UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de pós-graduação em Ciência de Alimentos
Área de Bromatologia

**Avaliação da ação de antimicrobianos naturais no controle de
Salmonella Enteritidis em salada de legumes com maionese**

Janine Passos Lima da Silva

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

579.344

S586a

Silva, Janine Passos Lima da

Avaliação da ação de antimicrobianos naturais no controle de Salmonella Enteritidis em salada de legumes com maionese / Janine Passos Lima da Silva. – São Paulo, 2007.

90 p.; 29 cm.

Tese (pós graduação em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2007. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Orientadora: Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo

1. Antimicrobiano. 2. Conservação de alimentos. 3. Controle de microrganismos.

I. Título.

JANINE PASSOS LIMA DA SILVA

Avaliação da ação de antimicrobianos naturais no controle de *Salmonella* Enteritidis em
salada de legumes com maionese

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
Orientador / presidente

1° examinador

2° examinador

3° examinador

4° examinador

São Paulo, _____ de 2007.

DEDICATÓRIA

Dedico esta pesquisa a dois grandes amores: Otávio e
Bruno que resolveu chegar antes do fim da festa!

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a minha orientadora, Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, uma pessoa completamente maravilhosa! Bernadette: agradeço todo o conhecimento que você me passou, todo carinho e atenção que você me deu, apoio nas vezes em que chorei de cansaço por causa dessa minha louca vida Rio-São Paulo e também quando eu descobri que estava grávida. Não me esquecerei das nossas viagens e de quando você ficou escondida atrás da pilastra para eu não ficar nervosa durante a minha apresentação oral no Colmic 2005, em Bogotá. Todos os momentos com você foram muito ricos!

Ao meu orientador do mestrado, Dr. Armando U. O. Sabaa-Srur, quero agradecer por ter plantado na minha cabeça a idéia de ser aluna da Bernadette e me encorajado a fazer a seleção para pós-graduação na FCF-USP.

À Profa. Dra. Mariza Landgraf por todo carinho e ensinamentos durante quatro anos e à Profa. Dra. Maria Teresa Destro pelas excelentes aulas de “Microrganismos Patogênicos I”!

Ao meu chefe Dr. Daniel Vidal Perez, gerente do LASP (Laboratório de Análise de Água, Solos e Plantas – EMBRAPA) que tornou mais fácil a minha vida no trabalho para eu terminar o doutorado e ainda me ajudou a fazer toda a análise estatística dos experimentos.

À Dra. Regina Célia Della Modesta, agradeço o carinho e a capacidade de tornar tudo claro e fácil, fazendo eu me sentir capaz de conduzir o teste de aceitabilidade da salada de maionese com óleo essencial de orégano. Também agradeço à Aline Leandro assistente de pesquisa no laboratório de Análise Sensorial da Embrapa e à Andressa, aluna da Regina.

Ao meu filho, Bruno, que se comportou muito bem, dentro da minha barriga, durante os finais de semana e feriados em que estivemos sozinhos no laboratório fazendo análise. Ao meu adorado esposo, Otávio, meu porto seguro, pelo apoio total e por aceitar me dividir com o doutorado por longos três anos, ficando dias sem mim, no Rio de Janeiro.

À minha madrinha Lourdes Masson que, por ser minha fã, me encoraja em demasia!

À minha *best friend* Dra. Eb Chiarini por absolutamente tudo e por estar sempre ao meu lado, mesmo quando estava fazendo doutorado sanduíche no Canadá.

A dois grandes amigos: Dr. Paulo S. Costa Sobrinho, “companheiro” de publicações em congressos, quem muito me ajudou a pensar nos meus experimentos e também conseguiu moradia no CRUSP para mim e Dr. Ricardo I. Sakate amigo especial para todas as horas!

Ao amigo André Gonçalves Dias que conseguiu os óleos essenciais de orégano e emulsificantes para fazer maionese, além de caronas do Rio de Janeiro para São Paulo. Também por ter algo em comum comigo: somos orientados dos mesmos orientadores tanto no mestrado como no doutorado!

A todas as pessoas com as quais eu dividi a moradia ou me cederam a casa para pernoitar: Jorge de Lima, Rodrigo Lopes, Alexandre Lobo, Cristina Durante, Andréia Regina e Cristian, Paulo Sobrinho, Renata Diório, Monika Kruger e D. Elza, Eb Chiarini e Cristian, Vanessa Bíscola, Marianne, Núbia, Jacqueline, Danielle e Ronaldo, Bernadette.

Ao mestre Gunnar Martin por abrir a sua casa para eu cozinhar para os amigos da pós-graduação com o frango das coletas da Eb!

À Lucia e Kátia que, em conjunto com nós alunos, cuidam muito bem do laboratório para desenvolvermos as nossas idéias e nos tornarmos mestres ou doutores.

Ao Jorge, à Elaine, Mônica, Tânia e Majô pelo carinho no atendimento e disponibilidade em ajudar com as papeladas da pós-graduação.

À Adriana Apuzzo, gerente da divisão *Food Protectants, Latin America*, DANISCO, que doou nisina para pesquisa.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e pelo financiamento do projeto.

*O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.*

*Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.*

(Fernando Pessoa)

SILVA, J. P. L. **Avaliação da ação de antimicrobianos naturais no controle de *Salmonella Enteritidis* em salada de legumes com maionese.** 2007. 90p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RESUMO

Salmonella Enteritidis (SE) é um enteropatógeno de grande preocupação para indústria de alimentos, principalmente de produtos que não podem ser submetidos a tratamento térmico, como as saladas à base de maionese, freqüentemente envolvidas em surtos de salmonelose. O uso de antimicrobianos naturais nesses produtos pode ser um método alternativo para o controle de SE. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antimicrobiano de óleo essencial de orégano, EDTA e nisina individualmente e a combinação de nisina com EDTA e nisina com óleo essencial de orégano no controle da multiplicação SE em salada de legumes com maionese. A atividade inibitória foi inicialmente avaliada *in vitro* e posteriormente em salada preparada com legumes, experimentalmente contaminados com SE, misturados à maionese, na concentração de 10^3 UFC/g, e armazenados em refrigeração (8°C) e em temperatura ambiente (30°C). Os resultados da avaliação *in vitro* indicaram que o OEO usado individualmente tem melhor efeito antimicrobiano contra SE do que quando empregado em combinação com nisina. Nem a nisina nem o EDTA, quando testados isoladamente ou combinados apresentaram efeito sobre SE. Na salada de legumes com maionese preparada artesanalmente, a presença de 0,2% de OEO resultou em redução na contagem de SE, constituindo-se em uma barreira adicional para a multiplicação do patógeno nesse produto. A análise sensorial da salada de legumes com maionese contendo 0,2% de OEO indicou que houve 95% de aceitação do aroma, 93% de aceitação do sabor e 74% de intenção de compra. A análise sensorial da maionese contendo 0,5% ou 1% de OEO indicou a inviabilidade de se

aumentar a concentração do OEO na maionese como alternativa para melhorar o efeito antimicrobiano.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis, óleo essencial de orégano, nisina, maionese, salada de legumes com maionese.

SILVA, J. P. L. **Evaluation of the activity of natural antimicrobials on the control of *Salmonella* Enteritidis in mayonnaise-based legume salad.** 2007. 93p. Thesis (PhD) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ABSTRACT

Salmonella Enteritidis (SE) is an enteropathogen relevant for the food industry, especially in foods that do not require heat treatment before consumption such as salads prepared with mayonnaise, frequently associated to outbreaks of salmonellosis. Natural antimicrobials can be used as an alternative procedure to control SE in these foods. The aim of the present study was to evaluate the effect of origanum essential oil (OEO), nisin and EDTA, used individually and in combination, on the growth of SE in mayonnaise and in mayonnaise-based legume salad. The inhibitory activity was evaluated *in vitro*, in home made mayonnaise and in mayonnaise-based legume salad experimentally contaminated with SE at 10^3 CFU/g, stored under refrigeration (8°C) and at room temperature (30°C). The results of the *in vitro* tests indicated that a better antimicrobial effect of OEO on SE was achieved when OEO was used individually than when used combined with nisin or EDTA. Nor nisin nor EDTA, used individually, presented any effect against SE. The presence of OEO in mayonnaise did not add any additional effect to the antimicrobial activity of the intrinsic parameters in this food. In mayonnaise-based legume salad, 0.2% of OEO caused a reduction in the counts of SE, and was an additional hurdle for the growth of the pathogen in this product. The sensorial testing of mayonnaise-based legume salad containing 0.2% OEO indicated an acceptance of 95% for the aroma and 93% for the taste and 74% of purchasing intention. The sensorial testing of mayonnaise containing 0.5% or 1% OEO indicated that the increase in the content of OEO to increase the antimicrobial activity is not feasible.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, origanum essential oil, nisin, mayonnaise, mayonnaise-based legume salad

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modo de ação de bacteriocinas de bactérias ácido lácticas (Cotter, Hill e Ross, 2005).....	30
Figura 2 - Diferenças na parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas (De Martinis, Alves e Franco, 2002).....	32
Figura 3 - Atividade inibitória de OEO das marcas A, B, C, D e E sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis a 30°C.....	47
Figura 4 - Efeito de OEO da marca C isolado ou em combinação com nisina 6,25ppm, 12,5ppm ou 25ppm sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis a 30°C.....	50
Figura 5 - Efeito de OEO da marca D isolado ou em combinação com nisina 6,25ppm, 12,5ppm ou 25ppm sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis a 30°C.....	50
Figura 6 - Efeito de OEO da marca E isolado ou em combinação com nisina 6,25ppm, 12,5ppm ou 25ppm sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis a 30°C.....	51
Figura 7 - Cromatogramas dos OEO das marcas A, B, C, D, E.....	55
Figura 8 - Composição química dos OEO das marcas A, B, C, D, E.....	56
Figura 9 - Sobrevivência de SE na maionese controle e na salada de legumes com maionese contendo 0,2% de óleo essencial de orégano, mantida a 8°C.....	61
Figura 10 - Sobrevivência de SE na maionese controle e na salada de legumes com maionese contendo 0,2% de óleo essencial de orégano, mantida a 30°C.....	62
Figura 11 - Aceitabilidade estratificada do aroma de maionese com 0% de óleo essencial de orégano.....	65
Figura 12 - Aceitabilidade estratificada do aroma de maionese com 0,5% de óleo essencial de orégano.....	65

Figura 13 - Aceitabilidade estratificada do aroma de maionese com 1% de óleo essencial de orégano.....	66
Figura 14 - Aceitabilidade do aroma de maionese com 0% de óleo essencial de orégano.....	66
Figura 15 - Aceitabilidade do aroma de maionese com 0,5% de óleo essencial de orégano	67
Figura 16 - Aceitabilidade do aroma de maionese com 1% de óleo essencial de orégano.....	67
Figura 17 - Aceitabilidade estratificada do sabor da maionese com 0% de óleo essencial de orégano	68
Figura 18 - Aceitabilidade estratificada do sabor da maionese com 0,5% de óleo essencial de orégano	68
Figura 19 - Aceitabilidade estratificada do sabor da maionese com 1,0% de óleo essencial de orégano.....	69
Figura 20 - Aceitabilidade do sabor de maionese com 0% de óleo essencial de orégano	69
Figura 21 - Aceitabilidade do sabor de maionese com 0,5% de óleo essencial de orégano	70
Figura 22 - Aceitabilidade do sabor de maionese com 1,0% de óleo essencial de orégano	70
Figura 23 – Aceitabilidade estratificada do aroma da maionese com 0,2% de óleo essencial de orégano	71
Figura 24 – Aceitabilidade do aroma da maionese com 0,2% de óleo essencial de orégano	72

Figura 25 – Aceitabilidade estratificada do sabor da maionese com 0,2% de óleo essencial de orégano.....	72
Figura 26 – Aceitabilidade do sabor da maionese com 0,2% de óleo essencial de orégano	73
Figura 27 – Intenção de compra da maionese com 0,2% de óleo essencial de orégano	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Bacteriocinas de bactérias ácido lácticas e suas principais características.....	28
Tabela 2 - Fórmula de maionese utilizada no experimento com OEO.....	42
Tabela 3 - Atividade inibitória de diferentes concentrações de óleo essencial de orégano (OEO) de cinco marcas (A, B, C, D e E) sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis a 30°C determinada pela técnica de difusão em poços.....	48
Tabela 4 - Atividade inibitória de diferentes marcas (C, D e E) de óleo essencial de orégano (OEO) combinado com nisina sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis determinada pela técnica de difusão em poços a 30°C.....	52
Tabela 5 - Efeito das diferentes marcas (C, D e E) de óleo essencial de orégano (OEO) combinado com nisina na atividade inibitória de OEO sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis determinada pela técnica de difusão em poços a 30°C.....	53
Tabela 6 – Efeito da combinação de óleo essencial de orégano (OEO) e nisina na atividade inibitória das diferentes marcas (C, D e E) de OEO sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis determinada pela técnica de difusão em poços a 30°C.....	53
Tabela 7 – Teor de carvacrol, γ -terpineno, p-cimeno e timol em óleo essencial de orégano de cinco diferentes marcas (A, B, C, D e E).....	57
Tabela 8 – pH das maioneses formuladas com quatro emulsificantes diferentes após 1 e 15 dias de armazenamento sob refrigeração.....	60
Tabela 9 - Médias das contagens de <i>Salmonella</i> Enteritidis na maionese controle e na salada de legumes com maionese contendo 0,2% de óleo essencial de orégano da marca E, mantida a 8°C.....	61

Tabela 10 - Médias das contagens de <i>Salmonella</i> Enteritidis na maionese controle e na salada de legumes com maionese contendo 0,2% de óleo essencial de orégano da marca E, mantida a 30°C.....	61
--	----

Tabela 11 – pH e Aa de maionese, maionese controle com salada de legumes e maionese 0,2% de OEO com salada de legumes a 8 ou a 30°C.....	63
---	----

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO. 10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	15
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. BACTERIOCINAS	24
1.2. ÓLEOS ESSENCIAIS	33
1.3 OBJETIVOS	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1. CULTURA MICROBIANA	40
2.2. AGENTES ANTIMICROBIANOS PESQUISADOS	40
2.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO <i>IN VITRO</i>	41
2.4. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (OEO) DAS MARCAS A, B, C, D, E	41
2.5. FORMULAÇÃO DE MAIONESE BASE CONTENDO AGENTES ANTIMICROBIANOS	42
2.6. DETERMINAÇÃO DO PH E DA ATIVIDADE DE ÁGUA (AA) DA MAIONESE BASE	43
2.7. AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS EM SALADA DE LEGUMES COM MAIONESE ADICIONADA DE OEO DURANTE ARMAZENAMENTO EM REFRIGERAÇÃO (8°C) E EM TEMPERATURA AMBIENTE (30°C)	43
2.8. ANÁLISE SENSORIAL: ACEITABILIDADE DA MAIONESE BASE E DA SALADA DE LEGUMES COM MAIONESE ADICIONADA DE OEO.	44
2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO <i>IN VITRO</i>	46

3.1.1. Ação individual	46
3.1.2. Ação combinada	49
3.1.2.1. Combinação de nisina e EDTA	49
3.1.2.2. Combinação de nisina e OEO	49
3.2. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DOS OEO POR CG-MS	55
3.3. SOBREVIVÊNCIA DE <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS EM SALADA DE LEGUMES COM MAIONESE DURANTE ARMAZENAMENTO EM REFRIGERAÇÃO (8°C) E EM TEMPERATURA AMBIENTE (30°C)	60
3.4. ANÁLISE SENSORIAL	65
3.4.1. Aceitabilidade da salada de legumes com maionese adicionada de OEO	71
3.4.2. Intenção de compra da maionese adicionada de OEO	74
4. CONCLUSÕES	75
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1. INTRODUÇÃO

Doença Transmitida por Alimentos (DTA) é causada pela ingestão de um alimento contaminado por um agente infeccioso ou pela toxina por ele produzida (BRASIL, 2001). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 30% das pessoas de países industrializados sofrem de DTA e somente no ano 2000 ao menos dois milhões de pessoas em todo o mundo morreram em decorrência de diarreia associada ou não à salmonelose (BURT, 2004).

