da área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos componentes na amostra.

Tabela 4 – Função química dos compostos presentes no óleo essencial de orégano.

Função	% teor	% n° compostos
monoterpenos aromáticos	81,72	45
sesquiterpenos	6,21	23
alcoóis secundários	6,18	4,5
monoterpenos alifáticos	5,46	23
cetona	0,43	4,5
Total	100	100

A presença do carvacrol como o componente majoritário do óleo essencial de orégano tem sido frequentemente relatada na literatura (TOMA; BARICEVIC, 2002). Sivropoulou *et al.* (1996) e D'Antuono *et al.* (2000) encontraram o carvacrol como componente majoritário no estudo do óleo essencial do *Origanum vulgare* de origem grega e italiana, respectivamente. Busatta (2006) analisou OE de *O. vulgare* de origem chilena e encontrou o 4-terpineol em maior concentração. Sahin *et al.* (2004) encontraram o cariofileno como componente majoritário em OEO da Turquia e Sartoratto *et al.* (2004) encontraram o timol como majoritário de OE de *O. vulgare* brasileiro. Kokkini *et al.* (1997) analisaram plantas de diferentes regiões da Grécia e encontraram o teor de carvacrol variando de 2,4 a 69,6%, timol de 0,2 a 42,8% e *p*-Cimeno de 17,3 a 51,3%. Apesar das grandes variações que podem ocorrer em função das condições de ambientais como altitude e disponibilidade de água (RUSSO, 2013), estação do ano (ANWAR, 2008), estágio fenológico da planta (JORDÁN, 2013), do tipo de extração (CASTRO, 2000), entre outros fatores, observa-se que a presença do carvacrol ou a de seu isômero, o timol, é bastante comum, assim como se observou no óleo essencial desse trabalho.

O segundo componente em ordem de concentração no OE estudado foi o composto *m*-cimeno ou β -cimeno. A estrutura do cimeno consiste de um anel benzênico com um grupo isopropil e um metil, o qual pode ocorrer em diferentes posições, resultando nos terpenóides *para*, *orto* ou *meta*-cimeno, que podem ser encontrados em plantas (SINGH *et al.*, 2006). O composto *p*-cimeno, ou simplesmente cimeno, é o mais comum em OEs em geral, assim como o OEO. Foram encontrados poucos estudos que relatam a presença do *m*-cimeno em um OE, sendo que podemos citar Fornari *et al.* (2012) que

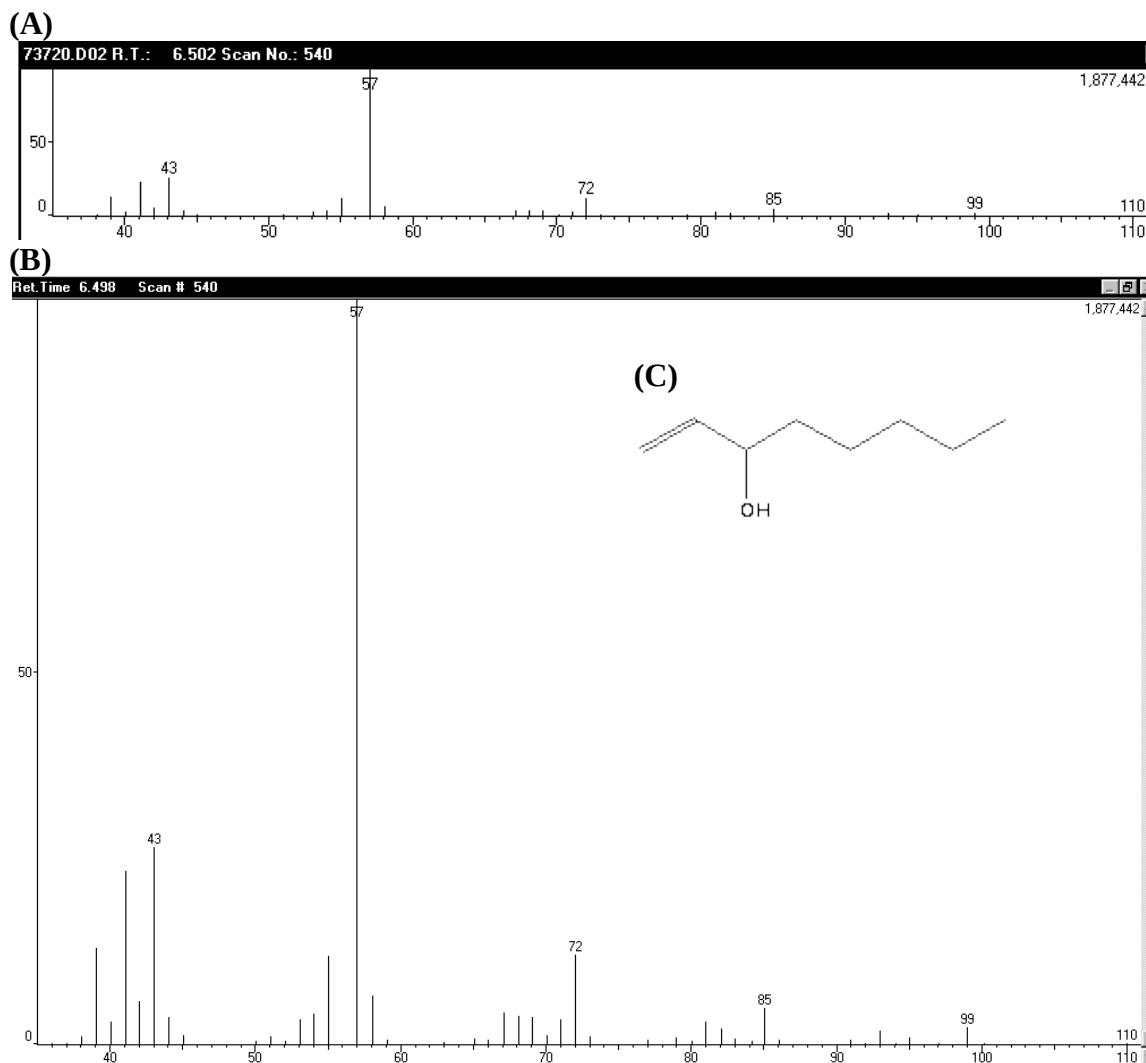
encontrou cerca de 1% deste composto em OE de *Origanum vulgare*, além de Afoulous *et al.* (2013) e Policegoudra *et al.* (2012), que encontraram este composto em outras plantas, folhas de *Cedrelopsis grevei* e rizomas de *Homalomena aromática*, respectivamente.

O 1-octen-3-ol, terceiro componente em ordem de concentração, é pouco comum na composição de OEs. Este é um dos compostos voláteis mais importantes na composição do aroma de cogumelos (COMBET *et al.*, 2006). Bisht *et al.* (2009) e Milos *et al.* (2000) encontraram cerca de 2% do 1-octen-3-ol em OE de *Origanum vulgare* do noroeste do Himalaia e Croácia, respectivamente. Abdelshafeek *et al.* (2010) relatou ter encontrado o 1-octen-3-ol como componente majoritário (52,87%) da planta *Verbena tenuisecta* cultivada na Líbia.

A seguir estão relacionados os espectros de massa dos três principais picos apresentados na Figura 6, seguindo a ordem do tempo de retenção e suas respectivas propostas de identificação dada pela comparação computadorizada com as espectrotescas NIST e WILEY.