A salmonelose, uma DTA causada pela ingestão das células de *Salmonella* sp., ocupa posição destacada no campo da saúde pública em todo o mundo pelas suas características de morbidade e, em particular, pela dificuldade de seu controle. Nos Estados Unidos, a salmonelose é a causa de cerca de 1,3 milhões de DTA, com aproximadamente 15 mil hospitalizações e 500 mortes por ano, ocupando 15,1% das incidências seguida por campylobacteriose (13,8%) e shigelose (6,4%) (ISAACS *et al.*, 2005; SAMPATHKUMAR; KHACHATOURIANS; KORBER, 2003; SCHROEDER *et al.*, 2005).

Salmonella enterica, subespécie *enterica*, sorovar Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis), uma bactéria móvel, não produtora de esporos, com morfologia de bacilo Gram negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae* é o enteropatógeno envolvido em grande parte dos surtos por salmonelose que tem como sintomas diarreia, febre, dores abdominais e vômitos (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Desde a década de 80, epidemias de DTA causadas por *Salmonella* Enteritidis (SE) estão associadas ao consumo de ovos, produtos com ovos e aves (ICMSF, 2005). O ovo é o veículo primário de SE e esteve envolvido em 80% dos surtos causados por esse microrganismo de 1985 a 1999, segundo o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) americano (BOONMAR *et al.*, 1998; RAJASHEKARA *et al.*, 2000; SCHROEDER *et al.*, 2005).

No Brasil, significativo aumento da incidência de casos de salmonelose por SE foi detectado a partir de 1993, tornando-se desde 1994, o sorovar de *Salmonella* mais freqüentemente isolado de casos de infecções por alimentos. Porém, durante muito tempo SE não foi considerada um patógeno de grande importância em alimentos por não estar envolvida em muitos surtos. Entre 1950 e 1990, a SE ocupava apenas a décima sexta posição no grupo de sorovares de *Salmonella* de origem humana isolados em São Paulo, quando predominavam os sorovares *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Typhi* e *S. Infantis* (TAUNAY *et al*, 1996), mas a partir de 1991 o isolamento de SE começou a se destacar, chegando a 64,9% dos sorovares isolados de fonte humana e 40,7% de fonte não humana, superando a *S. Typhimurium* em 1995 (TAVECHIO *et al.*, 1996). Segundo dados do Instituto Adolfo Lutz, SE correspondeu a 43,4% dos sorovares de *Salmonella* ssp. isolados de origem não humana (principalmente em aves e ovos) entre janeiro e junho de 1995. Dados do Centro de Vigilância Epidemiológica no Estado de São Paulo (CVE) indicam que o número de surtos provocados por *Salmonella* sp. em 2002 ficou em torno de 10,3% do total de surtos envolvendo bactérias em água e alimentos, sendo que 5,6% desses foram especificamente provocados por SE. Hoje SE se destaca como enteropatógeno envolvido na maioria dos surtos por salmonelose, tornando-se um problema para saúde pública em nosso país (CVE, 2007a).

Outros dados do CVE mostram que no ano 2000 houve 46 casos de DTA no Estado de São Paulo, envolvendo o consumo de ovos onde o agente etiológico era SE (CVE, 2000). De acordo com dados fornecidos pela Organização Pan-americana da Saúde (OPAS), 34 casos semelhantes foram relatados em outros Estados do Brasil entre 1996 e 2002 (OPAS, 2003).

Nas décadas de 80 e 90, há registros de infecção alimentar causada pela ingestão de Salada Ceasar com ovos contaminados com SE e um surto envolvendo 250.000 pessoas que foram infectadas ao consumirem sorvete do qual a pré-mistura havia sido transportada em caminhão tanque que anteriormente transportou ovos líquidos não pasteurizados também

contaminados por SE, evidenciando contaminação cruzada, ambos nos Estados Unidos (PASCUAL, *et al.* 1999).

Os ovos podem ser contaminados por SE de duas formas: através de infecção transovariana, ou seja, a partir dos ovários ou ovidutos durante o seu desenvolvimento ou mais tarde como resultado da penetração pela casca, a qual é contaminada por microrganismos do intestino quando os ovos passam através da cloaca ou quando entram em contato com o material do ninho. Na maioria das vezes, as granjas não realizam desinfecção da casca dos ovos e quando limpam a casca, o fazem com água fria, sem desinfetantes (KUBO; FUJITA, 2001). O Serviço de Inspeção Federal (SIF) recomenda que a água de lavagem de ovos em natureza seja mantida em temperaturas de 35° à 45°C, observando-se que a temperatura da água deve ser pelo menos 10°C superior continuamente. Também é permitida a utilização de um sanitizante na água de lavagem específico para a lavagem de ovos desde que compostos de cloro não atinjam níveis superiores a 50 ppm. Rachaduras na casca dos ovos permitem a penetração de salmonelas e o nível de penetração está relacionado com as condições de tempo e temperatura de armazenagem. Estocagens prolongadas em temperaturas entre 18 e 30°C favorecem a multiplicação da bactéria no interior dos ovos (BRADSHAW; SHAH; FORNEY, 1990; HOFER; SILVA FILHO; REIS, 1998; ICMSF, 2005).

A maionese é um produto a base de ovos com destaque nos surtos de toxinfecção alimentar, uma vez que é consumida em grande escala porque faz parte da confecção de saladas, molhos e outros pratos. Existe uma grande variedade de maioneses comerciais, mas muitas donas de casa e cozinhas industriais ainda preferem preparar a sua própria maionese e assim a maionese caseira tem sido associada a surtos de DTA com *Salmonella*, *S. aureus*, *Bacillus*, *Campylobacter* e outras bactérias o que desencadeia muitas pesquisas sobre o controle da multiplicação de microrganismos na maionese (XIONG *et al.*, 2002).

A maionese comercial é uma emulsão preparada com 50 a 85% de óleo vegetal disperso em fase aquosa contendo vinagre (ou ácido acético) que provoca o abaixamento do pH, sendo estabilizada pelos glicerofosfolipídios, lipoproteínas e proteínas existentes na gema do ovo (5 a 10%) que funciona como emulsificante. O processamento em baixas temperaturas (de 4 a 10°C) também ajuda a estabilizar a emulsão (CNNPA, 1978). A multiplicação dos microrganismos é determinada pelo pH da maionese, tipo e concentração do acidulante, tempo e temperatura de estocagem. A fase aquosa com pH inferior a 4,1 garante a segurança microbiológica, mas ainda assim o risco de contaminação por *Salmonella* sp. só diminui com o uso de ovo pasteurizado. Outros ingredientes com atividade antimicrobiana como sal, alho, açúcar e mostarda também contribuem para maionese ser considerada um produto seguro. No entanto, a maionese passa a ser um problema para a Saúde Pública a partir do momento em que ela é misturada com outros ingredientes para confecção de saladas porque o pH aumenta e, geralmente, essas saladas não são acondicionadas em temperaturas adequadas (XIONG *et al.*, 2002).

Dados da OPAS de 2003, último ano em que a organização disponibilizou para consulta *on-line* dados sobre ocorrência de surtos de origem alimentar na América Latina e Caribe, revelam que entre 1996 e 2002 ocorreram 8278 casos de salmonelose no Brasil provocada por maionese, dos quais 82 casos foram provocados pela SE (OPAS, 2003). Esses dados divergem de casos registrados pelo CVE no Estado de São Paulo, o que deixa transparecer a fragilidade do sistema de registro de DTA em vários Estados no Brasil. Em um único ano, 2002, o CVE informa a ocorrência de 217 casos de salmonelose envolvendo maionese, dos quais 167 casos tinham SE como agente etiológico, ocorrendo o mesmo para 128 casos no ano 2000, valores bastante superiores àqueles 82 casos informados pela OPAS num período de sete anos (CVE, 2007b).

Várias pesquisas associadas ao controle de SE em alimentos têm sido desenvolvidas em escala laboratorial e algumas delas já aplicadas em nível de produção industrial para garantir a segurança alimentar. SE pode ser destruída através de tratamento térmico, mas geralmente saladas com maionese não são submetidas ao calor. Isso gera necessidade do uso de outros métodos para redução ou eliminação do patógeno, dentro do conceito de tecnologia de barreiras múltiplas (BURT; REINDERS, 2003; BURT, 2004; LEISTNER, 2000; SCHROEDER *et al.*, 2005).

A tecnologia de barreiras múltiplas pode ser definida como a aplicação de medidas combinadas de conservação para aumentar a estabilidade microbiológica e a qualidade sensorial de um alimento, bem como suas propriedades nutricionais e econômicas. As barreiras mais comumente usadas na conservação de alimentos são temperatura como fator extrínseco e atividade de água (Aa), acidez (pH), potencial redox, conservadores químicos e microrganismos competidores como bactérias ácido lácticas (BAL) como fatores intrínsecos. Em alimentos refrigerados, por exemplo, a temperatura é o maior obstáculo e em alguns casos, o único. Ocorrendo abuso de temperatura na distribuição e conservação desses produtos, esse obstáculo é quebrado podendo haver multiplicação microbiana no alimento. Por isso é recomendada a aplicação de barreiras adicionais para prevenir a multiplicação de microrganismos em alimentos resfriados, como o uso de antimicrobianos naturais (DE MARTINIS; FRANCO, 1997; LEISTNER, 1999; LEISTNER, 2000; LIN; LABBE; SHETTY, 2004).

Os antimicrobianos são isolados de várias fontes incluindo plantas, animais e produtos animais e microrganismos. A expressão da atividade antimicrobiana é freqüentemente muito clara, mas o mecanismo de ação de alguns antimicrobianos naturais usados em alimentos ainda não está completamente elucidado. Segundo Katzung (1995), os antimicrobianos podem agir sobre os microrganismos de quatro formas diferentes: inibição da síntese da parede

celular; alteração da permeabilidade da membrana celular ou do transporte ativo através da membrana celular; inibição da síntese de proteínas (inibição da tradução e transcrição do material genético) e inibição da síntese de ácido nucleico. Porém, muitos desses antimicrobianos têm o espectro de ação limitado por causa da alta especificidade ou porque são ativos somente em altas concentrações. Contudo, bacteriocinas e óleos essenciais de plantas são exemplos de antimicrobianos naturais que foram pesquisados para serem aplicados em alimentos. (BRANEN; DAVIDSON, 2000).

1.1. BACTERIOCINAS

Bacteriocinas são, por definição, peptídeos ou proteínas sintetizadas por bactérias capazes de inibir o desenvolvimento de outras bactérias, não sendo letais para as células que as produzem. Geralmente a produção de bacteriocinas é uma característica genética de BAL (COTTER; HILL; ROSS, 2005; DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

As BAL compreendem um grupo amplo de microrganismos que apresentam diversas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. São microrganismos Gram positivos, não formadores de esporos, anaeróbios, aerotolerantes, fastidiosos, ácido tolerantes, com metabolismo estritamente fermentativo, apresentando o ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

O ácido láctico e outros produtos do metabolismo de BAL, incluindo peróxido de hidrogênio, diacetil, acetoína e outros ácidos orgânicos, agem como bioconservadores porque alteram os fatores intrínsecos dos alimentos interferindo na multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas. Os mecanismos utilizados podem ser: competição por oxigênio, competição por sítios de ligação e produção de substâncias antagonísticas, especialmente bacteriocinas. A produção de bacteriocinas tem sido verificada em BAL associadas a

alimentos, incluindo representantes dos gêneros *Lactococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Lactobacillus* spp e *Pediococcus* spp entre outros (DEEGAN *et al.*, 2006; DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002; ROSA; FRANCO; MONTVILLE, 2002).

As bacteriocinas de BAL investigadas até o momento diferem em seus espectros de atividade, características bioquímicas e determinantes genéticos, gerando várias propostas de classificação. Inicialmente, as bacteriocinas eram classificadas em quatro classes (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002; KLAENHAMMER, 1993):

Classe I: lantibióticos são pequenos peptídeos (<5kDa), que contém aminoácidos incomuns como dehidroalanina, dehidrobutirina, lantionina β -metil-lantionina. Exemplos: nisina, lactacina 481, carnocina UI49 e lactocina S.

Classe II: pequenos peptídeos (<10 kDa) hidrofóbicos, termoestáveis e que não contêm lantionina. As bacteriocinas maduras dessa classe formam hélices anfifílicas com hidrofobicidade variável, estrutura de β -folha e estabilidade térmica moderada (100°C) a alta (121°C). Dentro dessa classe podem ser definidas três subclasses:

IIa: Peptídeos ativos contra *Listeria*, com uma sequência N-terminal comum, composta por -Tir-Gli-Asn-Gli-Val-Xaa-Cis. Exemplos: pediocina PA-1, sakacinas A e P, leucocina A, bavaricina MN e curvacina A.

IIb: Peptídeos formadores de poros na membrana celular, constituídos de duas subunidades importantes para a atividade. Exemplos: lactococina G, lactococina M e lactacina F.

IIc: Peptídeos ativados por tiol, que requerem resíduos de cisteína reduzida para tornarem-se ativos. Exemplo: lactacina B.

Classe III: grandes proteínas termolábeis (>30 kDa). Exemplos: helveticina J, helveticina V-1829, acidofilina e lactacinas A e B.

Classe IV: bacteriocinas complexas, compostas por uma fração protéica e frações lipídicas ou glicídicas. Exemplos. plantaricina S, leuconocina S, lactocina 27 e pediocina SJ1.

Hoje, o esquema de classificação sugerido por grande parte dos pesquisadores divide as bacteriocinas em apenas duas classes (COTTER, HILL, ROSS, 2005):

Classe I: lantibióticos que são pequenos peptídeos (< 5 kDa) com anéis de lantionina e β -metil-lantionina. A classe I está subdividida em duas subclasses de acordo com as suas similaridades estruturais:

- subclasse Ia: lantibióticos catiônicos e anfifílicos que agem através da formação de poros na parede celular. A nisina, utilizada como bioconservador em alimentos, pertence a esse grupo de bacteriocinas.
- subclasse Ib: lantibióticos globulares que agem através da inibição de enzimas.

É importante ressaltar que existem diferenças entre os lantibióticos (antibióticos que contém resíduos de lantionina) e os antibióticos terapêuticos. Os lantibióticos são agentes protéicos rapidamente digeríveis por proteases do trato gastrointestinal humano. Eles são peptídeos sintetizados ribossomicamente e esse fato cria a possibilidade de melhorar suas características aumentando sua atividade e espectro de ação. Já os antibióticos são considerados metabólitos secundários (SAAVEDRA *et al*, 2004).

Classe II: “não-lantibióticos”, são bacteriocinas de variável peso molecular (<10 kDa), termoestáveis, contendo aminoácidos regulares. O mecanismo de ação das bacteriocinas da classe II se baseia na permeabilização da membrana e conseqüente perda de moléculas da bactéria alvo. Essa classe está dividida em três subgrupos (DRIDER *et al.*, 2006):

- subclasse IIa: peptídeos ativos contra *Listeria*, como a Pediocin PA-1 que tem um limitado espectro de atividade, mas alta especificidade para agir contra *Listeria monocytogenes*;
- subclasse IIb: bacteriocinas formadas por dois peptídeos distintos que trabalham em sinergia dissipando o potencial de membrana, provocando a perda de íons e/ou diminuição do ATP celular;

- subclasse IIc: pequenos peptídeos termoestáveis que são transportados por um peptídeo guia. Apenas as bacteriocinas Divergicina A e Acidocina B pertencem a essa subclasse.

Classificadas a parte por Cotter, Hill e Ross (2005), ainda há as bacteriolisinas (antiga classe III) que são moléculas grandes de proteínas antimicrobianas e termolábeis. Seu mecanismo de ação difere das bacteriocinas por provocarem a lise das células bacterianas catalisando a hidrólise da parede celular. Na Tabela 1 há um resumo das bacteriocinas de BAL e suas principais características.

Tabela 1: Bacteriocinas de bactérias ácido lácticas e suas principais características.

Espécie produtora	Bacteriocina	Espectro de ação	Características
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nisina	Bactérias Gram positivas	Classe I, lantibiótico, 3,5 kDa, 34 aminoácidos, comercialmente eficaz
	Lacticina 3147	<i>Clostridium sp</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Propionibacterium acne</i> <i>Streptococcus mutans</i>	Classe I, dois componentes lantibióticos, 4,2 kDa, termoestável, ativo em pH ácido e fisiológico
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Lactococcina B	<i>Lactobacillus</i>	Classe II, aprox. 5 kDa, limitado espectro de ação
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acidocina CH5	Bactérias Gram positivas <i>Lactobacillus</i>	Class II, alto peso molecular
	Lactacina F	<i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>	Classe II, 6,3 kDa, 57 aminoácidos, termoestável a 121° C por 15 minutos
	Lactacina B	<i>Lactobacillus debrweckii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus.bulgaricus.</i> <i>Lactococcus lactis.</i>	Classe III, 6,3 kDa, termoestável, detectada somente em culturas mantidas em pH 5,0 a 6,0
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Lactobin A	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Classe II, 4,8 kDa, 50 aminoácidos, limitado espectro de atividade
<i>Lactobacillus casei</i>	Lactocina 705	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Classe II dois peptídeos (33 aminoácidos em cada peptídeo), 3,4 kDa
<i>Leuconostoc gelidum</i>	Leucocina A	<i>Lactobacillus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Classe II, 3,9 kDa, 37 aminoácidos, estável em baixos valores de pH, mesmo depois do aquecimento (100°C / 20 min)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Mesentericina Y105	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Classe II, 3,8 kDa, 37 resíduos de aminoácido, termoestável (60°C / 120 min em pH 4,5)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocina F	Bactérias Gram positivas	Classe II, 4,5 kDa, sensível a enzimas proteolíticas, resistente ao calor e solventes orgânicos, ativa em ampla faixa de pH
	Pediocina PA-1	<i>Listeria monocytogenes</i>	Class II , 4,6 kDa, 44 aminoácidos,
	Pediocina AcH	Bactérias Gram positivas Gram negativas em situação de estresse	Class II , 4,6 kDa, 44 aminoácidos, amplo espectro de ação
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediocina A	<i>Lactobacillus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Pediococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Listeria</i> <i>Clostridium</i>	Class II, 2,7 kDa, sensível a enzimas proteolíticas e termoestável (100°C / 10 min)

As bacteriocinas de BAL podem ser classificadas de acordo com a sua estrutura, mas também pelo seu modo de ação. Diferentes mecanismos de ação têm sido propostos para bacteriocinas: alteração da atividade enzimática, inibição da germinação de esporos e inativação de carregadores aniônicos através da formação de poros seletivos e não seletivos (ABEE; KROCKEL; HILL, 1995; MARTINEZ; DE MARTINIS, 2006). As bacteriocinas podem utilizar diferentes mecanismos para ação antimicrobiana, mas o alvo sempre é o envelope celular. A formação de poros e conseqüente perda da integridade da membrana citoplasmática induzem ao vazamento de pequenas moléculas, como íons potássio e fosfatos, aminoácidos e ATP, através da bicamada lipídica, com resultados na redução ou dissipação da força próton motriz - atuando sobre o gradiente de pH (ΔpH) e/ou potencial de membrana ($\Delta \psi$) (CINTAS *et al*, 2001; DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

Alguns lantibióticos ou bacteriocinas da classe I, tal como nisina, apresentam dois modos de ação: podem bloquear o lipídio II, inibir o transporte de substâncias do citoplasma para parede celular, impedindo sua correta síntese, levando a célula à morte. Porém essa mesma bacteriocina pode usar o lipídio II como porta de entrada para inserção na membrana e formação de poros causando a rápida morte celular. Os peptídeos da classe II são anfifílicos, o que os permite permear a membrana da célula alvo conduzindo a uma despolarização e morte. As grandes proteínas bacteriolíticas (bacteriolisinas – antiga classe III de bacteriocinas) agem diretamente na parede celular causando lise na célula bacteriana (Figura 1) (COTTER, HILL, ROSS, 2005).

Figura 1 – Modo de ação de bacteriocinas de bactérias ácido lácticas (Cotter, Hill e Ross, 2005).

A bacteriocina mais conhecida e estudada é a nisina, produzida por cepas de *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis*, tendo duas variantes: nisina A e nisina Z. O nome nisina, do inglês **nisin**, vem de “Group **N** Inhibitory Substance” porque *L. lactis* anteriormente era classificado como *Streptococcus* do grupo N de Lancefield. O sufixo **in** é comumente usado para compostos com atividade antibacteriana. A nisina é a única bacteriocina considerada GRAS (Generally Recognised As Safe) pelo comitê de aditivos do Codex Alimentarius da FAO (Food and Agriculture Organization). Diversos países permitem o uso de nisina em produtos como leite, queijo, produtos lácteos, tomates e outros vegetais enlatados, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis. No Brasil, a nisina é aprovada para uso como

bioconservador em todos os tipos de queijo no limite máximo de 12,5 mg/kg. Ainda possui a vantagem de não alterar o sabor dos alimentos (ABEE; KROCKEL; HILL, 1995; CLEVELAND *et al.*, 2001; DELVES-BROUGHTON, 1990; DELVES- BROUGHTON *et al.*, 1996; DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002; LAUKOVÁ, 2000; MONTVILLE; WINKOWSKI, 1997; UKUKU; FETT, 2004).

A nisina A possui lantionina e β -metil-lantionina na molécula, com cinco pontes de monossulfeto. É uma molécula catiônica com três resíduos de lisina e um ou mais resíduos de histidina (dependendo da variante da nisina – A ou Z). A porção da cadeia que tem o grupo de histidina tem pKa 6,5 e a porção com lisina tem pKa 10,0, fazendo com que a carga elétrica da nisina seja dependente do pH. Dessa forma, a nisina é mais solúvel em pH ácido e se torna menos solúvel em pH próximo da neutralidade, não sendo solúvel em solventes apolares (ABEE; KROCKEL; HILL, 1995; CHEN; MONTVILLE, 1995; CLEVELAND *et al.*, 2001; POL; SMID, 1999).

Liu e Hansen (1990) constataram que a solubilidade da nisina em pH 2,2 foi 56 mg/mL, em pH 5,0 foi 3,0 mg/mL e em pH 11,0 foi 1 mg/mL. No entanto, quando utilizada em alimentos, a concentração da nisina é sempre inferior a esses limites e, nesse caso, sua solubilidade não depende do pH. Entretanto, o pH pode influenciar a atividade da nisina, que diminui em pH próximo da neutralidade. Em pH 3,0 a nisina é mais estável com perda de atividade inferior a 5% após aquecimento a 115°C por 20 minutos. Em pH em torno de 3,0 há maior perda de atividade, porém quando a nisina é adicionada a um alimento, ela fica protegida pelos ingredientes mantendo a sua atividade mesmo em produtos com pH alto e/ou submetidos a tratamento térmico como no caso do ovo líquido pasteurizado (DELVES-BROUGHTON, 1990).

Uma bacteriocina utilizada como único agente antimicrobiano em um alimento não assegura eficiência satisfatória, especialmente contra bactérias Gram negativas que são

protegidas da ação da bacteriocina pela presença da membrana externa. A nisina possui grande capacidade de inibir o crescimento de várias bactérias Gram positivas, porém só inibe as bactérias Gram negativas em condições especiais (DEEGAN *et al*, 2006).

A *Salmonella* Enteritidis é uma bactéria Gram negativa e não é inibida pela nisina. No entanto, alguns pesquisadores observaram que espécies de *Salmonella* podem se tornar sensíveis à ação da nisina através de tratamento com agentes que modifiquem as propriedades de permeabilidade da membrana, como o EDTA – ácido etilenodiaminotetracético, que sequestra os íons magnésio (Mg^{+2}) do lipopolissacarídeo, causando o rompimento da membrana externa, fazendo com que as bactérias Gram negativas se tornem sensíveis (DEEGAN *et al*, 2006; GELINSKI, 2003).

Figura 2 – Diferenças na parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas (De Martinis, Alves e Franco, 2002)

Alguns pesquisadores demonstraram que o uso combinado de nisina com outros fatores de conservação em alimentos, como atmosfera modificada, baixa temperatura, tratamento com campo elétrico pulsante, baixo pH e elevadas concentrações de NaCl, agentes quelantes, entre outros, pode ser eficiente no prolongamento da vida de prateleira e da segurança microbiológica de alimentos. A utilização de nisina como único conservador em alimento não é a melhor opção, pois múltiplas exposições de um patógeno à nisina aumentam a probabilidade de seleção de mutantes resistentes estáveis (DE MARTINIS; FRANCO, 1998; ECKNER, 1992; POL *et al.*; 2001).

Outra estratégia para expandir a aplicação de nisina em alimentos pode ser a ação combinada de bacteriocinas com outras substâncias antimicrobianas naturais, como os óleos essenciais. A nisina e os óleos essenciais agem sobre a membrana citoplasmática e um efeito aditivo ou sinérgico pode ser esperado, permitindo aplicação de ambos antimicrobianos em menor teor sem diminuir o efeito inibitório (NAZER *et al.*, 2005; OLASUPO *et al.*, 2003).

1.2. ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são líquidos aromáticos extraídos de flor, caule, folha, fruto, broto, semente, tronco ou raiz de plantas medicinais, ervas e plantas comestíveis, o que minimiza questões sobre a sua aplicação em produtos alimentícios. Na história da gastronomia há relatos de que os óleos essenciais e seus componentes têm sido usados como aromatizantes em alimentos há muitos séculos. Porém, hoje, os óleos essenciais também podem ser usados como antimicrobianos naturais, já que a sua atividade antimicrobiana está confirmada e muito bem documentada. Os óleos essenciais atingem um amplo espectro microbiano e têm ação não só contra bactérias Gram positivas como *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.*, mas também contra Gram negativas como *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Shigella spp.*, *Salmonella enterica* Typhimurium e Enteritidis, e *Escherichia coli*, fungos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*) e leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). A composição e a estrutura, bem como os grupos funcionais dos óleos essenciais, desempenham um importante papel na atividade antimicrobiana. Seu uso já é de interesse da indústria como método alternativo ou em combinação com métodos já existentes visando a segurança alimentar em alimentos processados (ALZOREKY; NAKAHARA, 2002; BAGAMBOULA;

UYTTENDAELE; DEBEVERE, 2003; BURT, 2004; DELAQUIS *et al.*, 2002; DORMAN; DEANS, 2000; DUPONT *et al.*, 2006; ISAACS *et al.*, 2005; LIS-BALCHIN *et al.*, 1998; MARINO; BERSANI; COMI, 2001; NAZER *et al.*, 2005; SAGDIÇ; ÖZCAN, 2003, SEYDIM; SARIKUS, 2006; SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998).

No Brasil e na Europa muitos pesquisadores têm avaliado a atividade inibitória de condimentos sobre bactérias, leveduras e fungos filamentosos. A flora nativa da região Norte do Brasil desperta fascínio na pesquisa de óleos essenciais seja para aplicação em cosméticos ou em alimentos. Marinho *et al.* (2005) estudaram a atividade de óleo essencial de *Pimenta dióica* contra cepas de *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia stuarti*, *Samonella* sp., *Serratia* sp., *Staphylococcus* coagulase positiva, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio parahaemolyticus* pelo método de difusão de Bauer-Kirby e verificaram que apenas *A. caviae* e *A. hydrophila* não apresentaram sensibilidade ao óleo essencial.

Kivanç, Akgul e Dogan (1991) estudaram o efeito de cominho e orégano e seus óleos essenciais sobre o crescimento de *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides*. O óleo essencial de cominho inibiu o crescimento de *L. plantarum* em apenas duas concentrações, enquanto o orégano e seu óleo essencial inibiram o crescimento das duas bactérias em todas as concentrações utilizadas, inclusive em baixas concentrações (menores que 0,5%).

Sagdiç e Özcan (2003) investigaram o efeito inibitório *in vitro* de condimentos sobre bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Staphylococcus* e *Yersinia*. Os temperos manjerição, erva-doce, funcho, louro, sálvia e hortelã não apresentaram atividade inibitória em nenhuma das bactérias estudadas. O anis apresentou atividade contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O cominho inibiu *Bacillus brevis*, *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli* O157:H7. O tomilho agiu contra *Bacillus*

amyloliquefaciens, *B. brevis*, *B. cereus*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* Enteritidis, *S. Gallinarum*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica*. O orégano apresentou atividade antimicrobiana sobre todas as bactérias inibidas pelo tomilho, além de *Bacillus subtilis* var. Niger, *E. aerogenes*, *E. coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* Typhimurium e *S. aureus*.

Os óleos essenciais podem ter inúmeros componentes individuais com atividade antimicrobiana e, conseqüentemente, a atividade antimicrobiana não pode ser atribuída a um mecanismo específico, mas a vários efeitos na célula bacteriana, tais como degradação da parede celular; dano à membrana citoplasmática; danos às proteínas de membrana; vazamento (perda) de conteúdo celular; coagulação do citoplasma e depleção da força próton motriz (CARSON; MEE; RILEY, 2002). Conner *et al.* (1984) sugeriram que óleos essenciais podem inibir sistemas enzimáticos de leveduras, incluindo aqueles envolvendo produção de energia e síntese de componentes estruturais.

Os compostos fenólicos são os principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas da maioria dos óleos essenciais. Seu sítio de ação é a membrana celular da célula microbiana. Por serem hidrofóbicos, acumulam-se na bicamada lipídica da membrana celular causando um desarranjo na função e na estrutura da membrana e a penetram exercendo atividade inibitória no interior da célula bacteriana, causando lise e liberação do ATP intracelular. Outro mecanismo documentado é a perda de constituintes celulares pelo aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática, o que faz com que a fase *lag* seja estendida e a velocidade de multiplicação durante a fase exponencial, diminuída (CONSENTINO *et al.*, 1999; FRIEDMAN; HENIKA; MANDRELL, 2002; NAZER *et al.*, 2005; POL; SMID, 1999; RHAYOUR *et al.*, 2003; SMITH-PALMER; STWART; FYFE, 1998; YUSTE; FUNG, 2003).