Com base nas espectrotescas NIST e WILEY, a Figura 7, corresponde ao **1-octen-3-ol** de fórmula molecular $C_8H_{16}O$. Como é típico de alcoóis alifáticos, o pico do íon molecular é muito fraco e não é observado. O pico base $m/z=57$ [M-71] é provavelmente resultante da clivagem da ligação carbono-carbono vizinha ao átomo de oxigênio, frequente para alcoóis secundários. O pico é intenso devido ao cátion formado ($C_2H_3-CH=OH^+$) após a eliminação do grupo maior (C_5H_{11}). O pico $m/z=43$ é provavelmente resultante da perda de um grupo metileno [M-71-14] (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

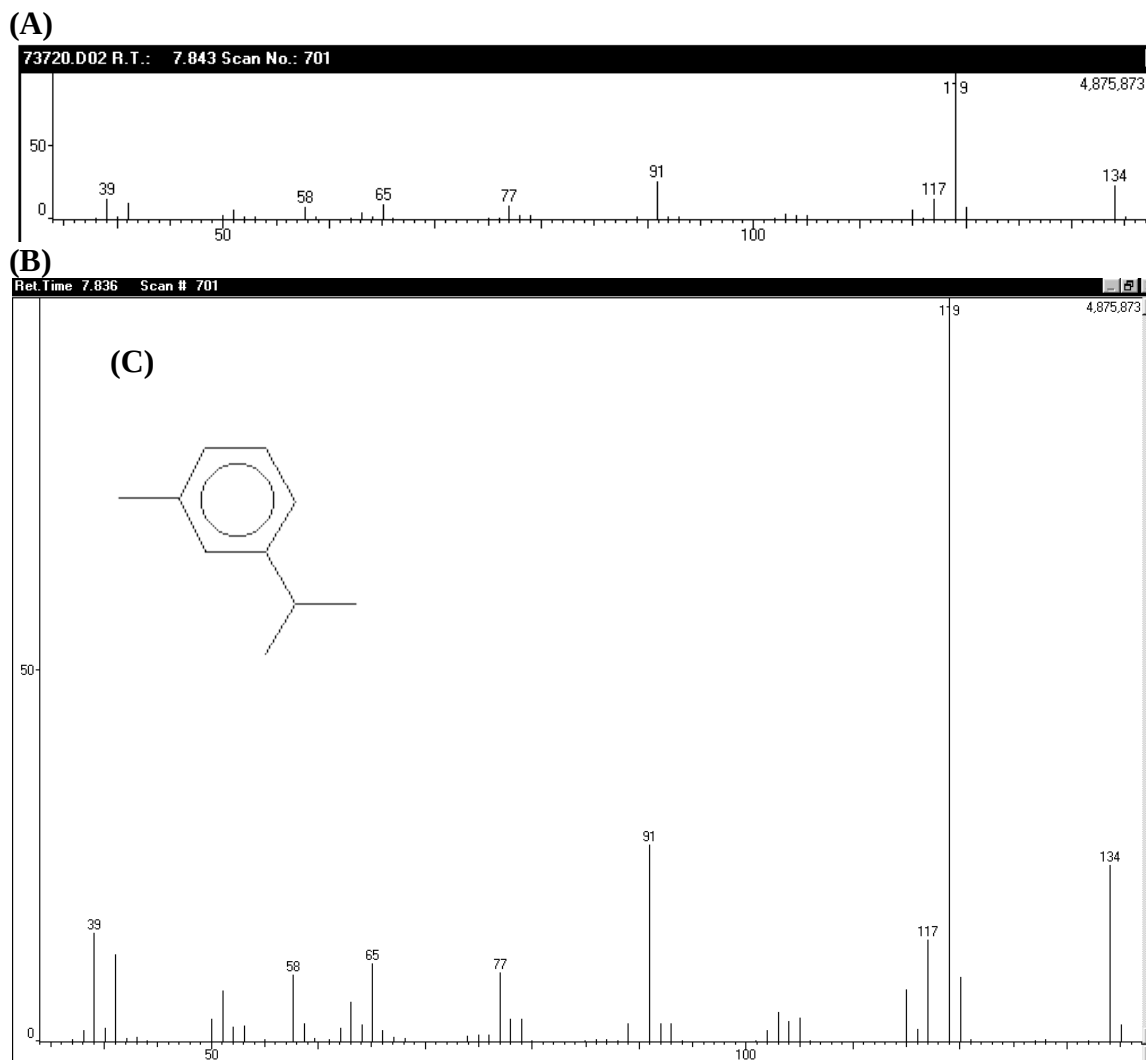
Figura 7 – Espectros de massas da (A) proposta de identificação através das espectrotescas NIST e WILEY e de (B) composto do pico 5, com TR=6,498; (C) fórmula estrutural do 1-octen-3-ol.



Fonte: A e C: NIST, 2011; B: AUTOR, 2013.

Com base nas espectrotescas NIST e WILEY, a Figura 8, corresponde ao ***m*-cimenol**. Compostos aromáticos exibem picos de íon molecular intensos como o pico apresentado em $m/z=134$, confirmando a fórmula molecular $C_{10}H_{14}$. O pico base $m/z=119$ [M-15] é provavelmente resultante da perda de um grupo metila. A presença do pico $m/z=91$ é característica de compostos aromáticos ramificados e indica a formação do íon tropílio ($C_7H_7^+$), um fragmento estável que apresenta ressonância. O pico $m/z=77$ corresponde ao íon $C_6H_5^+$, também típico de aromáticos, e pode ser resultante da eliminação de um grupo metileno do íon tropílio (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

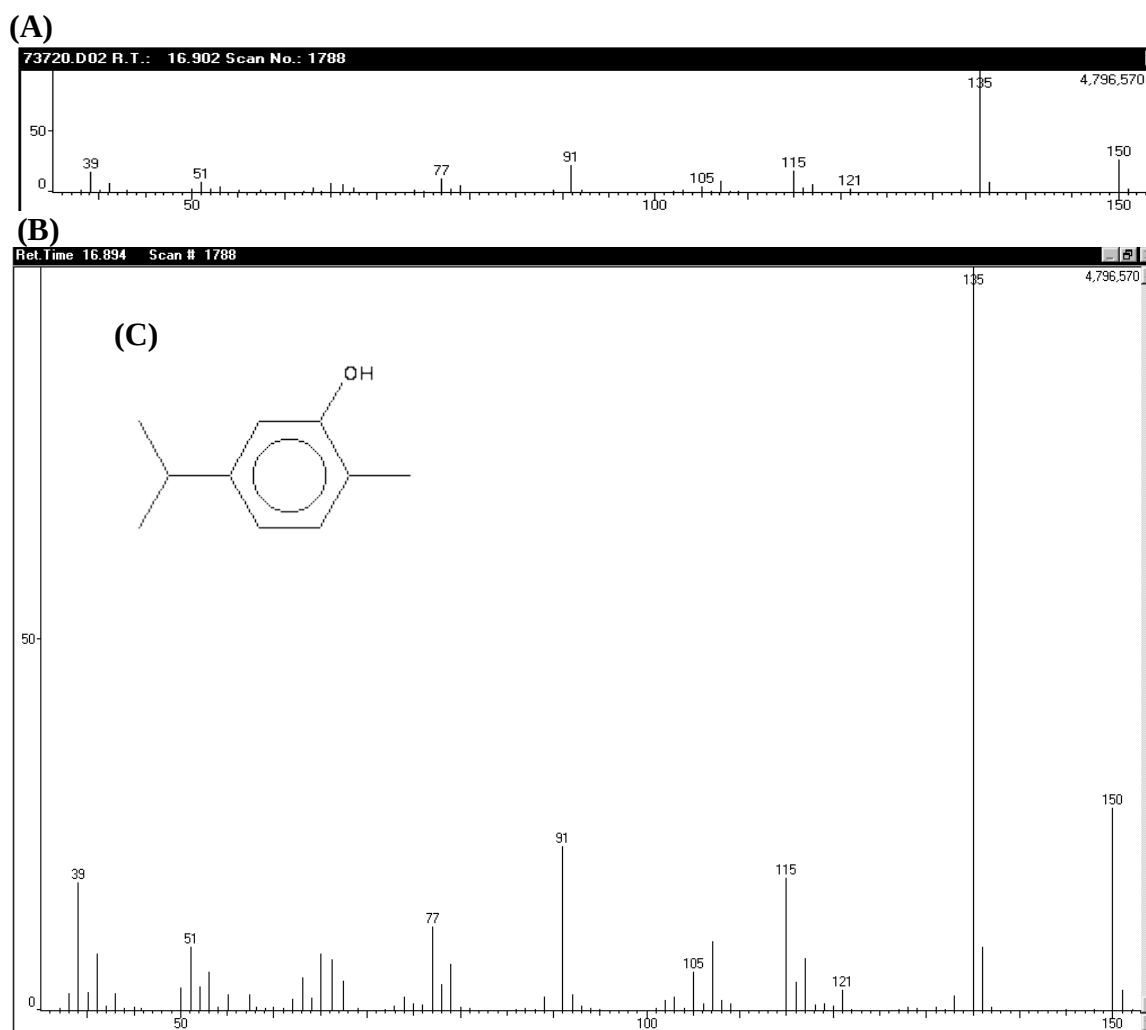
Figura 8 – Espectros de massas da (A) proposta de identificação através da espectroteca NIST e WILEY e do (B) composto do pico 8, com TR=7,836; (C) fórmula estrutural do *m*-cimeno.