Os componentes antimicrobianos predominantes no óleo essencial de orégano (OEO) são timol [5-metil-2-(1-metiletil) fenol] e carvacrol [2-metil-5-(1-metiletil) fenol], ambos com

comprovado efeito inibitório no controle *in vitro* da multiplicação de *Salmonella* (RHAYOUR *et al.*, 2003; NAZER *et al.*, 2005). A eficácia da atividade bactericida de OEO pode variar em função dos teores de timol e carvacrol presentes, o que está estritamente ligado a fatores como solo, clima, práticas agrícolas, variedade do orégano e processo de extração do óleo essencial, que pode ser a destilação a frio ou a destilação por arraste de vapor, que é a mais utilizada comercialmente (BURT, 2004; CONSENTINO *et al.*, 1999; JULIANO; MATTANA; USAI, 2000; FALEIRO, 2002; FALCONE *et al.*, 2005; OUSSALAH *et al.*, 2006).

Em nível de membrana externa, o mecanismo proposto para a ação de timol e carvacrol presentes no óleo essencial de orégano é a inibição das etapas iniciais da biossíntese do peptidoglicano ou a remoção de íons magnésio que estabilizam o lipopolissacarídeo presente nas bactérias Gram negativas (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995). Segundo Naidu, 2000, o timol provoca o vazamento de constituintes intracelulares e, uma vez aplicado em *Salmonella* Typhimurium, reage com proteínas da membrana citoplasmática, causando mudanças na sua permeabilidade, afetando a força próton motriz e resultando em possível vazamento (NAIDU, 2000). Um dos efeitos mais drásticos já descritos da ação inibitória de compostos fenólicos foi a desintegração da membrana externa de *E. coli* e *S. Typhimurium* após a exposição ao carvacrol e ao timol (HELANDER *et al.*, 1998). Observações similares foram feitas por Lucchini, Core e Cremieux (1990) com esses agentes usando cepas diferentes de *E. coli* e *P. aeruginosa*. Leveduras e bactérias Gram positivas não apresentaram tais mudanças na morfologia da parede celular. O efluxo de íons potássio é um sinal de dano freqüentemente seguido pelo efluxo de constituintes citoplasmáticos, incluindo ATP (BRUL; COOTE, 1999; COWAN, 1999; GRIFFIN *et al.*, 1999; ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002; DAVIDSON; NAIDU, 2000; COX *et al.*, 2000; LAMBERT *et al.*, 2001; WALSH *et al.*, 2003). Outros acontecimentos que podem levar à disfunção de membrana incluem a dissipação dos dois componentes da força próton motriz (gradiente de pH - Δ pH e potencial elétrico da

célula - $\Delta\Psi$), a mudança no transporte de íons e de ATP por mudanças estruturais na membrana, ou inibição de enzimas impedindo a utilização de substratos para produção de energia (HELANDER *et al.*, 1998; LAMBERT *et al.*, 2001; ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002).

A capacidade dos compostos fenólicos em interferir no metabolismo celular através de desestabilização da membrana, quelação de metais, inativação de enzimas e inutilização de substratos é bem documentada (COWAN, 1999). Um trabalho com sondas fluorescentes mostrou que óleos essenciais aumentaram a permeabilidade da membrana e que os componentes do óleo realmente se inseriram na membrana. Embora importante, no caso do carvacrol e de seu precursor p-cimeno, a extensão da inserção do antimicrobiano na membrana não teve ligação com sua atividade antimicrobiana (ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002). Nesse estudo, Ultee, Bennik e Moezelaar (2002) verificaram que a presença do grupo hidroxil no anel fenólico da molécula é imprescindível para uma atividade antimicrobiana eficiente.

Além da atividade antimicrobiana, o OEO tem também atividade antioxidante, permitindo seu uso em maionese em substituição ao butilhidroxitolueno (BHT) e butilhidroxianisol (BHA), que são suspeitos de promover efeitos negativos para saúde (KULISIC *et al.*, 2004).

Consumidores cada vez mais avessos aos aditivos artificiais têm estimulado a pesquisa de novas estratégias tecnológicas para aplicação na indústria de alimentos e bebidas, uma vez que a aplicação de aditivos artificiais pode provocar efeitos indesejáveis ao organismo humano (PERIAGO; MOEZELAAR, 2001). O uso de antimicrobianos naturais como método alternativo no processamento de alimentos, aliado a outros tratamentos, tem sido adotado em muitos países como mais uma barreira para inibir a multiplicação de microrganismos que causem risco para a Saúde Pública (ULTEE; SMID, 2001).

Vários países do mundo possuem legislação para aplicação de nisina em variados alimentos (HOLLEY; GILL, 2003). Embora a nisina já venha sendo usada como aditivo em alimentos há pelo menos duas décadas, pouco se sabe sobre a aplicação dos óleos essenciais como bioconservadores de alimentos. Por séculos, os óleos essenciais foram utilizados apenas como aromatizantes, mas hoje começam a ganhar espaço como antimicrobianos naturais devido às pesquisas que comprovam uma atividade inibitória sobre microrganismos (PERIAGO *et al.*, 2006).

Estudos sobre o uso associado de nisina com óleos essenciais visando o controle da multiplicação de microrganismos são limitados e quase sempre restritos a ensaios *in vitro*. Pol e Smid (1999) e Periago e Moezelar (2001), realizaram estudos nos quais demonstraram o efeito sinérgico entre nisina e carvacrol sobre células vegetativas de *Bacillus cereus* cultivadas em meio de cultura. Ettayebi *et al.* (2000), encontraram efeito sinérgico entre nisina e timol sobre *L. monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. Periago, Palop e Fernandez (2001) verificaram que há um efeito sinérgico entre a nisina e timol e carvacrol na diminuição de células viáveis de *B. cereus* em vegetais minimamente processados.

Dessa forma, o presente trabalho pretendeu preencher essa lacuna, investigando o potencial de aplicação de nisina em combinação com óleo essencial de orégano no controle da multiplicação de *Salmonella* Enteritidis em salada de legumes com maionese, que corresponde à refeição mais envolvida em surtos de salmonelose em nosso país. Considerando que a aplicação de muitos antimicrobianos esbarra na limitação de necessitar serem aplicados em altas concentrações para se obter o efeito desejado, o trabalho objetivou também verificar qual seria a aceitação pelo consumidor de uma maionese contendo esses compostos nas concentrações necessárias para uma efetiva ação antimicrobiana.

1.3 OBJETIVOS

- Avaliar o efeito antimicrobiano de óleo essencial de orégano, EDTA e nisina individualmente e a combinação de nisina com EDTA e nisina com óleo essencial de orégano no controle da multiplicação de *Salmonella* Enteritidis pela técnica de difusão em poços.
- Face aos resultados do item anterior, testar o antimicrobiano com melhor efeito no controle da multiplicação de *Salmonella* Enteritidis, em salada de legumes com maionese preparada artesanalmente, durante armazenamento sob refrigeração (8°C) e em temperatura ambiente (30°C).
- Avaliar a aceitabilidade da salada de legumes com maionese e a intenção de compra dessa maionese preparada com o antimicrobiano de melhor efeito no controle da multiplicação de *Salmonella* Enteritidis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CULTURA MICROBIANA

Salmonella enterica subespécie *enterica* sorovar Enteritidis ATCC 13076 (SE), mantida em ágar soja tripticaseína (TSA) a 4°C, reativada em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) a 30°C por 18 horas.

2.2. AGENTES ANTIMICROBIANOS PESQUISADOS

Óleo essencial: soluções alcoólicas de OEO de cinco marcas comerciais diferentes (A, B, C, D, E) nas concentrações de 0% (controle), 0,1%; 0,2%; 0,5%; 1,0% ou 2,0% (v/v), todas preparadas no momento da realização de cada experimento. Teste em branco somente com álcool 95% P.A (solução 0%).

Nisina: Solução ácida (HCl 0,02N) de nisina (NISAPLIN® DANISCO) autoclavada e estocada a -18°C, diluída em água deionizada estéril a 6,25ppm; 12,5ppm ou 25ppm no momento de cada teste.

EDTA: solução aquosa neutra (pH 7,04) de EDTA (SIGMA) estocada em refrigeração e diluída com água deionizada estéril a 0,0037%; 0,0056%; 0,0075% e 0,0110%; 0,0150% (p/v) na realização de cada teste.

A solução de EDTA foi preparada com pH final próximo de sete, porque o seu poder de quelação é melhorado em pH neutro.

As concentrações de EDTA e de nisina foram determinadas em função de valores permitidos por lei no Brasil admitindo-se como mínimo a metade do valor permitido e como máximo, o dobro desse valor. Para EDTA adotou-se 0,0075%, conforme especificado na Portaria 359, de 04 de setembro de 1997, do Ministério da Agricultura. Para nisina, respeitou-

se a legislação brasileira para requeijão, que permite 12,5µg/g - Regulamento Técnico de Fixação de Identidade e Qualidade de Requeijão (BRASIL, 1997). As concentrações de óleo essencial de orégano foram definidas em função de dados de literatura (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999).

2.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO *IN VITRO*

A sensibilidade da cepa de SE à ação dos antimicrobianos foi avaliada pelo método de difusão em poços descrito por Harris *et al* (1989). Poços de 6 mm foram perfurados em placas de Petri contendo caldo triptona de soja com 1% de ágar (TSBA) e uma cultura de SE contendo 10⁴UFC/mL, preparada conforme descrito no item 2.1. Os poços foram preenchidos com 35µL de cada uma das soluções descritas no item 2.2, individualmente ou combinadas. Após incubação a 30°C por 24h, o diâmetro dos halos de inibição de cada poço foi medido com auxílio de uma régua de leitura de antibiograma, onde o tamanho do halo era diretamente proporcional à atividade antimicrobiana. Na avaliação *in vitro*, foram utilizados um controle positivo empregando uma cultura de *Enterococcus faecalis* ATCC 19483 sensível à nisina, um controle negativo composto de caldo BHI e um controle do solvente do OEO (álcool 95% P.A.).

2.4. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (OEO) DAS MARCAS A, B, C, D, E

Utilizou-se a cromatografia a gás com detecção por espectrômetro de massas através de impacto de elétrons (CG-IE-MS). Para a identificação dos constituintes de cada um dos cinco óleos essenciais procedeu-se a diluição das amostras com hexano e 1mL de cada

amostra foi injetada automaticamente (injetor HP ALS-1100 - Hewlett Packard, Palo Alto, E.U.A.) em modo split (100:1). A separação e a análise dos componentes foram realizadas por cromatografia em fase gasosa, em equipamento HP 5890 ser. II Plus acoplado a espectrômetro de massas HP 5973 MSD monitorado pelo software ChemStation, utilizando o processo de impacto de elétrons a 70 eV. Como gás de arraste foi utilizado Hélio, com fluxo constante de 1cm³/min, razão de divisão 1:20. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25mm). As temperaturas utilizadas foram de 250°C para o injetor e de 250°C para a interface entre o cromatógrafo e o detector. A temperatura inicial da coluna foi de 40°C durante 2 min, elevando-se 5°C/min até 90°C e posteriormente, 10°C/min até 250°C, ficando nessa temperatura por mais 5 minutos.

2.5. FORMULAÇÃO DE MAIONESE BASE CONTENDO AGENTES ANTIMICROBIANOS

Para formular a maionese foram utilizados ingredientes da formulação padrão de uma maionese comercial: óleo de soja, cloreto de sódio (NaCl), vinagre a 4%, EDTA e emulsificante, conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Fórmula de maionese utilizada no experimento com OEO.

Maionese (ingredientes)	Quantidade
óleo de soja	~175 mL
emulsificante	17,5 g
solução de NaCl 10% a 4°C	9,0 mL
solução de EDTA 1% a 4°C	1,25 mL
vinagre (4% de ácido acético)	25 mL
pH	4,22

Foram testados quatro tipos de emulsificante: ovo em pó, gema em pó, ovo integral pasteurizado e gema líquida, os quais possuíam certificado de qualidade indicando a ausência

de *Salmonella* sp. A maionese foi preparada em capela de fluxo laminar, com material e soluções estéreis. O emulsificante (ovo ou gema) foi incorporado assepticamente à fase aquosa composta de vinagre, soluções aquosas de NaCl e de EDTA a 4°C. Após a mistura desses ingredientes, o óleo de soja foi lentamente adicionado à fase aquosa, sob agitação constante, em quantidade suficiente (~70%) para formar uma emulsão estável. Nesse procedimento foi utilizado um “mixer” doméstico (Robot Classic – Mallory), previamente higienizado com álcool 70%.

2.6. DETERMINAÇÃO DO pH E DA ATIVIDADE DE ÁGUA (Aa) DA MAIONESE BASE

Para determinação do pH foi utilizado um potenciômetro Digimed (Medidor de pH DMPH-2) e para determinação da Aa foi utilizado um medidor Novasina Aw-Center 503-C (Novasina AG, Zurich, Switzerland) a 25°C. O pH foi medido após o preparo da maionese e após 15 dias de armazenamento sob refrigeração.

2.7. AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE SALMONELLA ENTERITIDIS EM SALADA DE LEGUMES COM MAIONESE ADICIONADA DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO DURANTE ARMAZENAMENTO EM REFRIGERAÇÃO (8°C) E EM TEMPERATURA AMBIENTE (30°C)

Nesse teste, 25 mL da cultura em solução salina de SE contendo 10^4 UFC/mL foram inoculados à 225g de Seleta de Legumes em Conserva (Carrefour SA) e misturados com 75g de maionese contendo OEO 0,2%. O procedimento foi repetido com maionese sem OEO, denominada amostra controle. Cada uma das misturas foi dividida em 12 sacos estéreis em alíquotas de 25g, seis das quais foram armazenadas a 8°C e seis a 30°C. Nos tempos 0, 1, 2, 4,

8 e 24 horas, um dos sacos foi submetido à três diluições decimais seriadas, que foram semeadas em superfície em ágar XLD, em duplicata. Após 24 horas de incubação a 30°C, efetuou-se a contagem das colônias nas placas de XLD e os resultados foram convertidos em log UFC/g de maionese.

O pH e a Aa foram medidos na maionese simples e na maionese misturada com salada de legumes. Todos os experimentos foram analisados três vezes, expressando-se os resultados como médias dessas três repetições.

Para cada lote de maionese preparada, monitorou-se o pH e a Aa.

2.8. ANÁLISE SENSORIAL: ACEITABILIDADE DA MAIONESE BASE E DA SALADA DE LEGUMES COM MAIONESE ADICIONADA DE OEO.

O teste de aceitabilidade foi realizado com maionese da marca Hellmann's (Unilever Brasil Ltda) adquirida no comércio de São Paulo, em três formulações: 1. maionese sem adição do OEO; 2. maionese com adição de 0,5% de OEO; 3. maionese com adição de 1% de OEO.

Os testes foram realizados no laboratório de Análise Sensorial da FCF/USP, em cabines individuais, sob luz branca e temperatura ambiente, com 30 indivíduos de ambos os sexos. Para determinar aceitabilidade, cada amostra foi servida individualmente, ou seja, monadicamente.