Com base nas espectrotescas NIST e WILEY, a Figura 9, corresponde ao componente majoritário do óleo essencial de orégano analisado, o **carvacrol**. Fenóis são compostos aromáticos que exibem picos de íon molecular intensos. O pico do íon molecular apresenta $m/z=150$, confirmando a fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$. O pico base $m/z=135$ [M-15] para o carvacrol é provavelmente resultante da perda de um grupo metila. A presença do pico $m/z=91$ é característica de compostos aromáticos ramificados e indica a formação do íon tropílio ($C_7H_7^+$), um fragmento estável que apresenta ressonância. O pico $m/z=77$ corresponde ao íon $C_6H_5^+$, também típico de aromáticos, e pode ser resultante da eliminação de um grupo metileno do íon tropílio. O

íon $C_6H_5^+$ por sua vez elimina $HC\equiv CH$ para dar o cátion $C_4H_3^+$ ($m/z=51$) (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Figura 9 – Espectros de massas da (A) proposta de identificação através da espectroteca NIST e WILEY e do (B) composto do pico 16, com TR=16,894; (C) fórmula estrutural do carvacrol.



Fonte: A e C: NIST, 2011; B: AUTOR, 2013.

5.3 Eficácia do óleo essencial de orégano quando aplicado como um conservante em sururu

5.3.1 Preparo das soluções de óleo essencial (teste de solubilização)

A Tabela 5 demonstra os resultados obtidos no teste de solubilização realizado com os tensoativos Tween 20 e Tween 80. A partir da concentração de 30 mg/mL para ambos os tensoativos obteve-se uma solução estável imediatamente após a agitação. No entanto, após 10 minutos de repouso, no caso da emulsão obtida com o tensoativo Tween 20 observaram-se algumas gotículas de óleo se desprendendo na superfície da emulsão. Portanto o Tween 80 foi o tensoativo escolhido para dar continuidade nos experimentos.

Tabela 5 – Estabilidade da solução de óleo essencial de orégano preparada com os tensoativos Tween 20 e Tween 80 em diferentes concentrações.

Tensoativo	Concentração (mg/mL)	Estabilidade da emulsão		
		Após agitação	Após 10 minutos	Após 24 horas
Tween 20	20	instável	instável	instável
	30	estável	instável	instável
	40	estável	estável	estável
Tween 80	20	instável	instável	instável
	30	estável	estável	estável
	40	estável	estável	estável

5.3.2 Atividade do OE frente à *Escherichia coli* em sururu

O efeito antimicrobiano das soluções de OEO a 0,7% e 1,4% e do congelamento sob a *E. coli* inoculada em sururus, estocados por 7 dias, estão apresentados na Tabela 6 e Figura 10. Todas as amostras foram inoculadas com uma carga de aproximadamente 7,0 log de UFC/g de *E. coli*. Através da análise de variância (ANOVA) realizada, observou-se que os tratamentos possuem diferenças significativas entre si. A aplicação da solução com 0,7% de OEO provocou um efeito de redução da carga contaminante apenas no sétimo dia de estocagem ($p < 0,05$), resultando em uma redução de apenas 0,53 log UFC/g em relação ao controle. Já a adição da solução com 1,4% de OEO resultou em um alto efeito inibitório sob a *E. coli*. Houve uma redução gradual da carga

de bactérias, sendo que após o terceiro dia não houve crescimento de células viáveis nas placas. Amostras submetidas ao congelamento apresentaram queda significativa na contagem bacteriana a partir do segundo dia de estocagem. No sétimo dia de estocagem houve a redução de 0,97 log UFC/g em relação ao controle. Esse método foi mais eficaz do que a aplicação de solução a 0,7% de OEO, porém menos eficaz do que a aplicação de solução de 1,4% de OEO ($p < 0,05$).

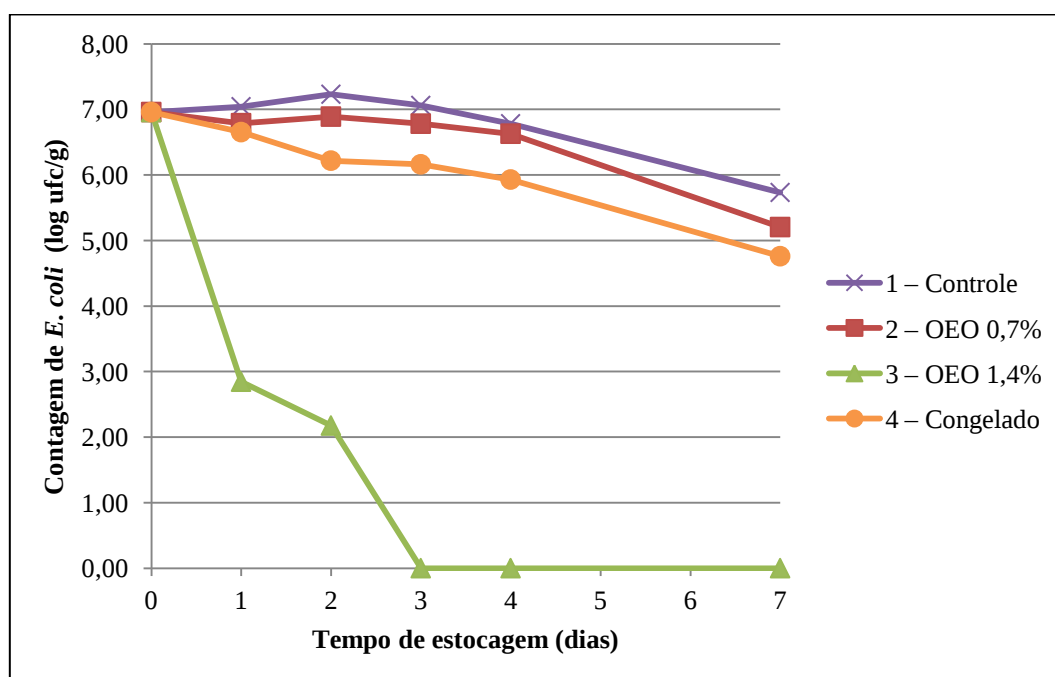
Tabela 6 - Desenvolvimento da *E. coli* inoculada em sururus submetidos a diferentes tratamentos

Tratamento ^a	Tempo de estocagem (dias)					
	0	1	2	3	4	7
1	7,00 ± 0,05 ^{Aa}	7,04 ± 0,23 ^{ACa}	7,23 ± 0 ^{Ca}	7,06 ± 0,08 ^{ACa}	6,78 ± 0,01 ^{Da}	5,73 ± 0,07 ^{Ba}
2	7,00 ± 0,05 ^{Aa}	6,79 ± 0,13 ^{ABa}	6,89 ± 0,09 ^{ABa}	6,78 ± 0,02 ^{ABa}	6,63 ± 0,17 ^{Ba}	5,20 ± 0 ^{Cc}
3	7,00 ± 0,05 ^{Aa}	2,85 ± 0 ^{Bb}	2,18 ± 0,21 ^{Cc}	0,00 ^b ± 0 ^{Dc}	0,00 ^b ± 0 ^{Dc}	0,00 ^b ± 0 ^{Dd}
4	7,00 ± 0,05 ^{Aa}	6,65 ± 0,07 ^{Ba}	6,22 ± 0,02 ^{Cb}	6,16 ± 0,11 ^{CDb}	5,93 ± 0,05 ^{Db}	4,76 ± 0,03 ^{Eb}

Valores expressos em Média ± DP log UFC/g. Diferentes letras significam diferença a 95% (teste de Tukey - $p < 0,05$), sendo a comparação feita entre letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas.

^a: 1: sem OEO; 2: solução com 0,7% de OEO; 3: solução com 1,4% de OEO; 4: sem OEO, congelado à -15°C. ^b: menor do que o limite de detecção da análise (2 log UFC/g).

Figura 10 – Gráfico do desenvolvimento da *E. coli* inoculada em sururus submetidos a diferentes tratamentos.



Esse estudo mostra que o efeito inibitório do OEO contra a *E. coli* em sururus é baixo em concentração 0,7%. Essa concentração possui o teor de carvacrol 10 vezes maior do que a CIM desse composto para a bactéria *E. coli* (LARRAÍNZA, 2012). No entanto, a concentração de 1,4% (teor de carvacrol 20 vezes maior do que a CIM), apresentou alto efeito inibitório, eliminando o crescimento da bactéria em placas em após três dias de estocagem refrigerada.