O teste sensorial foi realizado com as amostras servidas em torradas colocadas em pratos descartáveis. Junto com cada amostra, cada indivíduo recebeu uma ficha de avaliação e foi orientado a ingerir água mineral e biscoito de água e sal entre as amostras para diminuir o sabor residual. Na ficha, o consumidor deveria assinalar o grau de aceitação numa escala

hedônica estruturada de nove pontos (1 = desgostei extremamente, 5 = não desgostei e nem gostei, 9 = gostei extremamente) (Anexo 1) (DELLA MODESTA, 1994).

A utilização de uma escala hedônica permite a normalização da distribuição dos resultados, além de permitir a avaliação de mais de um atributo numa mesma amostra, que no caso foram aroma e sabor (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999; VILLANUEVA, PETENATE; SILVA, 2000).

Em função dos resultados obtidos com a maionese contendo 0,5% ou 1% de OEO, preparou-se maionese acrescida de 0,2% de OEO para análise sensorial da salada de legumes com maionese. Dessa vez, a análise sensorial foi realizada na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), com 61 indivíduos, de ambos os sexos. Junto com cada amostra, cada consumidor recebeu a ficha de avaliação, na qual tinha que assinalar o grau de aceitação para o aroma e o sabor, separadamente, em duas escalas hedônicas estruturadas de nove pontos (1 = gostei extremamente, 5 = não desgostei e nem gostei, 9 = desgostei extremamente) (Anexo 2). Nessa mesma ficha, foi perguntada também a intenção de compra e disponibilizou-se espaço para comentários voluntários a respeito do produto.

Em ambos os testes, os dados foram computados em porcentagem de modo a facilitar a interpretação dos resultados.

2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de médias pelo programa Sisvar para Windows versão 4.0 ($p < 0,05$) (FERREIRA, 2000). Os dados da ANOVA também foram submetidos ao teste de Tuckey, empregando-se o pacote estatístico SAS (SAS – Statistical Analysis System – The SAS Institute, Cary, N.C., versão 6.08, 1992).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO *IN VITRO*

3.1.1. Ação individual

Nos testes *in vitro*, ao contrário do observado para OEO, a nisina e o EDTA não apresentaram atividade inibitória sobre a multiplicação de SE em nenhuma das concentrações testadas. Embora seja fato conhecido que a nisina, assim como as demais bacteriocinas conhecidas, não tenha atividade contra bactérias Gram negativas, esperava-se que o EDTA tivesse atividade contra SE, já que esse composto age danificando a parede celular microbiana através da quelação de cátions divalentes (UKUKU; FETT, 2004). A ação do EDTA sobre bactérias Gram negativas parece necessitar de mais estudos uma vez que Gelinsky, em 2003, já havia detectado essa ação inibitória do EDTA sobre SE, ao contrário de Alzoreky e Nakahara (2003) que demonstraram que *Salmonella* Infantis não foi inibida por EDTA isoladamente ou em combinação com extratos de plantas.

Para avaliação da atividade antimicrobiana de qualquer substância, diferentes técnicas podem ser empregadas, dependendo do objetivo da pesquisa. Se o objetivo é apenas examinar a atividade antimicrobiana, utilizam-se métodos qualitativos, como difusão em discos ou difusão em poços. Se o objetivo é determinar a intensidade das propriedades antimicrobianas ou calcular a Concentração Inibitória Mínima (MIC) utilizam-se métodos quantitativos, como diluição em ágar ou em caldo, no qual podem ser feitas medidas de densidade ótica, absorvância, condutância ou impedância, ou a contagem de células viáveis. Por último, se o objetivo é determinar se a atividade antimicrobiana é bactericida ou bacteriostática, pode-se

fazer curva de sobrevivência ou de morte (CRESSY *et al.*, 2003; PERIAGO; MOEZELAAR, 2001; POL; SMID, 1999; ULTEE; GORRIS; SMID, 1998; ULTEE; SMID, 2001).

Assim, uma possível explicação para a divergência de resultados em relação a ação do EDTA sobre SE seja a metodologia analítica utilizada para detectar a ação inibitória. Enquanto Gelinsky (2003) utilizou a técnica de cultivo em caldo, nesse estudo foi utilizada a técnica de difusão em poços, a mesma utilizada por Alzoreky e Nakahara (2003).

Quanto às diferentes marcas de OEO, verificou-se que todos apresentaram atividade antimicrobiana sobre SE. Conforme apresentado na Figura 3, a atividade foi diretamente proporcional à concentração do OEO. Pode-se observar na Tabela 3 que quanto maior o tamanho do halo de inibição medido em milímetros, melhor é o efeito antimicrobiano do OEO.

Figura 3 - Atividade inibitória de OEO das marcas A, B, C, D e E sobre *Salmonella Enteritidis* a 30°C.

Tabela 3 - Atividade inibitória medida pelo tamanho do halo de diferentes concentrações de óleo essencial de orégano (OEO) de cinco marcas (A, B, C, D e E) sobre *Salmonella* Enteritidis a 30°C determinada pela técnica de difusão em poços.

OEO (%)	Diâmetro* do halo de inibição (mm) das diferentes marcas de OEO				
	A	B	C	D	E
0,1	12 ^{A,d}	12 ^{A,c}	7 ^{B,e}	10 ^{A,d}	11 ^{A,d}
0,2	14 ^{A,c}	13 ^{A,c}	13 ^{A,d}	13 ^{A,c}	15 ^{A,c}
0,5	15 ^{A,c}	14 ^{A,b}	15 ^{A,c}	15 ^{A,c}	16 ^{A,c}
1,0	18 ^{A,b}	16 ^{A,b}	18 ^{A,b}	18 ^{A,b}	19 ^{A,b}
2,0	21 ^{A,a}	20 ^{A,a}	22 ^{A,a}	21 ^{A,a}	22 ^{A,a}

*o diâmetro do halo de inibição inclui 6 mm do poço perfurado **cada valor é a média de nove medições

*** para uma mesma linha, valores seguidos da mesma letra maiúscula não apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,05$)
para uma mesma coluna, valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,05$)

A análise estatística dos resultados indicou que os OEO pertencentes às marcas A, B, D e E tiveram desempenho semelhante para uma mesma concentração testada, com exceção apenas daquele pertencente à marca C na concentração de 0,1%, que resultou em halo de inibição significativamente menor que os demais OEO nessa concentração ($p < 0,05$). Considerando todas as concentrações testadas, a análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa na atividade inibitória *in vitro* dos cinco OEO testados ($p < 0,05$). Note-se, no entanto, que o OEO da marca E apresentou halos ligeiramente maiores do que os demais óleos na concentração $\geq 0,2\%$. Esse fato pode ser decorrente da presença de p -cimeno e γ -terpineno no OEO da marca E, conforme será discutido no item 3.3. Esse resultado está de acordo com Chi, Zivanovic e Penfiled (2006) que também observaram que a atividade inibitória do óleo essencial de orégano varia de acordo com a sua composição.

Conforme pode ser visto na Tabela 3 e Figura 3, não houve diferença significativa no tamanho dos halos decorrentes do uso de OEO das marcas A, D e E nas concentrações de 0,2% e 0,5%. Considerando que o OEO da marca E apresentou halos maiores que os demais óleos, escolheu-se o OEO dessa marca, na concentração de 0,2%, para fazer a avaliação da atividade inibitória de SE na maionese. Essa concentração mostrou-se mais adequada em função das características sensoriais da maionese adicionada de OEO.

3.1.2. Ação combinada

3.1.2.1. Combinação de nisina e EDTA

Nos experimentos com nisina combinada com EDTA não foram observados halos de inibição de SE, mostrando que ambos agentes antimicrobianos estudados, empregados isoladamente ou combinados, não apresentaram qualquer efeito bacteriostático ou bactericida contra SE. Esses resultados diferem dos relatados por Ukuku e Fett (2004), que encontraram pelo menos um efeito bacteriostático quando estudaram a combinação de nisina e EDTA contra um pool de *Salmonella* em testes em caldo TSB (caldo triptona de soja) contendo a solução antimicrobiana. A provável explicação para a diferença dos resultados está na diversidade do método analítico utilizado.

3.1.2.2. Combinação de nisina e OEO

A atividade antimicrobiana da combinação de OEO e nisina foi testada apenas nas marcas C, D e E. Os halos de inibição de SE por OEO não combinado com nisina sempre foram maiores dos que os halos de inibição do OEO combinado com qualquer concentração de nisina nas três marcas de OEO testadas (Figuras 4, 5 e 6), exceto na concentração de 0,1% de OEO da marca D quando combinado com 12,5 ou 25 ppm de nisina e da marca E quando combinado com 6,25 ppm de nisina. Esses resultados indicam um efeito antagônico entre a nisina e o OEO.

Uma possível explicação para essa atividade antagônica é que a nisina pode evitar que o OEO seja incorporado pelas células bacterianas e vice-versa. Além disso, pode ocorrer a interferência da nisina na estrutura e configuração dos componentes ativos do OEO, diminuindo sua atividade específica (OLASUPO *et al.*, 2004).

Figura 4 - Efeito de OEO da marca C isolado ou em combinação com nisina 6,25ppm, 12,5ppm ou 25ppm sobre *Salmonella Enteritidis* a 30°C.

Figura 5 - Efeito de OEO da marca D isolado ou em combinação com nisina 6,25ppm, 12,5ppm ou 25ppm sobre *Salmonella Enteritidis* a 30°C.

Figura 6 - Efeito de OEO da marca E isolado ou em combinação com nisina 6,25ppm, 12,5ppm ou 25ppm sobre *Salmonella Enteritidis* a 30°C.

Os resultados referentes à atividade inibitória sobre SE da combinação de nisina com as três marcas de OEO, em todas as concentrações testadas, estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6. Na Tabela 4 avalia-se a interação entre o OEO (marca e concentração) e a nisina; na Tabela 5 verifica-se a influência da nisina na ação do OEO em função da concentração do OEO, comparando as três marcas e, na Tabela 6, pode-se avaliar a influência da nisina na ação do OEO em função da marca do OEO, comparando as cinco concentrações de OEO empregadas.

O efeito antagônico entre a nisina e o OEO é independente da concentração da nisina e da marca do OEO (Tabela 4). Apenas uma exceção foi observada: conforme mencionado anteriormente, o OEO da marca D na concentração de 0,1% combinado com 6,25 ppm de nisina foi o que resultou no menor halo de inibição.

Conforme a Tabela 5 verifica-se que, para o OEO da marca C, a atividade antimicrobiana aumenta com o aumento da concentração do OEO. Para o OEO das marcas D e E, a atividade antimicrobiana do OEO a 0,2% e 0,5% são iguais, independentemente da concentração da nisina.

De acordo com o apresentado na Tabela 6, pode-se verificar que qualquer das três concentrações de nisina combinada com 0,5% de OEO não fez diferença entre as três marcas testadas. Nas demais concentrações, houve alguma variabilidade de resultados de acordo com a marca do OEO, mas verificou-se que mesmo quando combinado com nisina, o OEO da marca E sempre apresentou maiores halos de inibição que as demais marcas. Esse resultado está em concordância com outros resultados obtidos neste trabalho, reportados anteriormente em relação ao OEO da marca E, que sempre apresentou halos maiores que os demais OEO, independentemente das condições de uso.

Tabela 4 – Atividade inibitória medida pelo tamanho do halo de diferentes marcas (C, D e E) de óleo essencial de orégano (OEO) combinado com nisina sobre *Salmonella* Enteritidis determinada pela técnica de difusão em poços a 30°C.

Diâmetro* do halo de inibição (mm) da combinação de OEO e Nisina				
Marca	OEO (%)	Nisina**		
		6,25 ppm	12,5 ppm	25 ppm
***C	0,1	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	0,2	11 ^a	11 ^a	12 ^a
	0,5	13 ^a	12 ^a	13 ^a
	1,0	15 ^a	15 ^a	16 ^a
	2,0	18 ^a	18 ^a	20 ^a
D	0,1	8 ^b	11 ^a	12 ^a
	0,2	12 ^a	12 ^a	12 ^a
	0,5	12 ^a	13 ^a	13 ^a
	1,0	15 ^a	15 ^a	16 ^a
	2,0	20 ^a	20 ^a	19 ^a
E	0,1	12 ^a	10 ^a	11 ^a
	0,2	14 ^a	13 ^a	13 ^a
	0,5	14 ^a	14 ^a	14 ^a
	1,0	19 ^b	17 ^a	16 ^a
	2,0	21 ^a	20 ^a	19 ^a

*o diâmetro do halo de inibição inclui 6 mm do poço perfurado **cada valor é a média de nove medições

*** para uma mesma linha, valores seguidos da mesma letra não apresentaram diferença estatística entre si (p<0,05).

Tabela 5 – Efeito das diferentes marcas (C, D e E) de óleo essencial de orégano (OEO) combinado com nisina na atividade inibitória medida pelo tamanho do halo de OEO sobre *Salmonella* Enteritidis determinada pela técnica de difusão em poços a 30°C.

Diâmetro* do halo de inibição (mm) da combinação de OEO e Nisina						
Marca	Nisina (ppm)	OEO				
		0,1%	0,2%	0,5%	1,0%	2,0%
C	6,25	0 ^e	11 ^d	13 ^c	15 ^b	18 ^a
	12,5	0 ^e	11 ^d	12 ^c	15 ^b	18 ^a
	25,0	0 ^e	12 ^d	13 ^c	16 ^b	20 ^a
D	6,25	8 ^d	12 ^c	12 ^c	15 ^b	20 ^a
	12,5	11 ^d	12 ^d	13 ^c	15 ^b	20 ^a
	25,0	12 ^c	12 ^c	13 ^c	16 ^b	19 ^a
E	6,25	12 ^d	14 ^c	14 ^c	19 ^b	21 ^a
	12,5	10 ^d	13 ^c	14 ^c	17 ^b	20 ^a
	25,0	11 ^d	13 ^c	14 ^c	16 ^b	19 ^a

*o diâmetro do halo de inibição inclui 6 mm do poço perfurado **cada valor é a média de nove medições

*** para uma mesma linha, valores seguidos da mesma letra não apresentaram diferença estatística entre si (p<0,05).

Tabela 6 – Efeito da combinação de óleo essencial de orégano (OEO) e nisina na atividade inibitória das diferentes marcas (C, D e E) de OEO sobre *Salmonella* Enteritidis determinada pela técnica de difusão em poços a 30°C.