5.3.3 Atividade do OE frente às bactérias mesófilas totais de sururu *in natura* e estabilidade físico-química

O efeito antimicrobiano das soluções de OEO a 0,7% e 1,4% e do congelamento sob a contagem de bactérias mesófilas em sururus *in natura*, estocados por 10 dias, estão apresentados na Tabela 7 e a Figura 11. Através da análise de variância (ANOVA) realizada, observou-se que os tratamentos possuem diferenças significativas entre si. Amostras refrigeradas que não receberam solução de OEO apresentaram aumento de 2,12 log UFC/g, na contagem de bactérias mesófilas durante o período de estocagem. A aplicação de solução a 0,7% de OEO resultou em um aumento mais discreto da carga bacteriana ao longo do período de estocagem, sendo que essas amostras apresentaram contagem de bactérias mesófilas totais 1,24 log UFC/g menor do que o controle. Amostras que receberam solução de 1,4% de OEO apresentaram uma queda na contagem de bactérias mesófilas no segundo dia, porém nos dias seguintes as mesmas ultrapassaram a contagem inicial, apresentando aumento de 0,66 log UFC/g ao final dos 10 dias de estocagem em relação à contagem inicial e redução de 1,46 log UFC/g em relação ao controle. O congelamento se mostrou o tratamento mais eficaz no controle da contagem de bactérias mesófilas, pois apesar dos aumentos de 0,46 log UFC/g e 0,42 log UFC/g observados no 2º e 4º dias de estocagem, após o 6º dia, a contagem voltou a ficar igual a contagem inicial ($p < 0,05$) e 1,96 log UFC/g menor do que o controle.

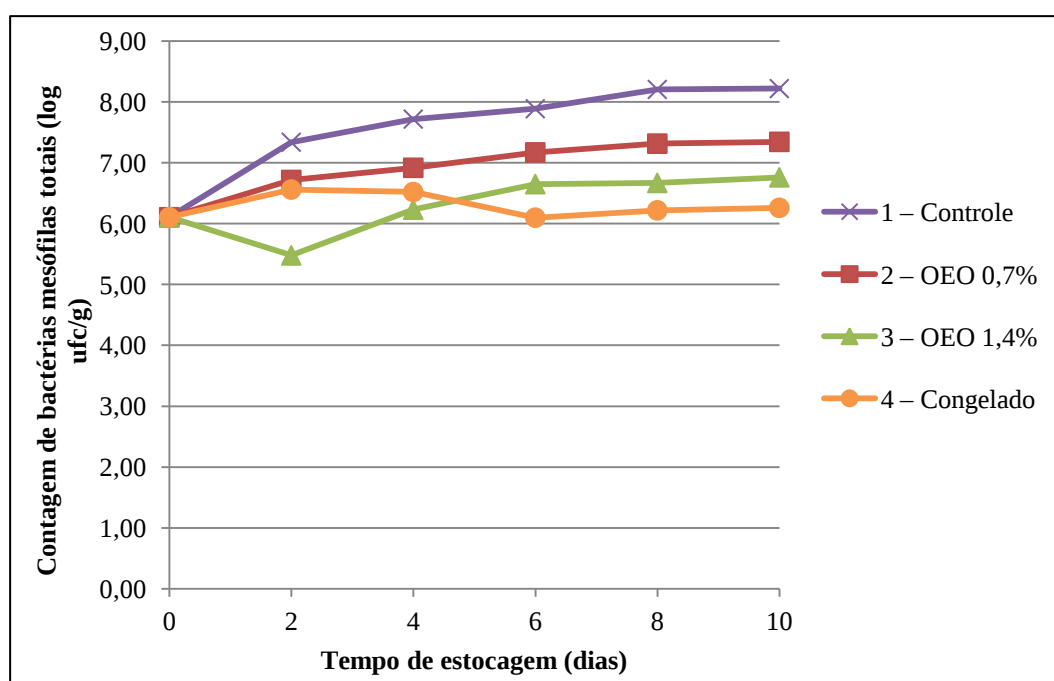
Tabela 7 - Desenvolvimento das bactérias mesófilas totais em sururus *in natura* submetidos a diferentes tratamentos.

Tratamento ^a	Tempo de estocagem (dias)					
	0	2	4	6	8	10
1	6,10 ± 0,05 ^{Aa}	7,34 ± 0,10 ^{Ba}	7,72 ± 0,01 ^{BCa}	7,89 ± 0,09 ^{BCa}	8,20 ± 0,24 ^{Ca}	8,22 ± 0,35 ^{Ca}
2	6,10 ± 0,05 ^{Aa}	6,72 ± 0,04 ^{Bb}	6,92 ± 0,05 ^{Cb}	7,17 ± 0,04 ^{Cb}	7,31 ± 0,01 ^{Cc}	7,34 ± 0,23 ^{Cac}
3	6,10 ± 0,05 ^{Aa}	5,48 ± 0 ^{Bc}	6,23 ± 0,02 ^{ACc}	6,65 ± 0,03 ^{CDc}	6,67 ± 0,20 ^{CDbc}	6,76 ± 0,19 ^{Dbc}
4	6,10 ± 0,05 ^{Aa}	6,56 ± 0,11 ^{Bb}	6,52 ± 0 ^{Bd}	6,10 ± 0,02 ^{Ad}	6,22 ± 0,09 ^{Ab}	6,26 ± 0,04 ^{Ab}

Valores expressos em Média ± DP log UFC/g. Diferentes letras significam diferença a 95% (teste de Tukey - $p < 0,05$), sendo a comparação feita entre letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas.

^a: 1: sem OEO; 2: solução com 0,7% de OEO; 3: solução com 1,4% de OEO; 4: sem OEO, congelado à -15°C.

Figura 11 – Gráfico do desenvolvimento das bactérias mesófilas totais em sururus *in natura* submetidos a diferentes tratamentos



Apesar da aplicação da solução de OEO não ter sido capaz de reduzir a contagem de bactérias mesófilas totais, a solução de 1,4% de OEO foi capaz de impedir o aumento dessas bactérias.

O efeito das soluções de OEO a 0,7% e 1,4% e do congelamento sob o pH e o teor de BVT em sururus *in natura*, estocados por 10 dias, estão apresentados na Tabela 8 e Figura 12 e Tabela 9 e Figura 13, respectivamente. Sururus refrigeradas que não

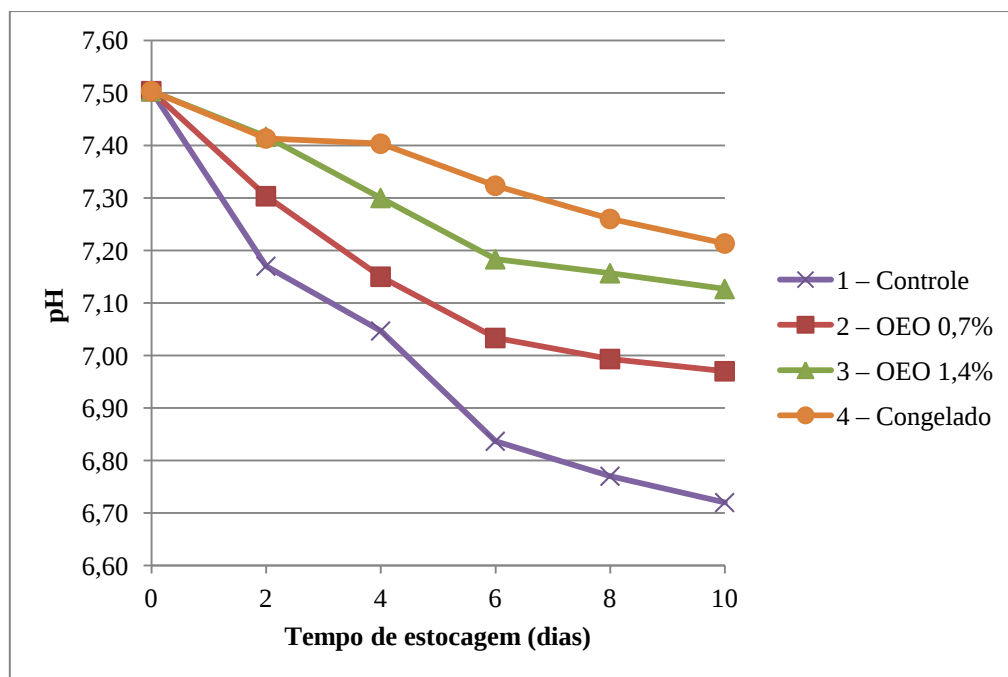
receberam solução de OEO apresentaram uma queda significativa ($p < 0,05$) do pH e um aumento também significativo ($p < 0,05$) do teor de BVT. Sendo o limite máximo aceitável para o teor de BVT em pescados 30 mg / 100 gramas (BRASIL, 1997), entre o sexto e oitavo dia de estocagem essas amostras de sururu tornaram-se inaceitáveis. Amostras que receberam solução de OEO 0,7% apresentaram alterações mais discretas, porém não diferiram significativamente ($p < 0,05$) de amostras que não receberam solução de OEO. Amostras congeladas e as que receberam solução de OEO 1,4% apresentaram redução do pH significativamente menor do que as amostras que não receberam solução de OEO. Apesar de a redução de pH ter sido maior nas amostras que receberam solução de OEO 1,4% do que a ocorrida nas amostras congeladas, estes tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si. O mesmo ocorreu em relação ao teor de BVT para sururus que receberam solução de OEO 1,4%, o aumento foi pequeno, assim como nas amostras congeladas e foi significativamente menor do aumento registrado para amostras que não receberam solução de OEO. Amostras congeladas apresentaram maior estabilidade dos parâmetros analisados, não sendo observadas alterações significativas ao longo dos 10 dias de estocagem.

Tabela 8 – Gráfico do pH de sururus *in natura* submetidos a diferentes tratamentos.

Tratamento ^a	Tempo de estocagem (dias)					
	0	2	4	6	8	10
1	7,50 ± 0,14 ^{Aa}	7,17 ± 0,15 ^{Ba}	7,05 ± 0,14 ^{BDa}	6,84 ± 0,03 ^{CDa}	6,77 ± 0,07 ^{CDa}	6,72 ± 0,04 ^{Ca}
2	7,50 ± 0,14 ^{Aa}	7,30 ± 0,17 ^{ABa}	7,15 ± 0,19 ^{ABa}	7,03 ± 0,20 ^{ABab}	6,99 ± 0,23 ^{ABab}	6,97 ± 0,22 ^{Bab}
3	7,50 ± 0,14 ^{Aa}	7,42 ± 0,11 ^{Ab}	7,30 ± 0,08 ^{ABa}	7,18 ± 0,04 ^{Bb}	7,16 ± 0,08 ^{Bb}	7,13 ± 0,11 ^{Bb}
4	7,50 ± 0,14 ^{Aa}	7,41 ± 0,13 ^{Aa}	7,40 ± 0,14 ^{Aa}	7,32 ± 0,12 ^{Ab}	7,26 ± 0,07 ^{Ab}	7,21 ± 0,03 ^{Ab}

Valores expressos em pH Médio ± DP. Diferentes letras significam diferença a 95% (teste de Tukey - $p < 0,05$), sendo a comparação feita entre letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas.

^a: 1: sem OEO; 2: solução com 0,7% de OEO; 3: solução com 1,4% de OEO; 4: sem OEO, congelado à -15°C.

Figura 12 – Gráfico do pH de sururus *in natura* submetidos a diferentes tratamentos

O pH do sururu, próximo a 7,0, pode prejudicar a ação do OE, já que segundo Juven *et al.* (1994), em pH neutro, o comportamento hidrofóbico do OE diminui, dificultando a dissolução do OE no lipídio da membrana celular da bactéria.

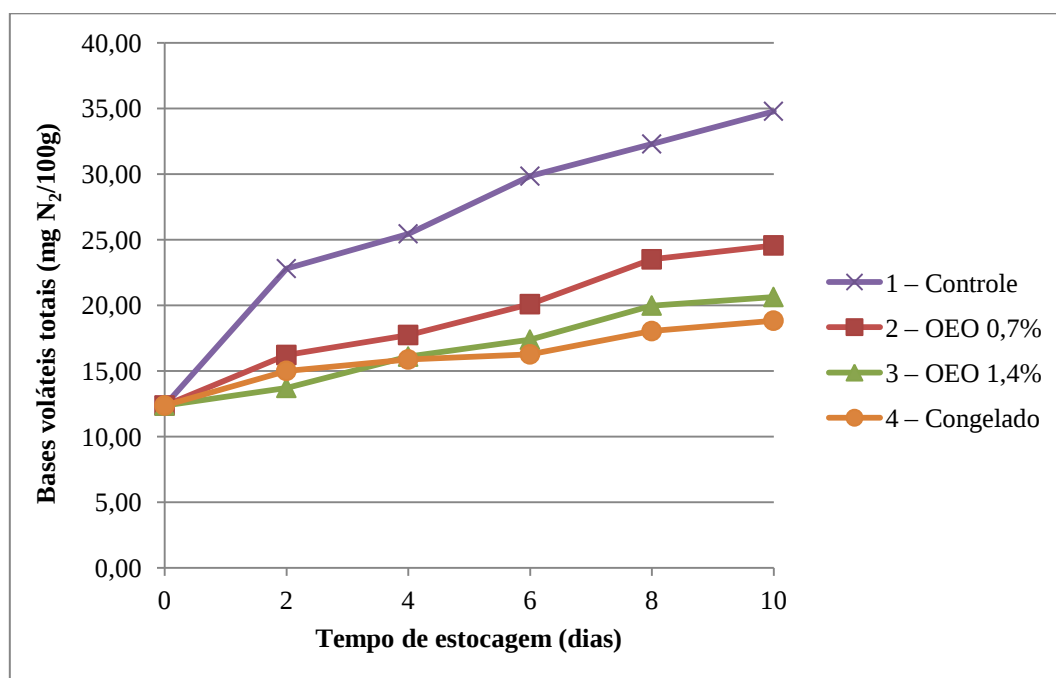
Tabela 9 - Teor de BVT em sururus *in natura* submetidos a diferentes tratamentos

Tratamento ^a	Tempo de estocagem (dias)					
	0	2	4	6	8	10
1	12,36 ± 3,63 ^{Aa}	22,79 ± 4,18 ^{ABa}	25,44 ± 3,75 ^{ABa}	29,84 ± 7,51 ^{ABa}	32,29 ± 8,43 ^{Ba}	34,78 ± 7,96 ^{Ba}
2	12,36 ± 3,63 ^{Aa}	16,21 ± 2,20 ^{Aab}	17,73 ± 3,22 ^{Aab}	20,08 ± 4,00 ^{Aab}	23,50 ± 6,51 ^{Aa}	24,56 ± 6,66 ^{Aab}
3	12,36 ± 3,63 ^{Aa}	13,71 ± 2,91 ^{ABb}	16,09 ± 2,88 ^{ABb}	17,38 ± 2,16 ^{ABb}	19,98 ± 2,58 ^{ABa}	20,63 ± 2,98 ^{Bb}
4	12,36 ± 3,63 ^{Aa}	15,00 ± 3,05 ^{Aab}	15,87 ± 2,94 ^{Ab}	16,26 ± 2,65 ^{Ab}	18,03 ± 3,06 ^{Aa}	18,83 ± 2,39 ^{Ab}

Valores expressos em Média ± DP mg N/100 g. Diferentes letras significam diferença a 95% (teste de Tukey - $p < 0,05$), sendo a comparação feita entre letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas.

^a: 1: sem OEO; 2: solução com 0,7% de OEO; 3: solução com 1,4% de OEO; 4: sem OEO, congelado à -15°C.

Figura 13 – Gráfico do teor de BVT em sururus in natura submetidos a diferentes tratamentos



Os parâmetros físico-químicos, pH e BVT demonstraram que a aplicação de solução de OEO a 1,4% foi capaz de retardar o processo de deterioração. Segundo Dalgaard (2000) a deterioração do pescado é provocada por bactérias deteriorantes específicas, como *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Brochothrix thermosphacta* e bactérias lácticas, que se desenvolvem mais rapidamente do que as demais bactérias e produzem metabólitos responsáveis pela rejeição sensorial do produto. Isso sugere que o OEO teria sido capaz de inibir tais bactérias, mesmo não sendo capaz de reduzir a contagem de bactérias de mesófilas totais. Ouattara *et al.* (2001) observaram aumento significativamente menor da contagem de bactérias aeróbias em camarões refrigerados que receberam solução de óleo essencial de tomilho e trans-cinamaldeído em relação ao controle.

Considerando a diversidade de componentes presentes em um OE, sua atividade não deve ser atribuída a apenas um mecanismo de ação. Mesmo um único componente, como o carvacrol, composto majoritário do OE estudado, ou seu isômero timol, possuem diversas formas de ação já elucidadas. Helander *et al.* (1998) demonstraram que o carvacrol e o timol são capazes de desintegrar a membrana externa de bactérias gram negativas. O carvacrol ainda provoca o esgotamento da reserva intracelular de

ATP e aumenta a permeabilidade da membrana citoplasmática para cátions, o que compromete processos essenciais da célula, causando a morte da bactéria (ULTEE *et al.*, 1999). Medidas da atividade antimicrobiana de compostos similares ao carvacrol mostraram que o grupo hidroxila deste composto e a presença de um sistema de deslocalização de elétrons são importantes para sua atividade. O cimeno, um precursor biológico do carvacrol, que não possui o grupo hidroxila, possui efeito menos pronunciado. Acredita-se que o carvacrol desestabilize a membrana citoplasmática, além de atuar como um permutador de prótons, assim reduzindo o gradiente de pH através da membrana citoplasmática, resultando em colapso da força motriz dos prótons e o esgotamento da reserva de ATP, o que eventualmente pode levar a célula à morte (ULTEE *et al.*, 2002). Pasqua *et al.* (2006) observaram que a presença em concentrações subletais de compostos como o carvacrol, timol, limoneno e outros, são capazes de provocar alteração na composição de ácidos graxos da membrana célula de bactérias como *E. coli* e *Salmonella*. Burt (2007) demonstrou que o carvacrol possui efeito sob a síntese proteica e inibe a formação de flagelo na bactéria *E. coli* O157:H7, prejudicando sua motilidade.

Não são encontrados dados na literatura sobre o mecanismo de ação do *m*-cimeno, no entanto, há estudos como o de Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn (2010), que testou o carvacrol e o cimeno contra o *Vibrio cholerae* em suco de cenoura. O cimeno não apresentou atividade sozinho, mas potencializou a ação do carvacrol, ou seja, apresentou efeito sinérgico em ensaios *in vitro* e no alimento. Segundo Ultee *et al.* (2002), o gradiente de pH e reserva de ATP da célula não são afetados pelo cimeno, mas ele é capaz de expandir a membrana celular, no entanto seu efeito é menos pronunciado que o do carvacrol. Dessa forma ele a desestabiliza, o que pode justificar sua ação sinérgica com o carvacrol.

Para o 1-octen-3-ol, não são encontrados na literatura dados relativos à sua atividade antibacteriana. No entanto Zhao *et al.* (2011) e Chitarra *et al.* (2005) relataram forte atividade fungicida, inseticida e herbicida para o 1-octen-3-ol.

5.4 Composição química do sururu

A Tabela 10 mostra os teores médios encontrados de umidade, proteína, cinzas, lipídios e carboidratos do sururu. Também apresenta o intervalo de confiança das determinações, calculado ao nível de probabilidade de 95% utilizando o teste t de Student (SKOOG, 2007). Foram obtidos resultados coerentes com a composição relatada por LEMOS, 1989.

Tabela 10 – Composição química do sururu fresco em porcentagem

Componente	Teor médio* (%)	Referência (LEMOS, 1989)
Umidade	70,68 ± 0,258	76,67
Proteína	24,72 ± 0,539	20,05
Cinzas	2,74 ± 0,137	3,19
Lipídios	1,35 ± 0,300	0,99
Carboidratos	0,51**	Não determinado
* Média ± IC / ** IC não calculado por que o teor de carboidrato é determinado teoricamente		

O dados de composição química do sururu nos permite interpretar as possíveis interações entre o alimento e o OE aplicado. Se o alimento tem alto teor de lipídio, o OE se dissolve na fase lipídica do alimento, tornando-se menos disponível para atuar contra as bactérias presentes na fase aquosa (MEJLHOLM; DALGAARD, 2002), portanto neste aspecto o sururu é beneficiado, pois possui apenas 1,35% de gordura. Burt, 2004 afirma que altas concentrações de proteína no alimento protegeriam a bactéria da ação do OE. Pot *et al.* (2001), observaram que uma reação entre carvacrol e proteínas seria um fator limitante na atividade do OE contra *Bacillus cereus* em leite. Porém em um estudo mais recente, Gutierrez *et al.* (2008) demonstraram que OEs podem ser mais efetivos contra patógenos de origem alimentar quando aplicados em meios com alto teor de proteína. O mesmo estudo corrobora demais autores que afirmam que baixo teor de lipídio e o baixo pH aumentariam a eficácia da ação do OE. Dessa forma o sururu sofre mais com os efeitos negativos de suas características em relação à eficácia da ação do OEO contra as bactérias, haja vista a necessidade de aplicação de uma concentração bastante alta de OEO, em relação à CIM, para a obtenção de resultados satisfatórios. Este fato sugere que o uso de outros métodos, como a redução do pH, em conjunto com

a aplicação do OE possibilite o uso de concentrações menores. Skandamis e Nychas (2000), conseguiram eliminar o crescimento de *E. coli* em salada de berinjela que receberam inóculo de aproximadamente 7 log UFC/g. Neste experimento, a salada de berinjela, estocada à 5°C, com pH 4,0, não apresentou contagem de *E. coli*, após quatro dias de estocagem quando receberam solução de OEO a 1,4%, porém somente após 16 dias de estocagem a contagem de *E. coli* foi eliminada, quando receberam solução de OEO a 0,7%. Com a aplicação de 0,05% de OEO, Mejlholm e Dalgaard (2002) conseguiram reduzir o crescimento da bactéria deteriorante *Photobacterium phosphoreum* em filés de bacalhau em embalagens com atmosfera modificada, refrigerados à 2°C, aumentando a vida de prateleira de 11 a 12 dias para 21 a 26 dias.

A aplicação de OEO ao sururu pode ainda trazer impactos importantes para o aspecto sensorial. O processo de cozimento antes do consumo pode reduzir esse impacto, reduzindo a percepção da presença do OEO (SKADAMIS; NYCHAS, 2001). Diversos estudos têm mostrado que a aceitação do alimento parece ser inversamente proporcional à concentração de OE aplicada. Concentrações próximas ou acima de 1% são perceptíveis a provadores treinados e prejudicam a aceitação do produto (OUTTARA *et al.*, 2001; SOLOMAKOS *et al.*, 2008; BUSATTA *et al.*, 2008), apesar de que, ao longo da vida de prateleira do alimento a presença do OE pode afetar positivamente a qualidade sensorial do alimento por retardar o processo de deterioração (SKADAMIS; NYCHAS, 2001). Por isso a aplicação do OEO conjugada à métodos de conservação coadjuvantes, como redução de pH, adição de NaCl, embalagem com atmosfera modificada ou mesmo o congelamento, é sugerida visando a aplicação de concentrações menores de OEO, o que resultaria em maior período de estabilidade e menor impacto na qualidade sensorial do sururu.

6. CONCLUSÕES

A utilização de um procedimento tradicional de extração e a utilização de orégano de fonte confiável resultou em um rendimento satisfatório e um óleo essencial que apresentou características físicas e químicas esperadas quando se utiliza a espécie *Origanum vulgare* como fonte.

A técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas se mostrou adequada e eficaz para identificação dos componentes do óleo essencial, permitindo a identificação de todos componentes foram identificados com índices de certeza superiores a 85%.

A identificação do carvacrol como componente majoritário (45,74%) do óleo essencial obtido permitiu se determinar as concentrações que foram utilizadas nas aplicações feitas neste trabalho em função de dados disponíveis na literatura de concentração inibitória mínima (CIM) deste componente. A utilização desse dado como referência é mais confiável do que utilização de dados de MIC para o óleo essencial de orégano, uma vez que este pode apresentar composição variável em função de diversos fatores já mencionados. A atividade do OEO pode ser atribuída principalmente ao seu componente majoritário o carvacrol, o qual possui reconhecida atividade bactericida, além do segundo componente, o *m*-cimeno, que pode apresentar ação sinérgica com o carvacrol.

Encontram-se na literatura diversos trabalhos relatando testes de aplicação de óleos essenciais como conservadores de alimentos, porém não há uma metodologia padronizada. O método de aplicação varia conforme a matriz alimentícia utilizada e os parâmetros analisados. Portanto esse trabalho está gerando conhecimento a respeito da técnica de aplicação de óleo essencial em mariscos, bem como a avaliação de sua eficácia.

A determinação da composição química do sururu gera conhecimento sobre essa matéria prima regional pouco estudada além de contribuir para a interpretação da eficácia do óleo essencial de orégano como um conservante para essa matriz alimentícia.

Esse estudo apresenta a aplicação de um agente antimicrobiano natural como uma alternativa para a conservação de sururus *in natura*. A comparação do tratamento entre o OEO e o congelamento, mostra que o OEO é capaz de inibir deterioração do sururu de forma semelhante ao congelamento e apresenta a vantagem de conseguir eliminar a contagem da bactéria *E. coli*. O estudo confirma o grande potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano.

No entanto as características intrínsecas do sururu estão relacionadas ao requerimento de uma alta concentração de OEO para se atingir uma atividade satisfatória. Isso nos leva a sugerir que o uso de métodos de conservação coadjuvantes visando à aplicação de concentrações menores de OEO, como por exemplo, a avaliação do efeito sinérgico entre a aplicação do OEO e o congelamento, o que poderia resultar em maior período de estabilidade, eliminação da bactéria *E. coli* e menor impacto na qualidade sensorial do sururu simultaneamente.

7. REFERÊNCIAS

ABDELSHAFEEK, K. A. *et al.* Investigation of the volatile oils, lipid constituents and biological activity of *Ballota andreuzziana*, *Teucrium zanonii* and *Verbena tenuisecta* in Libya. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, n. 3 (8), p. 594-601, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764510601459>>. Acesso em: 07 nov. 2013.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy**. Illinois: Allured, p. 70-277, 1995.

AFOULOUS, S. *et al.* Chemical composition and anticancer, antiinflammatory, antioxidant and antimalarial activities of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*. **Food and Chemical Toxicology**, n. 56, p. 352-362, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691513001166>>. Acesso em 07 nov. 2013.

ANWAR, F. *et al.* Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, n. 108, p. 986-995, 2008. Disponível em: <<http://www.aseanfood.info/Articles/11023219.pdf>>. Acesso em: 20 mai. 2012.

ARCHER, D. L. Freezing: an underutilized food safety technology? **International Journal of Food Microbiology**, n. 90, p. 127-138, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503002150>>. Acesso em: 18 jun. 2013.

BISHT, D. *et al.* Variability in essential oil and bioactive chiral monoterpenoid compositions of Indian oregano (*Origanum vulgare* L.) populations from northwestern Himalaya and their chemotaxonomy. **Industrial Crops and Products**, n. 30 (3), 2009, p. 422-426. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669009001277>>. Acesso em 07 nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 185, de 13 de maio 1997. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado)**. Disponível em: <<http://www.defesaagropecuaria.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=670>>. Acesso em: 20 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho de 1999. **Métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes: sal e salmoura**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2855>>. Acesso em: 28 jan. 2013.

BRASIL. RDC 360 de 23 de dezembro de 2003; **Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados**. Disponível em: <

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c2998004bc50d62a671ffbc0f9d5b29/RDC_N_360_DE_23_DE_DEZEMBRO_DE_2003.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 30 nov. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007; **Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9a67750047457f218ac0de3fbc4c6735/RDC_2_2007.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 15 out. 2013.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, n. 94, p. 223–253, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160504001680>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

BURT, S. A. **Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food**. 2007. 136p. Tese de Doutorado. Utrecht University, Utrecht, Holanda. Disponível em: <<http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2007-1129-200539/full.pdf#page=7>>. Acesso em: 12 mai. 2012.

BUSATA, C. **Caracterização química e atividade antimicrobiana in vitro e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**. 2006. 94p. Dissertação de Mestrado. URI, Erechim, RS. Disponível em: <http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=25393>. Acesso em: 23 mai. 2012.

BUSATTA, C. *et al.* Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, n. 25, p. 207–211, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S074000200700086X>>. Acesso em: 07 mar. 2013.

CASTRO, M. D. L.; GÁMIZ-GRACIA L. Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. **Talanta**, n.51, p. 1179-1185, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914000002940>>. Acesso em: 04 abr. 2012.

CHITARRA, G. S. *et al.* 1-Octen-3-ol inhibits conidia germination of *Penicillium paneum* despite of mild effects on membrane permeability, respiration, intracellular pH, and changes the protein composition. **FEMS Microbiology Ecology**, n. 54 (1), p. 67-75, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016864960500067X>>. Acesso em: 03 nov. 2013.

COMBET, E. *et al.* Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties, analysis, and biosynthesis. **Mycoscience**, n. 47 (6), p. 317-326, 2006. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1340354006703783>>. Acesso em: 03 nov. 2013.

CROXEN, M. A. e FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, n. 8, p. 26-38, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n1/pdf/nrmicro2265.pdf>>. Acesso em: 17 dez. 2013.

DALGAARD, P. **Freshness, quality and safety in seafoods**. Flair-Flow Europe Technical Manual (2000) F-FE 380A/00. Disponível em: <<http://seafood.ucdavis.edu/pubs/qualitysafety.doc>>. Acesso em: 18 out. 2012.

D'ANTUONO, L. F.; GALLETTI, G. C.; BOCCHINI, P. Variability of Essential Oil Content and Composition of *Origanum vulgare* L. Populations from a North Mediterranean Area (Liguria Region, Northern Italy). **Annals of Botany**, n. 86, p. 471-478, 2000. Disponível em: <http://aob.oxfordjournals.org/content/86/3/471.full.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2013.

DIGIROLAMO, R.; LISTON, J.; MATCHES, J. The Effects of Freezing on the Survival of Salmonella and E. coli in Pacific Oysters. **Journal of Food Science**, n. 35, p. 13-16, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1970.tb12357.x/abstract>>. Acesso em: 06 ago. 2013,

DI PASQUA, R. *et al.* Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 54, p. 2745-2749, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569070>>. Acesso em: 30 jul. 2013.

CHEVALLIER, A. **The Encyclopedia of Medicinal Plants**. New York: DK Publishing Book, 1996. 366p.

EIKANI, M. H.; GOLMOHAMMAD, F.; ROWSHANZAMIR, S. Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.). **Journal of Food Engineering**, n. 80(2), p. 735-740, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877406004237>. Acesso em: 15 out. 2013.

ESTATCAMP. Programa de análise estatística Action versão 2.5.197.344. Portal Action, 2013. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/>>. Acesso em 14 mai. 2013.

FAE. Fundação de Assistência ao Estudante. **Manual técnico de controle de qualidade**: para Análise Físico-Química. Brasília, p. 135-137, 1995.

FOGAÇA, F. H. S. *et al.* **Métodos para Análise de Pescados**. Teresina: EMBRAPA Meio Norte, p. 26-27, 2009. Disponível em: <http://www.cpamn.embrapa.br/publicacoes/new/documentos/doc_pdf/documento_189.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2013.

FORNARI, T. *et al.* Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography A**, n. 1250 (10), p. 34-48, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967312006437>>. Acesso em: 07 nov. 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 182p.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiología de los alimentos**. 4 ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1993. 658p.

FURLAN, E. F., *et al.* Estabilidade físico-química e mercado do mexilhão (*Perna perna*) cultivado em Ubatuba – SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 27, p. 516-523, 2007. Disponível em: < www.scielo.br/pdf/cta/v27n3/a15v27n3.pdf>. Acesso em: 9 mai. 2012.

GÁMIZ-GRACIA L.; CASTRO, M.D. L. Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques **Talanta**. n. 51(6), p. 1179-1185, 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914000002940>. Acesso em: 15 out. 2013.

GRAM, L.; DALGAARD, P. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. **Current Opinion in Biotechnology**, n. 13, p. 262–266, 2002. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166902003099>>. Acesso em: 28 mai. 2012.

GRAM L. **Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages - Food Microbiology and Food Safety, Microbiological Spoilage of Fish and Seafood Products**. Springer-Verlag New York. p. 87-119, 2010.

HEIR, E., *et al.* Effects of post-processing treatments on sensory quality and Shiga toxigenic *Escherichia coli* reductions in dry-fermented sausages. **Meat Science**, n. 94, p. 47-54, 2013. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174013000107>>.

HELANDER, I.M., *et al.* Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** n. 46, p. 3590–3595, 1998. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf980154m>>. Acesso em: 13 jul. 2013.

IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 98-1020, 2008.

ICMSF. **Micro-organismos de los alimentos 2 - Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas**. 2 ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1999. 260p.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JORDÁN, M. J. *et al.* Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L essential oil and its polyphenolic extract. **Industrial Crops and Products**, n. 48, p. 144-152, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092666901300191X>>. Acesso em: 05 nov. 2013.

JUVEN, B.J., *et al.* Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 76, p. 626– 631, 1994.

KAPER, J. B.; NATARO J. P.; MOBLEY H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, 2, 123-140, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n2/full/nrmicro818.html>>. Acesso em: 23 mai. 2013.

KHAJEH M., *et al.* Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. **Food Chemistry**, n. 86 (4), p. 587-591, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460300534X>. Acesso em: 15 out. 2013.

KLOUCEK, P. *et al.* Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. **Food Research International**. Vol. 47, p. 161-165, jul 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911002791>>. Acesso em: 20 out. 2012.

KOKKINI, S. *et al.* Autumn essential oils of Greek oregano. **Phytochemistry**, n. 44 (5), p. 883–886, 1997.

KOUTSOUMANIS, K. *et al.* A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. **International journal of food microbiology**, n. 49, p. 63-74, 1999. Disponível em: < http://smas.chemeng.ntua.gr/miram/files/publ_83_13_1_2004.pdf>. Acesso em: 4 mai. 2012.

LAMBERT, R. J. W. *et al.* A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, n. 91, p. 453-462, 2001.

LARRAÍNZAR, M. G. *et al.* Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. **Food Control**, n. 26, p. 555-563, 2012. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512001077>>. Acesso em: 03 set. 2012.

LEMOS, *et al.* **Enlatamento do Sururu** (*Mytella falcata* d'Orbigny 1846) ocorrente no litoral maranhense utilizando salmoura como líquido de cobertura. São Luís: Ed UFMA / Imprensa Universitária, 1989. 26p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

MARRIOTT, P. J. *et al.* Review: Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. **Journal of Chromatography A**, n. 936, p. 1-22, 2001. Disponível em: <<http://144.206.159.178/FT/553/46503/828309.pdf>>. Acesso em: 12 mai. 2012.

MEJHOLM, O.; DALGAARD, P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. **Letters in Applied Microbiology**, n.34, p. 27-31, 2002. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11849488>. Acesso em: 20 mai. 2012.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). **Food Chemistry**, n. 71 (1), p. 79-83, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814600001448>>. Acesso em: 07 nov. 2013.

MURCHIE, L. W. *et al.* High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, n. 6, p. 257–270, 2005.

NASCIMENTO, A. R. **Resistência de cepas de *Vibrio cholerae* O1 inoculadas em camarão *Penaeus schimitti* BURKENROAD, com e sem carapaça, submetido às temperaturas de congelamento e ebulição**. 1996. 88p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

NASCIMENTO, A. R. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a bactérias isoladas de sururu (*Mytella falcata*)**. 2004. 104p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NIST **Chemistry Webbook**: Base de dados de referência do National Institute of Standards and Technology, 2011. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. Acesso em: 11 abr. 2013.

NYCHAS, G. J. E.; SKANDAMIS, P. N. Development and Evaluation of a Model Predicting the Survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in Homemade Eggplant Salad at Various Temperatures, pHs, and Oregano Essential Oil Concentrations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.4, p. 1646-1653, abr. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92036/pdf/am001646.pdf>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

OUATTARA, B.; SABATO, S.F.; LACROIX, M. Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp (*Penaeus* spp.). **International Journal of Food Microbiology**, n. 68, p. 1–9, 2001.

PEREIRA, A. A. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos**. 58p. 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. Disponível em: <http://www.laszlo.ind.br/admin/artigos/arquivos/efeito_inibitorio_de_oleos_essenciais_sobre_o_crescimento_de_bacterias_e_fungos.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2012.

POL, I.E. *et al.* Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. **Journal of Food Protection**, n. 64 (7), p. 1012–1018, 2001.

POLICEGOUDRA, R.S. *et al.* Bioactive constituents of *Homalomena aromatica* essential oil and its antifungal activity against dermatophytes and yeasts. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, n. 22 (1), p. 83-87, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1156523311001211>>. Acesso em: 07 nov. 2013.

RAMOS, M. F. S. *et al.* Óleos Essenciais: potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília**, v.3, n. 16, p. 38-43, set./out. 2000. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio16/16_oleos.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2012.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, n. 110 (5), p. 614-619, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172310002203>>. Acesso em 03 nov. 2013.

RIVAS, E. O. **Processing Effects on Safety and Quality of Foods - Contemporary Food Engineering**. CRC Press: 2010. 594p.

RODRIGUES, M. R. A. **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano**. 2002. 163p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/17511>>. Acesso em: 10 mai. 2012.

RUSSO, A. *et al.* Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. **Food and Chemical Toxicology**, n. 55, p. 42-47, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027869151200909X>>. Acesso em: 05 nov. 2013.

SAHIN, F. *et al.* Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, n. 15, p. 549–557, 2004.

SANTOS, N. S. T. *et al.* Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). **Food Microbiology**, n. 32, p. 345-353, 2012.

SARTORATTO, A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 35, p. 275-280, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822004000300001&script=sci_arttext>. Acesso em 30 jun. 2012.

SILVERSTEIN, R. M. WEBSTER, F. X. KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. Ed. New York, NY: LTC, 2007. 299p.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade, 1999. 821p.

SINGH, F. V.; KUMAR, A.; GOEL, A. Synthesis of o,m-cymene-cored biaryls through a carbanion-induced ring transformation strategy, **Tetrahedron Letters**, n. 47 (44), p. 7767-7770, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403906017230>>. Acesso em: 07 nov. 2013.

SKANDAMIS, P.N.; NYCHAS, G.-J.E. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. **Journal of Applied Microbiology**, n. 91, p. 1011–1022, 2001. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2001.01467.x/pdf>. Acesso em: 22 mai. 2013.

SKOOG, Douglas A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Thomsom Learning, 2007. p. 135-137.

SIVROPOULOU, A. *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 44, p. 1202–1205, 1996. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf001494m>>. Acesso em: 17 abr. 2012.

SOLOMAKOS, N. *et al.* The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. **Food Microbiology**, n. 25, p. 120–127, 2008. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002007000858>>. Acesso em: 09 mai. 2012.

SOUZA, E. L. **Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.): uma abordagem para o uso em alimentos**. 141p. 2006. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE. Disponível em: <<http://www.openthesis.org/documents/Potencial-antimicrobiano-do-essencial-de-320989.html>>. Acesso em: 10 mai. 2012.

TOMA, B.; BARICEVIC, D. **The Design Life of Structures: The biological/pharmacological activity of the *Origanum* Genus**. Edited by G. Somerville, 2002. doi: 10.4324/9780203168875.ch8.

TSIGARIDA, E. *et al.* Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. **Journal of Applied Microbiology**, n.89, p. 901-909, 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2000.01170.x/pdf>>. Acesso em: 8 mai. 2012.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 65 (10), p. 4606–4610, 1999. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/65/10/4606.short>>. Acesso em 18 jun. 2013.

ULTEE, A.; BENNINK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 68 (4), p. 1561–1568, 2002. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/68/4/1561.short>>. Acesso em 18 jun. 2013.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 Ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

VIEIRA, C.; DIAZ, M. Y.; MARTÍNEZ, B.; GARCÍA-CACHÁN, M. D. Effect of frozen storage conditions (temperature and length of storage) on microbial and sensory quality of rustic crossbred beef at different stages of aging. **Meat Science**, n. 83, p. 398–404, 2009.

WILLIAMS, D.G. **The Chemistry of Essential Oils: An Introduction for Aromatherapists, Beauticians, Retailers and Students**. Weymouth: Micelle Press, 1996. 334p.

WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J. CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, n. 105, p. 940-949, 2007. Disponível em: <http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/553/dzi/www/data/13_anti.pdf>. Acesso em: 06 abr. 2012.

ZHAO, L. *et al.* Antifungal, Insecticidal and Herbicidal Properties of Volatile Components from *Paenibacillus polymyxa* Strain BMP-11. **Agricultural Sciences in China**, n. 10 (5), p. 728-736, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1671292711600564>>. Acesso em: 03 nov. 2013.