Diâmetro* do halo de inibição (mm) da combinação de OEO e Nisina				
OEO (%)	Nisina (ppm)	Marca**		
		C	D	E
***0,1	6,25	0 ^c	8 ^b	12 ^a
0,1	12,5	0 ^b	11 ^a	10 ^a
0,1	25,0	0 ^b	12 ^a	11 ^a
0,2	6,25	11 ^b	12 ^b	14 ^a
0,2	12,5	11 ^b	12 ^b	13 ^a
0,2	25,0	12 ^a	12 ^a	13 ^a
0,5	6,25	13 ^a	12 ^a	14 ^a
0,5	12,5	12 ^a	13 ^a	14 ^a
0,5	25,0	13 ^a	13 ^a	14 ^a
1,0	6,25	15 ^b	15 ^b	19 ^a
1,0	12,5	15 ^b	15 ^b	17 ^a
1,0	25,0	16 ^a	16 ^a	16 ^a
2,0	6,25	18 ^b	20 ^a	21 ^a
2,0	12,5	18 ^b	20 ^a	20 ^a
2,0	25,0	20 ^a	19 ^a	19 ^a

*o diâmetro do halo de inibição inclui 6 mm do poço perfurado **cada valor é a média de nove medições

*** para uma mesma linha, valores seguidos da mesma letra não apresentaram diferença estatística entre si (p<0,05).

A interferência da nisina na ação de outros antimicrobianos parece depender do microrganismo alvo e da natureza desses antimicrobianos. Periago, Palop e Fernandez (2001) observaram que a combinação de nisina e timol (componente do óleo essencial de orégano) foi muito eficiente contra células vegetativas de *Bacillus cereus*, apresentando efeito sinérgico. Em outra pesquisa, quando óleo essencial de orégano foi utilizado combinado com nisina, observou-se um efeito sinérgico para *Listeria monocytogenes*, aumentando a atividade da bacteriocina (SILVA *et al.*, 2005). Heleander *et al* (1998) estudaram a ação de diversos antimicrobianos sobre bactérias Gram negativas e verificaram que a combinação de nisina com compostos orgânicos componentes dos óleos essenciais não aumentou a atividade antimicrobiana. Esses autores mostraram também que a presença de nisina em baixas concentrações estabilizou a membrana externa e protegeu células de *E. coli* e *Salmonella* spp. de danos na membrana causados por ácidos cítrico e lático.

3.2. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DOS OEO POR CG-MS

A Figura 7 apresenta os cromatogramas dos OEO estudados.

Figura 7 – Cromatogramas dos OEO das marcas A, B, C, D, E.

Todos os cromatogramas apresentaram um grande pico num mesmo tempo de retenção que, comparado a um padrão, foi identificado como carvacrol. Pode-se afirmar que todos OEO analisados neste trabalho possuem carvacrol como componente predominante, com variação entre 61,7% e 93,4% do total de voláteis detectados em cada óleo.

Os picos dos cromatogramas estão identificados na Figura 8, onde é possível observar a presença de dezessete componentes voláteis nos OEO comerciais analisados. Depois do carvacrol, o timol foi o segundo principal componente, sendo detectado em três dos cinco OEO analisados (marcas A, B e C), com teores de 14,79% na marca A, 23,85% na marca B e 1,88% na marca C.

Figura 8 – Composição química dos OEO das marcas A, B, C, D, E.

Os teores do quatro principais componentes encontrados nos OEO das cinco marcas estudadas, determinados através da análise por GC-IE-MS, estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Teor de carvacrol, γ -terpineno, p-cimeno e timol em óleo essencial de orégano de cinco diferentes marcas (A, B, C, D e E).

Componente	Teor (%) por marca				
	A	B	C	D	E
Carvacrol	74,45	67,73	72,61	93,42	61,66
γ -Terpineno	-	-	-	-	6,90
p-Cimeno	-	-	0,63	-	15,95
Timol	14,79	23,85	1,88	-	-

Os resultados de composição dos OEO estão de acordo com aqueles encontrados por vários pesquisadores que analisaram os componentes de óleos essenciais de orégano por GC-IE-MS. Kokkini *et al.* (1997) coletaram orégano da região noroeste e sudeste da Grécia e observaram a presença dominante de carvacrol nas amostras provenientes do noroeste e timol nas do sudeste, para uma mesma época do ano (outono ou verão). No entanto, em ambas marcas o teor de carvacrol sempre era maior no verão, uma vez que o teor dos compostos fenólicos aumenta na florescência. Outros pesquisadores também constataram que carvacrol e timol são os principais constituintes e os responsáveis pela atividade antimicrobiana de OEO (CHI; ZIVANOVIC; PENFIELD, 2006; LAMBERT *et al.*, 2001; SIVROPOULOU *et al.*, 1996). Além disso, há evidências de que alguns componentes presentes em menor quantidade que os compostos fenólicos, como γ -terpineno e p-cimeno, interferem na atividade antimicrobiana por produzirem efeito sinérgico entre os demais componentes (PASTER *et al.*, 1995).

Na Figura 8 também pode ser observado que γ -terpineno e p-cimeno (monoterpenos precursores do carvacrol) são constituintes secundários e presentes em menor quantidade no óleo da marca E, proveniente da região do Mediterrâneo. Muitos pesquisadores que analisaram orégano procedente dessa região encontraram resultados semelhantes. Kokkini *et*

al. (1997) verificaram que no orégano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) proveniente de três regiões geográficas diferentes na Grécia, a soma do teor dos quatro componentes principais foi semelhante nas plantas colhidas no verão e no outono. No entanto, esses autores observaram também que o teor de cada componente no orégano colhido em uma mesma região variou em relação à época do ano. No verão, o teor de p-cimeno no orégano foi menor, independente da região. A quantidade de carvacrol no orégano das três regiões estudadas variou independente da época da colheita: em uma das regiões, o teor de carvacrol ficou entre 1,7 e 2,5%, enquanto nas outras duas as concentrações variaram de 57,4 a 69,6%. O inverso aconteceu com o timol (CHORIANOPOULOS *et al.*, 2004; DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003; KOKKINI *et al.*, 1997; SIVROPOULOU *et al.* 1996).

Geralmente os óleos essenciais extraídos de plantas colhidas durante ou imediatamente após o florescimento possuem atividade antimicrobiana mais intensa (MARINO; BERSANI; COMI, 1999). O orégano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) cultivado no sul da Croácia, colhido durante cinco meses entre abril e agosto, apresentou variações nos teores de 28 componentes identificados, apresentando a maior concentração de todos eles no período de florescimento em julho com um significativo decréscimo em agosto (JERKOVIC; MASTELIC; MILOS, 2001). No orégano croata, o teor de timol é mais elevado que de carvacrol, sendo similar ao orégano de uma das regiões da Grécia reportado por Kokkini *et al.* (1997).

Com relação à atividade antimicrobiana dos OEO estudados, os resultados indicaram que o OEO das marcas A e B, que contém timol, na concentração de 0,1% apresentaram halos de inibição de SE maiores do que os óleos que não possuem timol. Outros autores também observaram que as bactérias Gram negativas são mais sensíveis ao timol do que ao carvacrol (SIVROPOULOU *et al.*, 1996, CHORIANOPOULOS *et al.*, 2004). Entretanto, esses autores

comprovaram que as bactérias Gram positivas são mais sensíveis à ação de OEO do que as Gram negativas.

Chorianopoulos *et al.* (2004) afirmaram que atividade antimicrobiana não se deve somente à presença de timol e carvacrol, mas que a presença de outros componentes em baixas concentrações pode provocar interações sinérgicas, aditivas ou antagônicas. Baydar *et al.* (2004) testou um OEO com 53% de carvacrol e timol e outro OEO com 87% desses mesmos componentes e, como resultado, verificou que o primeiro OEO, mesmo tendo menos carvacrol e timol, apresentou uma ação antimicrobiana mais efetiva por causa da presença de p-cimeno e γ -terpineno. Segundo Ultee *et al.*, (2000) o p-cimeno não tem efeito antibacteriano se usado sozinho, mas quando combinado com carvacrol ocorre sinergismo entre os dois. Neste trabalho, entre os cinco OEO avaliados, o óleo da marca E foi o que apresentou o menor teor de carvacrol (61,7%) e os maiores halos de inibição a partir da concentração 0,2%. Possivelmente isso ocorreu devido à presença de p-cimeno e também de γ -terpineno nesse óleo. Já o OEO da marca D, que tinha o teor mais elevado de carvacrol (93,4%) mas não tinha p-cimeno ou γ -terpineno, apresentou halos menores que os do OEO da marca E. Segundo Burt (2004), o p-cimeno facilita o transporte do carvacrol através da membrana citoplasmática para o interior da célula bacteriana, o que provavelmente não ocorreu de forma efetiva com o carvacrol do OEO da marca D por causa da ausência de p-cimeno.

3.3. SOBREVIVÊNCIA DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS EM SALADA DE LEGUMES COM MAIONESE DURANTE ARMAZENAMENTO EM REFRIGERAÇÃO (8°C) E EM TEMPERATURA AMBIENTE (30°C)

As maioneses preparadas com os quatro emulsificantes descritos em 2.5 variaram em estabilidade da emulsão e também no pH durante o armazenamento por 15 dias em refrigeração, como pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8 – pH das maioneses formuladas com quatro emulsificantes diferentes após 1 e 15 dias de armazenamento sob refrigeração.

Maionese	pH	
	1º dia	15º dia
ovo em pó	3,67	3,76
gema em pó	4,14	4,14
ovo integral pasteurizado	3,97	3,97
gema líquida	3,51	3,58
maionese comercial	3,51	3,51

Em função dessas características, a maionese utilizada para o desenvolvimento dessa etapa da pesquisa foi aquela formulada com gema em pó, com pH aumentado para 4,2 de forma a permitir a multiplicação de SE.

A Tabela 9 e Figura 9 mostram a sobrevivência de SE em salada de legumes com maionese contendo 0,2% de OEO durante armazenamento em refrigeração (8°C). A Tabela 10 e Figura 10 mostram a sobrevivência de SE em salada de legumes com maionese contendo 0,2% de OEO durante armazenamento a 30°C.

Tabela 9 - Médias das contagens de *Salmonella* Enteritidis na salada de legumes com maionese controle e na salada de legumes com maionese contendo 0,2% de óleo essencial de orégano da marca E, mantidas a 8°C.

Salada de legumes com maionese	Contagem de colônias (UFC/g) de SE x tempo						
	8 °C	0h	1h	2h	4h	8h	24h
Controle		154 ^{A,a}	169 ^{A,a}	153 ^{A,a}	173 ^{A,a}	120 ^{A,a}	159 ^{A,a}
Com 0,2% (p/p) de OEO		139 ^{A,a}	144 ^{A,a}	104 ^{A,b}	107 ^{A,b}	102 ^{A,a}	112 ^{A,a}

*para uma mesma linha, valores seguidos da mesma letra maiúscula não apresentaram diferença estatística entre si (p<0,05);

para uma mesma coluna, valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentaram diferença estatística entre si (p<0,05)

**média da contagem de três experimentos em duplicata

Figura 9 - Sobrevivência de SE na salada de legumes com maionese controle e na salada de legumes com maionese contendo 0,2% de óleo essencial de orégano da marca E, mantidas a 8°C

Tabela 10 - Médias das contagens de *Salmonella* Enteritidis na salada de legumes com maionese controle e na salada de legumes com maionese contendo 0,2% de óleo essencial de orégano da marca E, mantidas a 30°C.

Salada de legumes com maionese	Contagem de colônias (UFC/g) de SE x tempo						
	30°C	0h	1h	2h	4h	8h	24h
Controle		143 ^{A,a}	136 ^{A,a}	162 ^{A,a}	159 ^{A,a}	124 ^{A,a}	131 ^{A,a}
Com 0,2% (p/p) de OEO		114 ^{A,a}	132 ^{A,a}	133 ^{A,a}	106 ^{A,b}	130 ^{A,a}	114 ^{A,a}

*para uma mesma linha, valores seguidos da mesma letra maiúscula não apresentaram diferença estatística entre si (p<0,05);

para uma mesma coluna, valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentaram diferença estatística entre si (p<0,05)

**média da contagem de três experimentos em duplicata

Figura 10 - Sobrevivência de SE na salada de legumes com maionese controle e na salada de legumes com maionese contendo 0,2% de óleo essencial de orégano da marca E, mantidas a 30°C

Os resultados indicam que a redução na contagem de SE na salada de legumes com maionese contendo 0,2% de OEO foi inferior a 0,5 log UFC/g por um período de 24 horas a 8°C e por um período de 4 horas a 30°C, em relação ao controle (Figuras 9 e 10).

É importante notar que o pH e a Aa da maionese aumentaram com a adição de salada de legumes (Tabela 11), indicando que a segurança microbiológica da maionese é diminuída quando ela é misturada com outros ingredientes, permitindo a multiplicação microbiana (DAVIDSON; NAIDU, 2000; ICMSF, 2005). Assim, o uso de maionese contendo OEO para preparação de salada de legumes com maionese constitui-se em uma barreira adicional para a multiplicação de SE, mesmo que a diferença de contagem no produto com e sem OEO seja inferior a 0,5 log UFC/g.

Tabela 11 – pH e Aa de maionese base, salada de legumes com maionese controle e salada de legumes com maionese adicionada de 0,2% de OEO

	pH*	Aa*
maionese base	4,22	0,955
salada de legumes com maionese controle	4,79	0,970
salada de legumes com maionese com 0,2% de OEO	4,81	0,970

*cada valor é a média de três experimentos

A literatura científica é muito limitada em estudos semelhantes que permitam uma comparação dos resultados disponíveis com os obtidos nesta pesquisa. Roller e Covill (2000) testaram a sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis inoculada em maionese preparada com suco de limão (pH 4,4 a 4,5) adicionado ou não de quitosana como antimicrobiano e estocada a 5 ou 25 °C por 8 dias. Como resultado, SE manteve a mesma viabilidade por 8 dias a 5°C na ausência de quitosana e apresentou redução de apenas 0,5 log UFC/g na presença de quitosana.

Inúmeros estudos comprovam que a eficiência *in vitro* dos antimicrobianos é significativamente diminuída quando testados em modelo alimentar (ROLLER; COVILL, 2000; POL *et al.*, 2001; LIS-BALCHIN *et al.*, 1998; LEUSCHNER; ZAMPARINI, 2002). A presença de lipídios, carboidratos, proteínas, sal sabidamente influenciam a atividade antimicrobiana. Smith-Palmer, Stewartt e Fyfe (2001) testaram óleos essenciais de cravo e canela contra SE em queijo com baixo (16%) ou alto (30%) teor de lipídios e ambos óleos testados foram mais eficientes no queijo com baixo teor de gordura. O resultado encontrado por esses pesquisadores pode dever-se ao fato da gordura formar uma barreira protetora envolvendo a bactéria ou à possibilidade da fração de lipídio absorver o óleo essencial. Dessa forma, pode-se especular que a maionese não seja um produto adequado para a aplicação de um óleo essencial como antimicrobiano, uma vez é um produto com aproximadamente 70% de gordura dificultando a ação do OEO que fica disperso nos glóbulos de gordura enquanto SE se multiplica na fase aquosa.

O aumento da segurança através do aumento na concentração de OEO nesses produtos nem sempre é possível, pois podem tornar-se sensorialmente inaceitáveis. Conclui-se, portanto, que para diminuir o risco de infecção alimentar por SE em maionese ou alimentos contendo maionese é necessário acrescentar outras barreiras além da temperatura e da adição de OEO como antimicrobiano natural. É importante ressaltar que o uso de bioconservadores se caracteriza por ser uma barreira adicional às Boas Práticas de Fabricação (BPF) e ao programa HACCP (“Hazard Analysis Critical Control Point”), ambos impostos por lei também no Brasil (BRASIL, 1993; BRASIL, 1998).

3.4. ANÁLISE SENSORIAL

Os resultados obtidos no teste de aceitabilidade do aroma da maionese adicionada de OEO mostraram que a aceitação variou desde “gostei extremamente” até “desgostei extremamente”, tanto em termos de aroma como de sabor.

Os valores estratificados da aceitabilidade do aroma da maionese com 0% ; 0,5% ou 1% de OEO marcados pelos consumidores na escala hedônica podem ser observados nas Figuras 11, 12 e 13, respectivamente.

Figura 11 - Aceitabilidade estratificada do aroma de maionese com 0% de óleo essencial de orégano.

Figura 12 - Aceitabilidade estratificada do aroma de maionese com 0,5% de óleo essencial de orégano.

Figura 13 - Aceitabilidade estratificada do aroma de maionese com 1% de óleo essencial de orégano.

Do total de consumidores, 77% gostou do aroma do produto sem adição de OEO, enquanto 50% gostou do aroma com 0,5% de OEO e 40% gostou com 1% de OEO (Figuras 14, 15 e 16). Houve diminuição da aceitação do aroma do produto na medida em que a concentração de OEO aumentou de 0,5% para 1%. No entanto, é importante considerar que a aceitabilidade do produto sem OEO foi apenas regular (inferior a 80%).

Figura 14 - Aceitabilidade do aroma de maionese com 0% de óleo essencial de orégano.

Figura 15 - Aceitabilidade do aroma de maionese com 0,5% de óleo essencial de orégano.

Figura 16 - Aceitabilidade do aroma de maionese com 1% de óleo essencial de orégano.

Em relação à aceitabilidade do sabor, apenas um consumidor “desgostou ligeiramente” da maionese sem adição de OEO, enquanto os demais consumidores assinalaram na porção superior da escala hedônica (notas entre seis e nove) perfazendo 20% de “gostou ligeiramente”, 13% de “gostou regularmente”, 47% de “gostou muito” e 17% de “gostou extremamente” (Figura 17).

Figura 17 - Aceitabilidade estratificada do sabor da maionese com 0% de óleo essencial de orégano.

A adição de 0,5% de OEO provocou rejeição ao produto e 51% dos consumidores assinalou que “desgostou extremamente”. Com a adição de 1% de OEO a aceitabilidade piorou, sendo que 64% dos consumidores “desgostaram extremamente” do produto e apenas uma pessoa “gostou regularmente”. Os valores estratificados da aceitabilidade do sabor da maionese com 0,5% ou 1% de OEO podem ser observados nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

Figura 18 - Aceitabilidade estratificada do sabor da maionese com 0,5% de óleo essencial de orégano.

Figura 19 - Aceitabilidade estratificada do sabor da maionese com 1,0% de óleo essencial de orégano.

Do total de consumidores, 97% gostou do sabor do produto sem adição de OEO, enquanto apenas 24% gostou do sabor com 0,5% de OEO e 3% gostou com 1% de OEO (Figuras 20, 21 e 22). Na medida em que o teor de OEO adicionado à maionese aumentou, a aceitabilidade diminuiu consideravelmente, podendo-se considerar aqueles com adição de OEO praticamente rejeitados, principalmente com 1% de OEO.

Figura 20 - Aceitabilidade do sabor de maionese com 0% de óleo essencial de orégano.

Figura 21 - Aceitabilidade do sabor de maionese com 0,5% de óleo essencial de orégano.

Figura 22 - Aceitabilidade do sabor de maionese com 1,0% de óleo essencial de orégano.

Esses resultados indicaram a inviabilidade de aumentar a concentração do OEO na maionese como alternativa para melhorar o efeito antimicrobiano. Dessa forma, as análises microbiológicas para avaliação da sobrevivência de SE em salada de legumes com maionese foram realizadas com óleo essencial da marca E, o qual mostrou melhor desempenho nos testes *in vitro*, na concentração testada imediatamente inferior a 0,5%, ou seja, 0,2% do peso final da maionese.

3.4.1. Aceitabilidade da salada de legumes com maionese adicionada óleo essencial de orégano

Os resultados obtidos no teste de aceitabilidade da maionese adicionada de OEO da marca E mostraram que variou desde “gostei extremamente” até “desgostei extremamente” (Figuras 23 a 26), tanto em termos de aroma como de sabor.

Dos 61 consumidores que provaram a salada de legumes com maionese adicionada de 0,2% de OEO da marca E, 60% “gostaram muito” e 0% desgostaram do aroma. Os valores estratificados da aceitabilidade do aroma da maionese com 0,2% de OEO da marca E marcados pelos consumidores na escala hedônica podem ser observados na Figura 23.

Figura 23 – Aceitabilidade estratificada do aroma da salada de legumes com maionese adicionada de 0,2% de óleo essencial de orégano

Do total de consumidores que provaram o produto, 95% gostou do aroma, o que é considerado como ótima aceitabilidade (Figura 24).

■ Gostou
 ■ Não gostou nem desgostou
 ■ Desgostou

Figura 24 – Aceitabilidade do aroma da salada de legumes com maionese adicionada de 0,2% de óleo essencial de orégano da marca E

Em relação ao sabor, dos consumidores que provaram a salada de legumes com maionese adicionada de 0,2% de OEO da marca E, 8% “gostou extremamente”, 50% “gostou muito”, 30% “gostou regularmente”, 5% “gostou ligeiramente”, 5% “não gostou nem desgostou”, 2% “desgostou regularmente” e 0% desgostou “ligeiramente, muito ou extremamente”. Os valores da aceitabilidade estratificada podem ser observados na Figura 25.

Figura 25 – Aceitabilidade estratificada do sabor da salada de legumes com maionese adicionada de 0,2% de óleo essencial de orégano da marca E

Do total de consumidores que provaram esse produto, 93% gostou do sabor (Figura 26), o que é considerado como ótima aceitabilidade (DELLA MODESTA, 1994).

Figura 26 – Aceitabilidade do sabor da salada de legumes com maionese adicionada de 0,2% de óleo essencial de orégano da marca E

Alguns consumidores preencheram a área da ficha reservada para comentários e fizeram observações a respeito do produto. Em relação ao aroma, apenas seis consumidores fizeram comentários. Dois deles não observaram mudança e comentaram que o aroma era parecido com o de qualquer outra maionese. Os outros quatro consumidores identificaram um “aroma suave de orégano”. Vinte e nove consumidores comentaram o sabor. Sete deles acharam que os legumes interferiram no sabor da maionese e que essa deveria ser degustada pura com torradas. Ao contrário desses, outros dois afirmaram que a maionese era “bem temperada, mas que não retirava o sabor da comida”. Cinco pessoas comentaram que o sabor era muito acentuado e outras três (5%) sugeriram diminuir o teor de OEO. Duas pessoas identificaram um sabor residual, o que foi considerado como aspecto negativo no uso do OEO. Um único consumidor definiu o sabor como ácido no início, mas agradável no final. Seis consumidores acharam o sabor agradável e diferente, enquanto três outros definiram o sabor como “gosto leve” que melhorou o sabor dos legumes. Dois consumidores sugeriram

preparos culinários como pastas, salada de folhas, sanduíches, petiscos, o que nos fez crer que o uso de maionese com OEO pode ser variado.

3.4.2. Intenção de compra da maionese adicionada de óleo essencial de orégano

O teste de consumidor mostrou que a intenção de compra foi regular (inferior a 80% de aceitação, uma vez que 74% dos consumidores indicaram que comprariam a maionese com 0,2% de OEO da marca E, 10% talvez comprassem e 16% afirmaram que não comprariam (Figura 27).

Figura 27 – Intenção de compra da maionese com 0,2% de óleo essencial de orégano da marca E.

4. CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos nesse trabalho, é possível concluir que:

1. O óleo essencial de orégano (OEO) interferiu na multiplicação de *Salmonella* Enteritidis (SE) quando avaliado *in vitro* em todas as concentrações testadas.
2. Na ação *in vitro*, o efeito antimicrobiano do OEO contra SE é melhor quando usado individualmente do que em combinação com nisina.
3. Na ação na maionese preparada artesanalmente misturada com a salada de legumes, a presença de 0,2% de OEO resultou em uma redução na contagem de SE, constituindo-se em uma barreira adicional para a multiplicação do patógeno nesse produto.
4. A análise sensorial da salada de legumes com maionese contendo 0,2% de OEO indicou que houve aceitação de aroma e sabor e intenção de compra regular.
5. A análise sensorial da maionese contendo 0,5% ou 1% de OEO indicou a inviabilidade de se aumentar a concentração do OEO na maionese como alternativa para melhorar o efeito antimicrobiano.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEE, T., KROCKEL, L., HILL, C., Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, 28, p. 169-185, 1995.

ALZOREKY, N.S., NAKAHARA, K. Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. **International Journal of Food Microbiology**, 80, p. 223–230, 2002.

BAGAMBOULA, C.F., UYTENDAELE, M., DEBEVERE, J. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. **Journal of Food Protection** 66, p.668–673, 2003.

BAYDAR, H. SAGDIÇ, O.; ÖZKAN G.; KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, 15, p. 169-172, 2004.

BOONMAR, S., BANGTRAKULNONT, A, PORNRUNANGWONG, S., TERAJIMA, J., WATANABE, H., KANEKO, K., OGAWA, M. Epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* isolates from humans and broiler chickens in Thailand by phages typing and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.4, p. 971-974, 1998

BRADSHAW, J.G., SHAH, D.B., FORNEY, E. Growth of *Salmonella enteritidis* in yolk of shell eggs from normal and seropositive hens. **Journal of Food Protection** Ames, v.53, p.1033-1036, 1990.

BRANEN, J., DAVIDSON, P.M. Activity of hydrolysed lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria in growth media: the effect of EDTA. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p. 233-237, 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº1428, de 26 de novembro de 1993. Aprova o Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos, Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos e Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade para Serviços e Produtos na Área de Alimentos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 02 de dezembro de 1993. Seção 1, pt.1.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO Portaria nº 46 de 10 de fevereiro de 1998. Institui o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC a ser implantado, gradativamente, nas indústrias de produtos de origem animal sob o Serviço de Inspeção Federal – SIF, de acordo com o Manual Genérico de Procedimentos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 16 de março de 1998.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Requeijão. Portaria nº 359 de 4 de setembro de 1997. Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil], 1997.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 02 de janeiro de 2001.

BRUL, S., COOTE, P. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, 50, p.1–17, 1999.

BURT, S.A., REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology** v.36 n.3, p.162–167, 2003.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, 94, p.223– 253, 2004.

CARSON, C.F., MEE, B.J., RILEY, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.6, p.1914–1920, 2002.

CHEN, Y., MONTVILLE, T. J., Efflux of ions and ATP depletion induced by Pediocin PA-1 are concomitant with cell death in *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Applied Bacteriology**, 79, p.684-690, 1995.

CHI, S., ZIVANOVIC, S., PENFIELD, M. P. Application of chitosan films enriched with oregano essential oil on bologna- active compounds and sensory attributes. [Food Science and Technology International](#), v.12, n.2, p.111-117, 2006.

CHORIANOPOULOS, N., KALPOUTZAKIS, E., ALIGIANNIS, N., MITAKU, S. NYCHAS, G.J., HAROUTOUNIAN, S.A. Essential Oils of Satureja, Origanum, and Thymus Species: Chemical Composition and Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, p.8261-8267, 2004.

CINTAS, L. M.; HERRANZ, C.; HERNÁNDEZ, P. E.; CASAUS, M. P., NES, L. F. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. [Food Science and Technology International](#), 7, p. 281-305, 2001.

CLEVELAND, J, MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L.; Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Review article. **International Journal of Food Microbiology**, 71, p. 1-20, 2001.

CNNPA - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos – Resolução nº 12 de 1978. D.O.U. de 24/07/1978.

CONNER, D.E., BEUCHAT, L.R., WORTHINGTON, R.E., HITCHCOCK, H. L. Effects of essential oils and oleoresins of plants on ethanol production, respiration and sporulation of yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v.1, p.63-74, 1984.

CONSENTINO, S., TUBEROSO, C.I.G., PISANO, B., SATTA, M., MASCIA, V., ARZEDI, E., PALMAS, F. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology** 29, p.130-135, 1999.

COTTER, P. D., HILL, C., ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 777-788, 2005.

COUTRE, J. le; Taste: The Metabolic Sense. **Food Technology**, v.57, n.8, p.34-37, 2003.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.** 12 (4), p.564–582, 1999.

COX, S.D., MANN, C.M., MARKHAM, J.L., BELL, H.C., GUSTAFSON, J.E., WARMINGTON, T.R., WYLLIE, S.G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology** 88, p.170–175, 2000.

CRESSY, H.K., JERRETT, A.R., OSBORNE, C.M., BREMER, P.J. A novel method for the reduction of numbers of *Listeria monocytogenes* cells by freezing in combination with an essential oil in bacteriological media. **Journal of Food Protection** v.66, n.3, p.390–395, 2003.

CVE, 2000. CVE - Centro de Vigilância epidemiológica da Secretaria do Estado de São Paulo INFORME NET DTA – Informações sobre Doenças Transmitidas por água e alimentos / Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dt_estat.htm> Acesso em: 02 de junho de 2007.

CVE, 2007a. Centro de Vigilância epidemiológica da Secretaria do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF_59sem.htm>. Acesso em: 02 de junho de 2007.

CVE, 2007b. Centro de Vigilância epidemiológica da Secretaria do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dta_estat.htm> Acesso em: 02 de junho de 2007.

DAFERERA, D.J., ZIOGAS, B.N., POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils in the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, 22, p.39– 44, 2003.

DAVIDSON, P.M., NAIDU, A.S. Phyto-Phenols. In: Naidu, A.S. (Ed.), Natural Food Antimicrobial Systems. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 265–294, 2000.

DEEGAN, L.H., COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, P. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, 16, p. 1058-1071, 2006.

DE MARTINIS, E.C.P. e FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of foodborne pathogens by bacteriocin-producing *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus sake* isolated from “lingüiça frescal”. **Revista de Microbiologia**, 28, p.284-287, 1997.

DE MARTINIS, E.C.P. e FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. **International Journal of Food Microbiology**, 42, p.119-126, 1998.

DE MARTINIS, E.C.P., ALVES, V.F., FRANCO, B.D.G.M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, v.18, n.2 &3, p.191-208, 2002.

DELAQUIS, P.J., STANICH, K., GIRARD, B., MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, 74, p.101-109, 2002.

DELLA MODESTA, R. C. **Manual de análise sensorial de alimentos e bebidas: geral**. T. 1, 115p. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1994.

DELVES- BROUGHTON, J. Nisin and its application as a food preservative. **J. Society of Dairy Technology**, v.43, n.3, p.73-76, 1990.

DELVES- BROUGHTON, J., BLACKBOURN, P., EVANS, R. J., HUGENHOLTZ, J. Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie Leewenhoek*, v.69, p.193-201, 1996.

DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology** 88, p.308–316, 2000.

DRIDER, D., FIMLAND, G., HÉCHARD, Y., MCMULLEN, L. M., PRÉVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.

DUPONT, S., CAFFIN, N., BHANDARI, B., DYKES G. A. *In vitro* antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria. **Food Control**, 17, p.929–932, 2006.

ECKNER, K.F. Ph.D.; Bacteriocins and Food Applications. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 12, n. 4, p. 204-209, 1992.

FALCONE, P., SPERANZA, B., DEL NOBILE, M. A., CORBO, M. R., SINIGAGLIA, M. A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative. **Journal of Food Protection**, v.68, n.8, p.1664–1670, 2005.

FALEIRO, M. L. , MIGUEL, M.G., LADEIRO, F., VENANCIO, F, TAVARES, R., BRITO, J.C., FIGEIREDO, A.C., BARROSO, J.G., PEDRO, .G. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of Thymus. **Letters in Applied Microbiology** v.36, p.35-40, 2002.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. **In: 45^a REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA**. 45., 2000, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p.255-258.

FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M., DESTRO, M. T., GELLI, D.S. Foodborne Diseases in Southern South America. **International Handbook of Foodborne Pathogens** cap.45, 2003.

FRIEDMAN M, HENIKA PR, MANDRELL RE. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, v.65, n.10, p.1545-1560, 2002

GELINSKI, J.M.L.N. Bacteriocina de *Lactobacillus sake* 2a: potencial de aplicação em combinação com outras substâncias antimicrobianas na inibição de cepas de *Salmonella* de origem alimentar. Tese para obtenção do grau de Doutor. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2003.

GRIFFIN, S.G., WYLLIE, S.G., MARKHAM, J.L., LEACH, D.N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flav. Frag., J.**, 14, p.322–332, 1999.

HAMMER, K. A., CARSON, C. F., RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.985-990, 1999.

HARRIS, L.J., DAESCHEL, M.A., STILES, M.E. e KLAENHAMMER, T.R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.53, p.384-387, 1989.

HELANDER, I.M., ALAKOMI, H.-L., LATVA-KALA, K., MATTILA-SANDHOLM, T., POL, I., SMID, E.J., GORRIS, L.G.M., WRIGHT, A.V. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, p.3590–3595, 1998.

HOFER, E., SILVA FILHO, S. J., REIS, E. M. F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.18, n.1, p.21-27, 1998.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Microorganisms in Foods 6. Microbial Ecology of Food Commodities. 2nd ed. Kluwer Academic, New York, 2005.

ISAACS, S., ARAMINI, J., CIEBIN, B., FARRAR, J. A., AHMED, R., MIDDLETON, D., CHANDRAN, A. U., HARRIS, L. J., HOWES, M., CHAN, E., PICHETTE, A. S., CAMPBELL, K., GUPTA, A., LIOR, L. Y., PEARCE, M., CLARK, C., RODGERS, F., JAMIESON, F., BROPHY, I., ELLIS, A. An International Outbreak of Salmonellosis Associated with Raw Almonds Contaminated with a Rare Phage Type of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Food Protection**, v. 68, n.1, p.191–198, 2005.

JERKOVIC, I., MASTELIC, J., MILOS, M. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. **International Journal of Food Science and Technology**, 36, p.649– 654, 2001.

JULIANO, C., MATTANA, A., USAI, M. Composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of Thymus herba-barona Loisel growing wild in Sardinia. **Journal of Essential Oil Research**, 12, p.516–522, 2000.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 4. ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1995.

KIVANÇ, M., AKGUL, A., DOGAN, A. Inhibitory and stimulatory effects of cumin, oregano and their essential oils on growth and acid production of Lactobacillus plantarum and Leuconostoc mesenteroides. **International Journal of Food Microbiology**, 13, p.81–86, 1991.

KLAENHAMMER, T.R., Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, 12, p.39-86, 1993.

KOKKINI, S., KAROUSOU, R., DARDIOTI, A., KRIGAS, N., LANARAS, T. Autumn essential oils of Greek oregano. **Phytochemistry**, v.44, n.5, p.883-886, 1997.

KUBO, I., FUJITA, K. Naturally occurring anti-*Salmonella* agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, p.5750-5754, 2001.

KULISIC, T., RADONIC, A., KATALINIC, V., MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v.85, n.4, p. 633-640, 2004.

LAMBERT, R.J.W., SKANDAMIS, P.N., COOTE, P.J., NYCHAS, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, 91, p.453–462, 2001.

LAUKOVÁ, A.; *In vitro* treatment of different isolates from cattle dung and pig slurry by nisin. **Acta Veterinaria Brno.**, 69, p.147-151, 2000.

LEISTNER, L. Combined methods for food preservation. In: hafiurr Rahman, M. (Ed.), *Handbook of Food Preservation*. arcel Dekker, New York, pp. 457– 485, 1999.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology: Review. **International Journal of Food Microbiology**, 55, p.181–186, 2000.

LEUSCHNER, R. G. K., ZAMPARINI, J. Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli* O157 and *Samonella enterica* serovar Enteritidis in broth model systems and mayonnaise. **Food Control**, 13, p.399-404, 2002.

LIN, Y. T. , LABBE, R. G. , SHETTY, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Fish and Meat Systems by Use of Oregano and Cranberry Phytochemical Synergies. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.9, p.5672-5678, 2004.

LIS-BALCHIN, M., BUCHBAUER, G., HIRTENLEHNER, T., RESCH, M., Antimicrobial activity of Pelargonium essential oils added to a quiche filing as a model food system. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.207-210, 1998.

LUCCHINI, J.J., CORE, J., CREMIEUX, A. Antibacterial activity of phenolic compounds and aromatic alcohols. **Research in Microbiology**, v. 141, n. 4, p.499–510, 1990.

MARINHO, S. C., NASCIMENTO, A. R., MOUCHREK FILHO, V. E., MOUCHREK FILHO, J. E., MARTINS, A. G. L. A., TELES, R. M., MONTEIRO, O. S. Atividade antibacteriana do óleo essencial da espécie *Pimenta dióica* (L.) Merr. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 068, Campinas, 2005. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), 77, 2005.

MARINO, M., BERSANI, C., COMI, G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. **Journal of Food Protection**, v. 62, n.9, p.1017-1023, 1999.

MARINO, M., BERSANI, C., COMI, G. Impedance measurement to study antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, 67, p.187–195, 2001.

MARTINEZ, R. C. R. AND DE MARTINIS, E. C. P. Effect of *Leuconosoc mesenteroides* 11 bacteriocin in the multiplication control of *Listeria monocytogenes*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26, p. 52-55, 2006.

MEILGAARD, M., CIVILLE, G.V., CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**. United States of America – Florida: CRC. 3ª edição, 1999. 387p.

MONTVILLE, T.J.; WINKOWSKY, K.; Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In: DOYLE, B. e MONTVILLE; **Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers**, cap.30, p.566-567, 1997.

NAIDU, A. S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. CRC Press, Boca Raton, FL 818pp , 2000.

NAZER, A. I., KOBILINSKYB, A., THOLOZANA, J-L. DUBOIS-BRISSENETA, F. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? **Food Microbiology**, 22, 391–398, 2005.

NOGUEIRA, B.T.C.P., FRANCO, B.D.G.M. Recovery of acid injured salmonellae from artificially contaminated mayonnaise. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.26, n.1, p.28-31, 1995.

OLASUPO N. A., FITZGERALD, D. J., GASSON, M. J., NARBAD, A. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Letters in Applied Microbiology**, 36, p.448-451, 2003.

OPAS. Organización Panamericana de la Salud. Sistema Regional de Información para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Disponível em: <http://www.panalimentos.org/sirveta/e/index.htm>. Acesso em: 07 de fevereiro de 2003.

OUSSALAH, M., CAILLET, S., SAUCIER, L., LACROIX, M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, 73, p.236–244, 2006.

PASCUAL, M., HUGAS, M., BADIOLA, J. I., MONFORT, J. M., GARRIGA, M. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n.11, p.4981-4986, 1999.

PASTER, N.; MENASHEROV, M.; RAVID, U.; JUVEN, B. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. **Journal of Food Protection**, v.58, n. 1, p. 81-85, 1995.

PERIAGO, P.M.; MOEZELAAR, R.; Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 141-148, 2001.

PERIAGO, P.M., PALOP A., FERNÁNDEZ P.S. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. [Food Science and Technology International](#), v.7, n.6, p.487-492, 2001.

PERIAGO, P.M.; CONESA, R.; DELGADO, B.; FERNÁNDEZ, P.S.; PALOP, A. *Bacillus megaterium* spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials, **Food Technol. Biotechnol.**, v. 44, n. 1, p. 17-23, 2006.

PINTORE, G., USAI, M., BRADESI, P., JULIANO, C., BOATTO, G., TOMI, F., CHESSA, M., CERRI, R., CASANOVA, J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavor and Fragrance Journal** v. 17, p. 15-19, 2002.

POL, I. E., SMID, E. J. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**. v.29, p.166-170, 1999.

POL, I. E.; MASTWIJK, H.C.; SLUMP, R.A.; POPA, M.E.; SMID, E.J.; Influence of Food Matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. **Journal of Food Protection**, vol. 64, nº 7, p. 1012-1028, 2001.

RAJASHEKARA, G., MUNIR, S., ALEXEYEV, M.F., HALVORSON, D. A., WELLS, C. L., NAGARAJA, K. V. Pathogenic role of SEF14, SEF17 and SEF21 fimbriae in *Salmonella enterica* serovar enteritidis infects chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.4, p.1759-1763, 2000.

REMMAL, A.; BOUCHIKHI, T.; TANTAOU-ELARAKI, A.; ETTAYEB, M.; Inhibition of Antibacterial Activity of Essential Oils by Tween 80 and ethanol in Liquid medium, **J. Pharm. Belg.**, v.48, n.5, p.352-356, 1993.

RHAYOUR, K., BOUCHIKHI, T., TANTAOU-ELARAKI, A., SENDIDE, K., REMMAL, A. the mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Essential Oil Research**, v.15, p.356-362, 2003.

ROLLER, S., COVILL, N. The Antimicrobial Properties of Chitosan in Mayonnaise and Mayonnaise-Based Shrimp Salads. **Journal of Food Protection**, vol. 63, n. 2, p 202–209, 2000.

ROSA, C., M., FRANCO, B.D.G.M., MONTVILLE, T. J., CHIKINDAS, M. Purification and mechanism action of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolate *Lactobacillus sake* 2a. **Journal of Food Safety**, 22, p. 39-54, 2002.

SAAVEDRA, L.; MINAHK, C.; HOLGADO, A. P. DE R. AND SESMA, F. Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH2-terminal sequence. [Antimicrobial Agents and Chemotherapy](#) 48, p. 2778-2781, 2004.

SAGDIÇ, O., ÖZCAN, M. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols **Food Control**, 14, p.141–143, 2003.

SAMPATHKUMAR, B., KHACHATOURIANS, G.C., KORBER, D.R. High pH during trisodium phosphate treatment causes membrane damage and destruction of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.1, p.122-129, 2003.

SCHROEDER, C.M., NAUGLE, A.L., SCHLOSSER, W.D., ALLAN, T., HOGUE, T., FREDERICK, I., ANGULO, J., ROSE, J.S., EBEL, E.D., DISNEY, W.T., HOLT, K.G., GOLDMAN, D.R. Estimate of Illnesses from Salmonella Enteritidis in Eggs, United States, 2000 **Emerging Infectious Diseases**, 11, n.1, 2005.

SEYDIM, A. C., SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, 39, p. 639–644, 2006.

SIKKEMA, J., DE BONT, J.A.M., POOLMAN, B. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbon s. **Microbiology Review**, 59, p.201–222, 1995.

SILVA, J. P. L.; KRUGER, M. F.; COSTA SOBRINHO, P. S.; SILVA, S. P.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Effects of oregano essential oil and nisin on growth of gram positive and gram negative foodborne pathogens. In: INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR FOOD PROTECTION ANNUAL MEETING, 92th, Baltimore, 2005. **Abstracts**. 2005.

SIVROPOULOU, A., PAPANIKOLAOU, E., NIKOLAOU, C., KOKKINI, S., LANARAS, T ARSENAKIS, M. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44, p.1202-1205, 1996.

SMITH-PALMER, A., STEWART, J., FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.118-122, 1998.

SMITH-PALMER, A., STEWART, J., FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 463–470, 2001.

TAUNAY, A. E.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO A. T.. NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G., IRINO, K. The role of Public Health Laboratory in the Problem of Salmonellosis in São Paulo, Brazil. Rev. **Inst. Med. trop.** São Paulo, v. 38, n. 2, p. 119-127, março-abril, 1996.

TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G. & IRINO, K. - Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. Rev. **Inst. Med. trop. São Paulo**, v. 38, n. 5, p. 315-322, 1996.

ULTEE, A.; GORRIS, L.G.M.; SMID, E.J.; Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, 85, p. 211-218, 1998.

ULTEE, A.; SLUMP R.A.; STEGING, G., SMID, E.J. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice, **Journal of Food Protection**, vol.63, p 620-624, 2000.

ULTEE, A., SMID, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, p.373-378, 2001.

ULTEE, A., BENNIK, M.H.J., MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 68, p.1561–1568, 2002.

UKUKU, D. O., FETT, W. F. Effect of nisin in combination with EDTA, sodium lactate and potassium sorbate for reducing *Salmonella* on whole and fresh-cut cantaloupe. **Journal of Food Protection**, v.67, n.10, p.2143-2150, 2004.

VILLANEUVA, N. D. M., PETENATE, A. J., SILVA, M. A. Performance of three affective methods and diagnosis of the ANOVA model. **Food Quality and Preference**, v.11, p. 367-370, 2000.

WALSH, S.E., MAILLARD, J.-Y., RUSSELL, A.D., CATRENICH, C.E., CHARBONNEAU, D.L., BARTOLO, R.G. Activity and mechanism of action of selective biocidal agents on Gram-positive and –negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 94, p.240–247, 2003.

XIONG, R., XIE, G., EDMONDSON, A. S., MEULLENET, J-F. Neural network modeling of the fate of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 in home-made mayonnaise prepared with citric acid. **Food Control**, 13, p.525-533, 2002.

YUSTE, J., FUNG, D. Y. C. Evaluation of *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* and *Staphylococcus aureus* counts in apple juice with cinnamon, by conventional media and thin agar layer method. **Food Microbiol.**, v.20, p.365-370, 2003.

ANEXO 1

TESTE DE ACEITABILIDADE

NOME:

DATA:

PRODUTO: Maionese com óleo essencial de orégano

Você vai receber uma amostra de maionese acrescida de óleo essencial de orégano.

Por favor, cheire-a e marque na escala abaixo o quanto você gostou do AROMA de produto.

9. Gostei extremamente
8. Gostei muito
7. Gostei regularmente
6. Gostei ligeiramente
5. Não gostei nem desgostei
4. Desgostei ligeiramente
3. Desgostei regularmente
2. Desgostei muito
1. Desgostei extremamente

Agora, prove-a e marque na escala abaixo o quanto você gostou do SABOR do produto.

9. Gostei extremamente
8. Gostei muito
7. Gostei regularmente
6. Gostei ligeiramente
5. Não gostei nem desgostei
4. Desgostei ligeiramente
3. Desgostei regularmente
2. Desgostei muito
1. Desgostei extremamente

ANEXO 2

TESTE DE ACEITABILIDADE

NOME:

DATA:

PRODUTO: SALADA DE LEGUMES COM MAIONESE

Você vai receber uma amostra de salada de legumes com maionese acrescida de óleo essencial de orégano.

Por favor, cheire-a e marque na escala abaixo o quanto você gostou do AROMA de produto.

Gostou	Gostou	Gostou	Gostou	Não gostou nem	Desgostou	Desgostou	Desgostou	Desgostou
extremamente	Muito	regularmente	ligeiramente	desgostou	ligeiramente	regularmente	muito	extremamente
[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]

Agora, prove-a e marque na escala abaixo o quanto você gostou do SABOR do produto.

Gostou	Gostou	Gostou	Gostou	Não gostou nem	Desgostou	Desgostou	Desgostou	Desgostou
extremamente	Muito	regularmente	ligeiramente	desgostou	ligeiramente	regularmente	muito	extremamente
[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]

Você compraria esta maionese?

Sim	Não	Talvez
[]	[]	[]

Comentários: