

Mestrado

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO, PRÓ-REITORIA DE PESQUISA,
PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
MESTRADO PROFISSIONAL EM OLERICULTURA

POTENCIAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO
NA SANITIZAÇÃO DE RÚCULA

Roseli Jacobi Veloso

Autora: Roseli Jacobi Veloso
Orientadora: Dra. Miriam Fumiko Fujinawa
Coorientadora: Dra. Sheila Mello da Silveira

2018

MORRINHOS-GO
2018

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO - CAMPUS MORRINHOS, PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM OLERICULTURA**

**POTENCIAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO NA
SANITIZAÇÃO DE RÚCULA**

Autora: Roseli Jacobi Veloso
Orientadora: Dra. Miriam Fumiko Fujinawa
Coorientadora: Dra. Sheila Mello da Silveira

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM OLERICULTURA, ao Programa de Pós-Graduação em Olericultura do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Morrinhos - Área de Concentração: Olericultura.

**MORRINHOS – GO
2018**

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

V443 Veloso, Roseli Jacobi
Potencial do óleo essencial de tomilho na
sanitização de rúcula / Roseli Jacobi
Veloso; orientadora Miriam Fumiko Fujinawa; co-
orientadora Sheila Mello da Silveira. -- Morrinhos,
2018.
44 p.

Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação
em Olericultura) -- Instituto Federal Goiano, Campus
Morrinhos, 2018.

1. extratos vegetais. 2. hortaliças. 3.
sanificantes. 4. minimamente processados. 5.
consumidor. I. Fujinawa, Miriam Fumiko, orient. II.
Silveira, Sheila Mello da, co-orient. III. Título.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OLERICULTURA

POTENCIAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO NA
SANITIZAÇÃO DE RÚCULA

Autora: Roseli Jacobi Veloso
Orientadora: Miriam Fumiko Fujinawa

TITULAÇÃO: Mestre em Olericultura-Área de Concentração Manejo
Fitossanitário em Olerícolas.

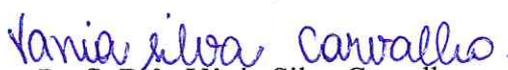
APROVADA em 08 de novembro de 2018.



Prof^ª. Dr^ª. Miriam Fumiko Fujinawa
Presidente da Banca
IF Goiano – Campus Morrinhos



Prof^ª. Dr^ª. Sheila Mello da Silveira
Avaliadora Externa
Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia



Prof^ª. Dr^ª. Vânia Silva Carvalho
Avaliadora Externa
IF Goiano – Campus Morrinhos

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde, força e determinação.

À minha família, em especial ao meu esposo Gilmar de Oliveira Veloso, aos meus filhos Milene Jacobi Veloso e João Pedro Veloso, pelo carinho e apoio em todas as situações.

À minha mãe Felicita Junges Jacobi, minha irmã Rosmeri Jacobi Rigon, por entender que mesmo distante fisicamente, compartilho o momento de luto pela passagem do nosso patriarca.

Ao Márcio Titon e Flaviane Predebon Titon e família, irmã e minha família de coração de Concórdia, pelo apoio e carinho.

À professora Dra. Miriam Fumiko Fujinawa, pela orientação.

À professora Dra. Sheila Mello da Silveira, pela paciência, compreensão e coorientação, além da colaboração, disponibilidade e avaliação da defesa.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Morrinhos e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense – Campus Concórdia, pela oportunidade de ter ingressado e concluído o curso de pós-graduação em Olericultura.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Olericultura, pelos ensinamentos, disponibilidade e atenção.

À Professora Dra. Vânia Silva Carvalho, pela colaboração, disponibilidade e avaliação da defesa.

Às alunas do curso de Engenharia de Alimentos Naiara Carla Zanferrari, Anaeli Zapparoli, Janaina Schu, Thalia Indara Balsan, Anariê Garguetti, Elis Meyring e Paola Batisteli, pela colaboração na execução dos experimentos.

Aos professores Dra. Amanda D'ávila Verardi, Dr. Ney Fronza, Dra. Soraya Surian, pela disposição e pela ajuda.

Aos meus colegas de mestrado e de trabalho, pelo apoio e parceria.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Roseli Jacobi Veloso, filha de Affonso Carli Jacobi (*in memoriam*) e Felicitia Junges Jacobi, nasceu em 9 de setembro de 1969, na cidade de São José do Inhacorá, RS.

Em 1999, graduou-se em Bacharel em Administração pela Sociedade Educacional Três de Maio - Faculdade Três de Maio (RS). Em 2012, especializou-se em Desenvolvimento Territorial com Ênfase em Agricultura Familiar e Meio Ambiente, pelo Instituto Federal Catarinense - Campus Concórdia (SC). Em setembro de 2016, iniciou o curso de Mestrado Profissional em Olericultura no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Morrinhos. Desde 2010, exerce o cargo de Técnica em Agropecuária no Instituto Federal Catarinense- Campus Concórdia.

RESUMO

VELOSO, ROSELI JACOBI. Instituto Federal Goiano, Campus Morrinhos, novembro 2018. **Potencial do óleo essencial de tomilho na sanitização de rúcula.** Orientadora: Dra. Miriam Fumiko Fujinawa. Coorientadora: Dra. Sheila Mello da Silveira.

Cada vez mais, os alimentos minimamente processados se destacam por sua praticidade no preparo das refeições. Produtos *in natura*, entre eles as hortaliças, requerem cuidados especiais até chegarem à mesa do consumidor. Para serem considerados seguros para o consumo, devem passar por um estágio de higienização que elimine microrganismos patogênicos eventualmente presentes e reduza a níveis aceitáveis os demais microrganismos contaminantes para o consumo humano. O tipo de sanificante mais utilizado para esta finalidade é o hipoclorito de sódio, porém, quando utilizado continuamente, pode deixar resíduos tóxicos e causar resistência microbiana. Por este motivo, estudam-se atualmente sanificantes alternativos ao cloro, entre eles os óleos essenciais, por terem em sua composição compostos antimicrobianos. Neste contexto, o presente estudo buscou avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) e aplicá-lo na sanitização de rúcula (*Eruca sativa*), visando ao aumento da segurança e da vida útil desta hortaliça. A atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial foi avaliada através de ensaios de difusão em disco, determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB) frente a diferentes espécies de bactérias de importância em alimentos. Os resultados mostraram forte atividade antibacteriana do óleo essencial de tomilho, tanto para as bactérias Gram-positivas quanto para as espécies Gram-negativas testadas, com valores de CMI variando entre 0,075 e 0,62 mg mL⁻¹. No teste desafio para avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de tomilho (0,2%) aplicado na sanitização de rúcula artificialmente contaminada com *Escherichia coli* (10³ UFC mL⁻¹), em comparação ao hipoclorito de sódio (120 ppm) e à água destilada (controle

negativo), não se observou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos aplicados, com exceção de uma menor contagem de *E. coli* na rúcula sanitizada com hipoclorito de sódio, no segundo dia de armazenamento a 8°C. Posteriormente, foi conduzido um experimento de aplicação do óleo essencial de tomilho (0,2%) como sanitizante em rúcula minimamente processada para a avaliação da vida de prateleira desta hortaliça, em comparação ao hipoclorito de sódio (120 ppm) e à água destilada (controle negativo). Após a aplicação dos tratamentos, a rúcula foi armazenada a 8°C durante sete dias e, periodicamente, feitas a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, determinação do pH, acidez total e avaliação da cor das amostras. A avaliação microbiológica mostrou que os métodos de sanitização aplicados não foram eficientes para redução da contaminação microbiológica natural da rúcula. Como consequência, o pH das amostras aumentou com o decorrer do período de armazenamento, o que também se refletiu na redução da acidez.

Palavras-chave: *Thymus vulgaris*, *Eruca sativa*, higienização, segurança alimentar

ABSTRACT

VELOSO, ROSELI JACOBI. Instituto Federal Goiano (Goiano Federal Institute) Morrinhos Campus, November 2018. **Thyme essential oil potential in arugula sanitization.** Advisor: Dr. Fujinawa, Miriam Fumiko. Co-advisor: Dr. Melo, Sheila Silveira de.

Increasingly, minimally processed food stands out for its practicality in the meal preparation. Products *in natura*, including vegetables, require special care before reaching the consumer's table. For being considered safe for consumption, they must undergo a hygienic process to eliminate possible pathogenic microorganisms and to reduce other contaminating microorganisms to an acceptable level for human consumption. The type of sanitizer most used for this purpose is sodium hypochlorite solution; however, when used continuously, it can leave toxic waste and result in microbial resistance. For this reason, alternative sanitizers to chlorine are being studied, among them, essential oils, because they have antimicrobial compounds in their composition. In this context, the present study aimed to evaluate *in vitro* antimicrobial activity of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*), and to apply it in the arugula (*Eruca sativa*) sanitization, aiming to increase its safety and shelf life. Antibacterial activity *in vitro* of the essential oil was evaluated by disc diffusion assays, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bacterial concentration (MBC) against different species of important bacteria in food. Results showed a strong antibacterial activity of the thyme essential oil for both Gram-positive bacteria and Gram-negative species tested, with MIC values ranging from 0.075 to 0.62 mg mL⁻¹. In the challenge test to evaluate the antibacterial activity in the thyme essential oil (0.2%) applied in the sanitization of arugula artificially contaminated with *Escherichia coli* (10³ CFU mL⁻¹), compared to sodium hypochlorite (120 ppm) and distilled water (negative control), there was no significant difference (p<0.05) between the treatments applied, except for a

lower *E. coli* count in the sanitized arugula with sodium hypochlorite, on the second day of storage at 8°C. Afterwards, an experiment of applying the thyme essential oil (0.2%) as a sanitizing agent in minimally processed arugula was carried out to evaluate this vegetable shelf life, in comparison, to sodium hypochlorite (120 ppm) and distilled water (negative control). After the treatments, the arugula was stored at 8°C for seven days and periodically the number of aerobic mesophilic microorganisms, pH determination, and titratable acidity were counted, and the color of the samples was evaluated. The microbiological evaluation showed that the sanitation methods applied were not efficient to reduce the arugula natural microbiological contamination. Therefore, the pH of the samples increased during the storage period, which was also reflected on the titratable acidity reduction.

Keywords: *Thymus vulgaris*, *Eruca sativa*, food safety, hygiene

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho, detectada no ensaio de difusão em disco (mm)	25
Tabela 2. Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) (mg/ml) do óleo essencial de tomilho contra microrganismos testados	26
Tabela 3. Efeito do óleo essencial de tomilho, hipoclorito de sódio e água destilada na sobrevivência da <i>Escherichia coli</i> inoculada em amostras de rúcula armazenadas durante 7 dias a 8°C (log UFC/g)	27
Tabela 4. Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos (Log UFC/g) em folhas de rúcula sanificadas com OE de tomilho, hipoclorito de sódio e água destilada, durante o período de armazenamento a 8°C	28
Tabela 5. Valores de pH e Acidez titulável total (ATT) em folhas de rúcula sanificadas com óleo essencial de tomilho, hipoclorito de sódio e controle durante o período de armazenamento a 8°C	30
Tabela 6. Médias para o parâmetro físico cor, com valores individuais L*, b* e a* nas folhas de rúcula minimamente processadas	31

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO GERAL 1
2	REVISÃO DA LITERATURA..... 3
2.1	Rúcula.....3
2.2	Hortaliças minimamente processadas.....4
2.3	Microbiota das hortaliças.....5
2.4	Sanitização 7
2.5	Óleos essenciais 8
2.6	Aplicação de OET em sanificação de hortaliças minimamente processadas.....10
2.7	Referências 11
3	CAPÍTULO I 15
3.1	Introdução.....17
3.2	Material e Métodos.....19
3.2.1	Obtenção do óleo essencial.....19
3.2.2	Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.....19
3.2.3	Deteção da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco....19
3.2.4	Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....20
3.2.5	Determinação da concentração mínima bactericida (CMB).....20
3.2.6	Avaliação da atividade antimicrobiana.....21
3.2.6.1	<i>Sanitização prévia.....22</i>
3.2.6.2	<i>Preparação do inóculo.....21</i>
3.2.6.3	<i>Aplicação dos tratamentos de sanificação.....21</i>
3.2.6.4	<i>Enumeração de E. coli.....22</i>
3.2.7	Avaliação da vida de prateleira.....22
3.2.7.1	<i>Preparo e tratamento das amostras.....22</i>
3.2.7.2	<i>Contagem total de Microrganismos Aeróbios Mesófilos.....23</i>

3.2.7.3	<i>Avaliação da cor</i>	23
3.2.7.4	<i>Determinação do pH e Acidez total (AT)</i>	24
3.2.7.5	<i>Estatística</i>	24
3.3	Resultados e Discussão	25
3.3.1	Atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho	25
3.3.2	Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho sobre <i>Escherichia coli</i> inoculada em rúcula minimamente processada	26
3.3.3	Avaliação da vida de prateleira	28
3.3.3.1	<i>Contagem total de Microrganismos Aeróbios Mesófilos</i>	28
3.3.3.2	<i>Determinação do pH e Acidez total</i>	29
3.3.3.3	<i>Avaliação da cor</i>	31
3.4	Conclusão	32
3.5	Referências	32

1 INTRODUÇÃO GERAL

O estilo de vida moderno levou a modificação de hábitos alimentares, buscando praticidade e alimentos seguros, principalmente que atendam às suas necessidades nutricionais. Entre as alternativas que supram essas características, as hortaliças minimamente processadas ganham destaque, pois são de fácil preparo, além de serem alimentos frescos e nutritivos. No entanto, por serem alimentos frescos, podem apresentar risco de contaminação por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, presentes na microbiota natural dos vegetais, ou contaminados durante o processo de colheita, processamento e armazenamento (HYUN et al., 2015).

O acesso facilitado à informação modificou os hábitos relacionados ao consumo de alimentos, fazendo com que o consumidor se torne mais exigente em relação à segurança alimentar e à escolha de produtos de qualidade elevada, desde o sistema de produção, em que se espera que o alimento seja produzido com o mínimo de agroquímicos e, no pós-colheita, que sejam processados de forma que não tenham resíduos tóxicos ao organismo deixados por conservantes químicos e antimicrobianos artificiais (BONILLA e SOBRAL, 2017).

Os alimentos minimamente processados devem passar por um estágio de sanitização e de processamento capaz de eliminar ou reduzir o número de microrganismos a níveis aceitáveis. O processo comumente utilizado é uma lavagem prévia com água limpa, seguida de sanitização com produtos químicos como o cloro e similares. Entretanto, o uso contínuo desses produtos pode desencadear efeitos carcinogênicos, ter residual tóxico e redução da eficácia antimicrobiana (BOBCO et al., 2011 e SIROLI et al., 2015).

Neste contexto, a demanda por novos produtos com ação antimicrobiana, que sejam naturais, incentiva a realização de pesquisas por produtos menos nocivos à saúde humana e eficientes na ação bactericida, como, por exemplo, os óleos essenciais de especiarias, ervas e condimentos, cujas propriedades dos óleos essenciais têm sido

exploradas com vários fins medicinais, por conterem elementos com poder anti-inflamatório, antimicrobiano e bactericida, sendo que o uso destes compostos são isentos de permissão pelo Ministério da Saúde, por serem considerados atóxicos para a saúde do consumidor (PEREIRA et al., 2014, SANTOS, J. et al., 2011 e STEFANELLO et al., 2016).

Diante o exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de importância em alimentos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Rúcula

A rúcula (*Eruca sativa*) é uma hortaliça da família *Brassicaceae*. Sua origem é Europeia, Norte Africana e Asiática. No Brasil, é muito conhecida por descendentes de italianos, portugueses e espanhóis (DA CUNHA et al., 2013). Hortaliças com tonalidade verde, principalmente as folhosas com sabor picante, incluindo a rúcula, apresentam várias propriedades nutricionais, como a pró- vitamina A, vitaminas B₂, B₅, B₉, K, cálcio, ferro, magnésio e potássio, são ricas em vitaminas A e C, magnésio, cálcio, potássio, enxofre, ferro e fibras (LUENGO et al., 2011). Auxiliam no crescimento e na manutenção dos ossos, pele, cabelos e visão, contribuem para o sistema digestivo, nervoso, imunológico e sexual, reduzem o colesterol e o risco de doenças (RODRIGUES, 2012).

Algumas orientações devem ser seguidas na colheita da rúcula, preferencialmente devem ser colhidas nas horas mais frescas do dia, uniformizando o tamanho das folhas, eliminando folhas com sintomas de doenças ou com injúrias mecânicas e insetos. A limpeza deve ser feita primeiramente eliminando as sujidades mais evidentes, após, efetuando a sanitização e posterior enxágue. Para a comercialização, devem ser embaladas em sacos plásticos expostos em gôndolas sob refrigeração entre 4 a 12°C. Rúcula é uma hortaliça que tem vida de prateleira curta quando submetida a condições de estresse. Segundo estudos conduzidos por Jardina et al. (2017), em que foram avaliados parâmetros físico-químicos de trinta variedades de rúcula minimamente processadas, armazenadas a 7°C, somente uma delas se manteve em condições de consumo até o oitavo dia, mas Nunes, Souza e Ferreira. (2013) verificaram que a rúcula orgânica armazenada a 6°C mantém a qualidade e a vida útil por doze dias. Visto que os produtos minimamente processados devem ser mantidos em

temperaturas de refrigeração, os microrganismos psicotróficos (0 a 10°C), aqueles capazes de crescer em temperaturas mais baixas, como a *Listeria monocytogenes*, são os mais críticos. No entanto, caso haja abuso de temperatura durante o processamento e comercialização, os patógenos mesofílicos (15 a 45°C), que, eventualmente, possam estar presentes, como a *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*, poderão crescer, já que as populações desses microrganismos permanecem viáveis mesmo em temperaturas de refrigeração (PILON, 2017).

2.2 Hortaliças minimamente processadas

As hortaliças são ricas em vitaminas, minerais, fibras e antioxidantes, compostas por 70% de água, preferencialmente devem ser consumidas cruas para aproveitamento integral de seus componentes. A recomendação diária de consumo de alimentos é de 400 gramas, sendo que o consumo no Brasil não alcança 20 % dessa quantidade (RODRIGUES, 2012). Vários estudos revelam que o consumo diário de hortaliças folhosas previne doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, mantém o peso corporal e fortalece o sistema imunológico. Segundo Brasil-Vigitel (2017), o consumo regular de frutas e hortaliças entre adultos teve um crescimento de 4,8% de 2008 a 2017.

Os produtores de alimentos têm um desafio muito grande para atender às exigências legais que garantam a segurança dos alimentos, sendo indispensáveis à produção e à conservação de produtos que não causem danos à saúde, que tenham vida útil adequada e que diminuam as perdas econômicas. A grande maioria dos produtos hortícolas é perecível, sendo necessárias técnicas de conservação que vão desde tratamentos térmicos, embalagens desinfetadas, condições atmosféricas modificadas, uso de conservantes químicos, podendo deixar resíduos tóxicos que, muitas vezes, têm propriedades carcinogênicas e teratogênicas, provocam reações alérgicas em indivíduos sensíveis ou interferem nas propriedades nutricionais e nas qualidades sensoriais (MACHADO, BORGES e BRUNO, 2011 e SCOLLARD, McMANAMOM e SCHMALENBERGER, 2016).

A mudança no estilo de vida e nos hábitos alimentares não permite que o consumidor tenha tempo para o preparo das refeições, principalmente dos vegetais. Assim, o consumidor procura alimentos práticos, seguros e saudáveis, cuja opção é dada

pelas frutas e hortaliças que passaram pelo processo de descascamento, corte, sanitização, centrifugação e acondicionamento nas embalagens, mantendo-se frescas e funcionais (SANTOS, K. et al., 2015). Porém, com esse processo, os produtos não ficam isentos da perda de qualidade pela degradação causada pelo seu manuseio, que não traz prejuízo à saúde humana, mas contribui para a rápida deterioração, sabor e odor característicos de podridão (SANTOS, A. e JUNQUEIRA, 2012) e contaminação por microrganismos patogênicos capazes de causar intoxicações alimentares. Pode ocorrer intoxicação quando o alimento contiver níveis de contaminação entre 10^5 a 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias, produtoras de enterotoxinas (SANTOS, C., PICCOLI e TEBALDI, 2017).

Os produtos minimamente processados geralmente exibem contagens altas de microrganismos deteriorantes, como as *Pseudomonas* sp., bactérias ácido-láticas e *Enterobacteriaceae*. As bactérias do gênero *Pseudomonas* são as principais entre os deteriorantes, pois são capazes de excretar enzimas que degradam a parede celular das hortaliças e, como consequência, causar exsudação de nutrientes. Quanto aos agentes patogênicos, os mais frequentemente associados aos minimamente processados são as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, endoparasitas como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Ascaris* sp. e vírus como o da hepatite A (PILON, 2017). A colonização de bactérias em alimentos pode ocorrer tanto de forma endofítica quanto epifítica, sendo que a colonização endofítica acontece quando os produtos *in natura* estão com lesões nos tecidos, ocasionados por danos mecânicos, aberturas naturais ou através de quimiotaxia. Na colonização epifítica, os organismos patogênicos se utilizam de fímbrias, flagelos e biofilme para fixação ou adesão nos vegetais (ÖLMEZ, 2016).

2.3 Microbiota das hortaliças

A presença de bactérias encontrados em alimentos crus e processados, como os cereais, frutos do mar, vegetais, alimentos desidratados e alimento crus de origem animal, inclusive lácteos, está associada à higiene precária em geral proveniente de animais tais como pássaros, roedores e excrementos humanos. Os patógenos de origem alimentar mais comuns são classificados como eubactérias, capazes de se desenvolver a

uma temperatura de 37°C, a mesma do corpo humano (FORSYTHE, 2002 e MONTEIRO, 2016)

Bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* vivem na pele e nas membranas dos humanos e animais de sangue quente, sendo a principal espécie que pode causar infecções pós-operatórias, síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar no homem, pois estão associadas a origens hospitalares e comunitárias (SIEBRA et al., 2018).

Bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* fixam-se no aparelho gastrointestinal dos humanos e outros animais. Os organismos Gram-positivos têm uma parede celular grossa envolvendo a membrana citoplasmática, composta por peptidoglicanos e ácidos teicóicos. Os organismos Gram-negativos têm uma parede celular mais fina, envolvida por outra membrana externa, tendo duas membranas que contêm moléculas conhecidas como lipopolissacarídeos, que limitam a propagação de compostos hidrofóbicos, sendo o sítio de ação do antibiótico original penicilina, além da produção de betalactamases, que destroem a ação da maioria das enzimas bacterianas, isso explica por que os antibióticos são mais efetivos contra bactérias Gram-positivas do que contra Gram-negativas (FORSYTHE, 2002, SANTOS, C., PICCOLI e TEBALDI, 2017 e SIEBRA et al., 2018).

Das notificações de casos de surtos provocados por agentes microbianos, entre 2007 e 2017, conforme os registros da Secretaria de Vigilância em Saúde, 95,9% foram causadas por bactérias: 525 por *E. Coli*, 515 por *Salmonella*, 407 por *S. aureus*, 183 por *Bacillus cereus*, 137 por coliformes e 119 por *C. perfringens* (BRASIL-VIVITEL, 2017). Vários estudos comprovam a presença de patógenos em hortaliças e frutos, contaminados com bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de coliformes fecais (CASTRO-ROSAS et al., 2012; SEOW et al., 2012), com aumento considerável em produtos minimamente processados, por sobreviverem em ambiente com a presença de água. Entre estes patógenos, pontificam *Listeria*, *Salmonella* e *Escherichia coli*, causadores de intoxicações alimentares ao redor do mundo (KARAGOZLÜ, ERGONÜL, e. OZCAN, 2011).

2.4 Sanitização

A higienização dos alimentos *in natura*, principalmente frutas e hortaliças, passa por um processo de limpeza, que elimina até 90% da sua carga microbiana, porém a lavagem por si só não garante a descontaminação a níveis seguros para o consumidor, tornando obrigatório o uso de agentes antimicrobianos como um complemento muito importante para a redução maior ou eliminação de microrganismos nocivos. Portanto, para produtos minimamente processados, a etapa de lavagem, feita com solução sanificante, é a única fase capaz de reduzir o número de microrganismos deteriorantes e patogênicos (SANTOS, H. et al., 2012).

Os sanificantes mais tradicionais são o hipoclorito de sódio ou cálcio a 2% e 2,5%, hipoclorito de sódio a 1% e cloro orgânico, em uma concentração de 100 a 250 ppm. A higienização dos alimentos passa pela etapa de lavagem com água corrente, que deve ser de boa qualidade, para retirada de sujidades mais evidentes, seguida de imersão em sanificante recomendado e posterior enxágue para retirada de restos de sujidades e resíduos de produtos químicos. A legislação recomenda que o alimento fique no mínimo 10 minutos em contato com a solução para que ocorra a desinfecção. A eficiência da sanitização é influenciada pelo pH, temperatura da água, tempo de contato, natureza dos produtos e carga bacteriana inicial (COSTA et al., 2012).

Para que um agente químico seja considerado ideal, algumas características são fundamentais, como a capacidade de inibir microrganismos em baixas concentrações, ser solúvel em água ou outro solvente, ser estável, atóxico, de fácil homogeneidade, ser ativo em temperatura ambiente ou corporal, ser inodoro, ter penetrabilidade, ter baixo custo e ser de fácil aquisição. A água sanitária, cujo princípio ativo é o cloro, é o sanificante mais utilizado por sua viabilidade econômica. Deve ser utilizada com água potável, sem adição de corantes, ausente de fragrâncias, sequestrantes e tensoativos. Com ação alvejante e antimicrobiana, a água sanitária tem amplo espectro, reagindo com a membrana das células dos micróbios, dificultando o transporte de nutrientes e causando perda de componentes celulares. Porém seu uso deve ser repensado, pois seu contato com a matéria orgânica sintetiza o tri-halometano, muito prejudicial à saúde, colocando em risco ocupacional os manipuladores e o consumidor final, comprometendo a qualidade nutricional e sensorial dos alimentos (BERALDO et al., 2013 e KLUG et al., 2016). Em alguns países europeus como Alemanha, Holanda e

Bélgica, o uso do cloro está proibido pelo efeito corrosivo dos seus compostos e por causar irritação na pele e no trato respiratório (SIROLI et al., 2015).

O uso contínuo de um mesmo princípio ativo antimicrobiano pode causar resistência dos agentes patogênicos, que sofrem mutação espontânea e recombinação genética, ou seja, seleção natural. O revezamento de antimicrobianos e sanificantes para prevenir linhagens com maior resistência pode ser um fator positivo. Segundo Forsythe (2002), a interação de fatores pode ser vista no efeito do crescimento microbiano de acordo com as condições de crescimento. Muitas barreiras podem ser utilizadas como uma série de obstáculos a serem ultrapassados pela bactéria para que ela possa contaminar e degradar os alimentos, entre elas, embalagens com atmosfera modificada, altas pressões hidrostáticas, luz violeta e etanol.

Para avaliar a eficiência de um agente antimicrobiano, devem ser considerados o tamanho da população microbiana, a intensidade do agente microbicida, o tempo de exposição ao microbicida, as características dos microrganismos presentes e a temperatura a que eles estão expostos. Agentes antimicrobianos inibem ou matam os microrganismos pela destruição de estruturas como parede celular ou membrana citoplasmática ou substâncias presente no citoplasma como enzimas, ribossomos ou material nuclear. Para que haja maior eficácia, faz-se necessário conhecer o mecanismo de ação de um agente antimicrobiano. A busca de conservantes naturais com propriedades bactericidas ou bacteriostáticos, que tragam segurança ao consumidor, com garantia de conservação das propriedades nutricionais e organolépticas, sem residual químico, compatíveis com o alimento, tem sido motivação para várias pesquisas (HYLDGAARD, MYGIND e MEYER, 2012). Produtos oriundos de extratos vegetais para aplicação como antimicrobianos são os mais estudados por serem conhecidos popularmente como agentes antioxidantes, antitoxigênicos, antimicrobianos e antiparasitários (CARIOVIC-STANKO et al., 2010).

2.5 Óleos essenciais

O ser humano encontra na natureza a solução para satisfazer suas necessidades essenciais, como se alimentar, e nesta mescla de experiências, foi descobrindo que as plantas não eram somente fonte de alimentos, como também matéria-prima para uso diário, como vestimentas, abrigos, tinturas, combustíveis, óleos, ornamentos, veneno e

medicamentos, que tinham poder curativo e preventivo contra várias doenças ou mal-estar e que algumas tinham várias outras aplicações (WAIZEL-BCUAY e WAIZEL-HAIAT, 2016). Tratamentos de patologias com fitoterápicos remontam à antiguidade, a 1.600 AEC. No Egito, havia registros de mais de 800 plantas de uso medicinal, e o conhecimento de como empregar e se beneficiar de plantas com fins medicinais vem do conhecimento empírico, acumulado durante séculos, na tentativa de acerto e erro, passando de geração a geração, aumentando o conhecimento popular (PASA e DE ÁVILA, 2010). Com base neste conhecimento é que se desenvolveram a botânica moderna, a taxonomia e a química (GROSSO e LIMA, 2013). Centenas de plantas com propriedades antimicrobianas são conhecidas e, em torno de 30.000 compostos já foram isolados contendo fenólicos, porém somente algumas plantas preservam características comercialmente úteis, e as mais popularmente conhecidas são orégano, cravo, alho, canela, coentro, alecrim, gengibre, entre outras (TAJKARIMI e IBRAHIM, 2011).

As plantas são constituídas de substâncias de metabolismos primários e secundários, sendo os lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos originados do metabolismo primário, essenciais para a manutenção das células; já os secundários são constituídos de três principais, os terpenos e os esteroides, os compostos fenólicos e os alcaloides, que resultam de rotas biossintéticas diversas (ARAÚJO et al., 2015). As especiarias, ervas e condimentos, além de acrescentar sabor e aroma aos alimentos, têm propriedades antimicrobianas e antioxidantes, havendo uma relação linear positiva com o teor total de fenólicos nas plantas, pois concentrações em quantidade menor afetam a atividade enzimática, e altas concentrações causam desnaturação proteica, capaz de romper a membrana citoplasmática celular, tornando-a impermeável, permitindo a saída de íons e proteínas intracelulares, ocasionando sua morte (MACHADO, BORGES e BRUNO, 2011; DEVI et al., 2010). Entre os compostos fenólicos, os flavonoides e os taninos têm apresentado capacidade de impedir o desenvolvimento microbiano, apresentando efeito ativo como antibióticos (ARAÚJO et al., 2015).

A extração dos compostos vegetais pode ser feita usando solventes aquosos ou orgânicos (BONILLA e SOBRAL, 2017), que podem chegar a inúmeros componentes, porém em torno de três são compostos predominantes: carvacrol (30%), timol (27%) e linalol (68%). A quantidade depende de que parte da planta é extraída a essência, podendo ser das raízes, flores, casca, folhas, frutos, época de colheita e localização geográfica (MACHADO, BORGES e BRUNO, 2011). As propriedades dos óleos essenciais das plantas têm sido exploradas com vários fins medicinais por conterem

flavorizantes como o carvacrol, carvone, cinamaldeído, citral, mentol, timol, p-cimeno, limoneno, com poder bactericida. O uso desses compostos é isento de permissão pelo Ministério da Saúde por serem considerados não tóxicos para a saúde do consumidor, com algumas exceções, como o metil eugenol e o estragol (SANTOS, J. et. al., 2011).

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) pertence à família Lamiaceae, composta, principalmente, por tomilho, manjerição, orégano, alecrim e sálvia. É uma erva medicinal aromática, nativa da região do Mediterrâneo, compreende 150 gêneros e é amplamente utilizada como tempero de alimentos, beveragens, como extratos e óleo essencial. O tomilho mostra muitas atividades, incluindo atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antileishmanial, anti-inflamatória, antiespasmódica, imunomoduladora e anticancerígena (SHIMADA e INAGAKI, 2014), em razão da presença de terpenos, saponinas, flavonoides, taninos e de óleos essenciais como ésteres, fenóis, álcool, aldeídos e hidrocarbonetos. Entre os principais compostos fenólicos, estão o timol e o carvacrol (MCINTYRE, 2011).

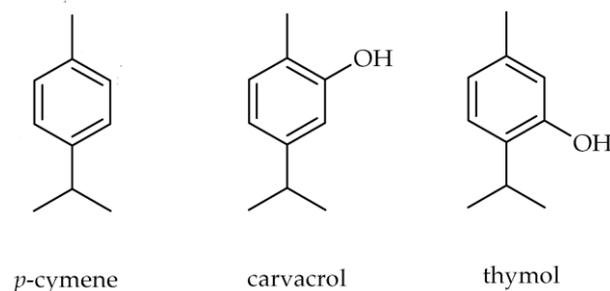


Figura 1. Fórmula estrutural de compostos terpênicos do OE do tomilho
Fonte: Adaptado de Burt (2004)

2.6 Aplicação de OET em sanificação de hortaliças minimamente processadas

Vários estudos têm buscado comprovar a eficácia do uso de OEs como antimicrobianos naturais contra patógenos de importância alimentar, no que diz respeito a vegetais minimamente processados.

Karagozülü, Ergonül, e. Ozcan, (2011) estudaram óleos essenciais de hortelã e manjerição nas concentrações de 0,01 mL L⁻¹, 0,032 ml / L ou 0,08 mL L⁻¹ para desinfecção de alfaces picadas e beldroega, inoculadas com *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli.*, em dois diferentes tempos de tratamento (10 e 15 minutos), e

armazenadas sob refrigeração a 4°C durante sete dias, tendo concluído que o OE de hortelã e manjericão na concentração 0,08 mL L⁻¹ foi o tratamento mais eficaz contra os patógenos testados.

Scolard et al. (2016) utilizaram OE de tomilho e de cânfora para determinar sua eficácia como antimicrobianos em comparação ao cloro livre na sanificação por imersão em frutas frescas minimamente processadas e por aspersão em alface e frutas. O OE de tomilho teve um efeito antilisterial significativo, o mesmo não ocorrendo com o OE de cânfora nos sete dias de armazenamento.

Xylia et al. (2017), em seu estudo para determinar a concentração adequada e o efeito de tempo de aplicação do OE de lavanda e hortelã e sua potencial aplicação para garantir a qualidade e a segurança de endívia, verificaram que os OEs nas concentrações de 0,001%, 0,01% e 0,1% podem ser ativos contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, sem que houvesse efeito sobre as características sensoriais.

Gutierrez et al. (2009) estudaram o potencial do uso de OET na vida de prateleira de alface e cenoura contaminadas naturalmente, tendo sua atividade antimicrobiana apresentado efeitos nas propriedades organolépticas durante sete dias de armazenamento. Os resultados obtidos não mostraram diferença significativa em comparação ao cloro no controle dos microrganismos, mas diferença significativa menor quando comparado com o controle (água). Na análise sensorial, houve rejeição do uso de OET como sanitizante de alface.

2.7 Referências

ARAÚJO, E. R. D. et al. C. Avaliação do Potencial Antimicrobiano de Extrato Hidroalcoólico e Aquoso da Espécie *Anadenanthera columbina* frente a bactérias gram-negativas e gram-positivas. **Biota Amazônia**. Macapá, v.5(3):6671, 2015. Disponível em: <[http://periodicos.unifap.br /index.hp/biota](http://periodicos.unifap.br/index.hp/biota)>. Acesso em: 20 abril de 2108.

BERALDO, C. et al. Eficiência de Óleos Essenciais de Canela e Cravo-da-índia Como Sanificantes na Indústria de Alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v.43(4):436-440, out. / dez. 2013.

BOBCO, S. E. et al. Condições higiênicas de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de Erechim-RS. **Alimento e Nutrição**. Araraquara, v.22(2):301-305, abr./jun. 2011.

BONILLA, J.; SOBRAL, P. J. A. Propriedades Antioxidantes e Antimicrobianas de Extratos Etanólicos de Guaraná, Boldo, Alecrim e Canela. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas. v.20, 2017.

BRASIL-VIGITEL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dados epidemiológicos – DTA. 2017. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017>>. Acesso em: 2 de maio 2018.

_____. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde/Secretaria de gestão Estratégica e Participativa, 2017: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico- Brasília 2018.

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

CARIOVIC-STANKO et al. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. *Food Chemistry*, v, 119: 196-201. 2010.

CASTRO-ROSAS, J. et al. Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. **International Journal of Food Microbiology**, v.156:176-180, 2012.

COSTA, E. A. et al. Avaliação microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa L.*) convencionais e orgânicas e a eficiência de dois processos de higienização. **Alimentação e Nutrição**. Araraquara, v.23(3):387-392, jul. /set. 2012.

DA CUNHA, F. F. et al. Irrigação de diferentes cultivares de rúcula no nordeste do Mato Grosso do Sul. **Water Resources and Irrigation Management**, v.2(3):131-141, 2013.

DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v.130(1):107-115, 2010.

FORSYTHE, S. J. **Microrganismos causadores de doenças de origem alimentar**: Microbiologia de segurança alimentar. *Artmed*, p.164-168, 2002.

GROSSO, E. S. B.; LIMA, A. P. L. Efeito antimicrobiano do alho (*Allium sativum*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isolados de pacientes de um hospital escola do sul de Minas. 13º Congresso Nacional de iniciação científica. **Anais do Conic-Semesp**. Faculdade Anhanguera de Campinas. v.1, 2013.

GUTIERREZ, J. et al. Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic, and quality markers of minimally processed vegetables. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, p.10, 195, 202, 2009.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in microbiology**, article 12, v.3:1-24, 2012.

HYUN, J. E. et al. Preservative effectiveness of essential oils in vapor phase combined with modified atmosphere packaging against spoilage bacteria on fresh cabbage. **Food Control**, v.51:307-313, 2015.

- JARDINA, L. L. et al. Comportamento fisiológico pós-colheita de cultivares de rúcula minimamente processadas. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v.10(1), 2017.
- KARAGOZLÜ, N.; ERGONÜL, B.; OZCAN, D. Determinacion of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of *E. coli* 0157:H7 and typhimurium in fresh-cut lettuce and purslane. **Food Control**, v.22:1851-1855, 2011.
- KLUG, T. V. et al. Extratos de Taninos na Qualidade de Alface Crespa Minimamente Processada. **Ciência Rural**, v.46(8), ago. 2016.
- LUENGO, R. F. A. et al. **Tabela de Composição Nutricional das Hortaliças**. Embrapa Hortaliças - Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. 2.ed., Brasília, 2011.
- MACHADO, T. F.; BORGES, M. de F.; BRUNO, L. M. **Aplicação de Antimicrobianos Naturais na Conservação de Alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.
- MCINTYRE, A. **Guia Completo de Fitoterapia**: um curso estruturado para alcançar a excelência profissional. São Paulo: Pensamento, 256p., 2011.
- MONTEIRO, S. E. A. Avaliação da qualidade microbiológica de saladas prontas para consumo comercializadas na região de Lisboa. **Dissertação**, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2016.
- NUNES, C. J dos S.; SOUZA, M. L. de; FERREIRA, R. L. F. Qualidade e Pós-Colheita da Rúcula orgânica Armazenada sob Refrigeração. **Enciclopédia Biosfera**. Centro científico conhecer. Goiânia, v.9(17):2231, 2013.
- ÖLMEZ, H. Foodborne pathogenic bacteria in fresh-cut vegetables and fruits. **Food Hygiene and Toxicology in Read-to Eat Foods**. p.151-166, 2016.
- PASA, M. C., DE ÁVILA, G. Ribeirinhos e recursos vegetais: a etnobotânica em Rondonópolis, Mato Grosso, Brasil. **Interações**, v.11(2):95-204, 2010.
- PEREIRA, A. A. et al. Inativação termoquímica de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica* Enteritidis por óleos essenciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44(11):2022-2028, nov. 2014.
- PILON, L. Segurança das hortaliças minimamente processadas. 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/31394451/seguranca-das-hortalicas-as-minimamente-processadas>. Acesso em: 27 jun. 2018.
- RODRIGUES, P. Hortaliças em Revista: A importância nutricional das hortaliças. Publicação Bimestral da Embrapa Hortaliças. Ano I(2), mar./abr. 2012.
- SANTOS, A. P. R.; JUNQUEIRA, A. M. R. Gestão da qualidade na couve minimamente processada no Distrito Federal: O Caso da Agroindústria Machadinho. Campina Grande. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.14(4):p.337-352, 2012.
- SANTOS, C. H. S.; PICCOLI, R. H.; TEBALDI, V. M. R. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.76:1-8, 2017.

- SANTOS, H. S. et al. Avaliação da eficácia da água sanitária na sanitização de alfaces (*Lactuca sativa*). **Rev. Adolfo Lutz**, v. 1(1):56-60, 2012.
- SANTOS, J. C. et al. Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v.32(4):1557-1564, out./dez. 2011.
- SANTOS, K. R. S. B. et al. Estudo comparativo da couve minimamente processada e *in natura*, segundo aspectos de qualidade microbiológica. **Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v.0(2):279-287, 2015.
- SCOLLARD, J.; McMANAMOM, O.; SCHMALENBERGER, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth on fresh cut produce with thyme essential oil and essential oil compound verbenone. **Postharvest Biology and Technology**, v.120:61-68, 2016.
- SEOW, J. et al. Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. **Food Control**, v.25:3944, 2012.
- SHIMADA, A.; INAGAKI, M. Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory activity of ursolic acid isolated from *Thymus vulgaris*. **Food Science and technology research**, v.20 (3):711-714, 2014.
- SIEBRA, A. L. A. et al. Potenciação de atividade antibiótica por *Passiflora cincinnata* Mast. Frente das cepas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.25 (1):p.37-43, 2018.
- SIROLI, L. et al. Natural antimicrobials to prolong the shelf-life of minimally processed lamb's lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, v.103:35-44, 2015.
- STEFANELLO, F. S. et al. Efeito da extração de compostos fenólicos sobre a atividade antioxidante e antibacteriana in vitro de cogumelo do sol. **Instituto de Biologia**, v.83 (1):1-7, 2016.
- TAJKARIMI, M.; IBRAHIM, S. A. Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* 0157:H7 in laboratory medium and carrot juice. **Food Control**, v.22(6):801-804, 2011.
- WAIZEL-BCUAY, J.; WAIZEL-HAIT, S. Las especias o condimentos vegetales¿Sólo saborizantes o también remedios medicinales? **Anales... Otorrinolaringología Mexicana**. v.61 (3):08-230, 2016.
- XYLIA, P. et al. Potential application of spearmint and lavender essential oils for assuring endive quality and safety. **Crop Protection**, v.102:94-103, 2017.

3 CAPÍTULO I

Potencial do óleo essencial de tomilho na sanitização de rúcula

(Norma de acordo com a revista Ciência e Agrotecnologia UFLA)

Roseli Jacobi Veloso^I
Miriam Fumiko Fujinawa^{II}
Sheila Mello da Silveira^{III}

Resumo

Óleos essenciais de espécies vegetais são fontes alternativas importantes de compostos antimicrobianos no combate a patógenos de importância alimentar. O presente estudo buscou avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*), e aplicá-lo na sanitização de rúcula (*Eruca sativa*) minimamente processada, visando ao aumento da segurança e da vida útil desta hortaliça. A atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial foi avaliada por meio de ensaios de difusão em disco, determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB) frente a diferentes espécies de bactérias de importância em alimentos, tendo sido mostrada uma forte atividade antibacteriana do óleo essencial de tomilho, tanto para as bactérias Gram-positivas quanto para as espécies Gram-negativas testadas, com valores de CMI variando entre 0,075 e 0,62 mg mL⁻¹. Em seguida, foi feito um teste desafio para avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de tomilho (0,2%), aplicado na sanitização de rúcula artificialmente contaminada com *Escherichia coli* (10³ UFC mL⁻¹), em comparação com hipoclorito de sódio (120 ppm) e com a água destilada (controle negativo). Neste experimento, não houve diferença significativa (p<0,05) entre os tratamentos aplicados, com exceção de uma menor

contagem de *E. coli* na rúcula sanitizada com hipoclorito de sódio no segundo dia de armazenamento a 8°C. Posteriormente, foi conduzido um experimento de aplicação do óleo essencial de tomilho (0,2%) como sanitizante em rúcula minimamente processada para a avaliação da vida de prateleira desta hortaliça, em comparação com o hipoclorito de sódio (120 ppm) e com a água destilada (controle negativo). Após a aplicação dos tratamentos, a rúcula foi armazenada a 8°C durante sete dias e, periodicamente, feitas a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, a determinação do pH, a acidez total e avaliação da cor das amostras. A avaliação microbiológica demonstrou que os métodos de sanitização aplicados não foram eficientes para a redução da contaminação microbiológica natural da rúcula. Como consequência, o pH das amostras aumentou com o decorrer do período de armazenamento, o que também se refletiu na redução da acidez total. O óleo essencial de tomilho apresentou forte atividade antimicrobiana *in vitro*, frente a todas as espécies de bactérias testadas. Nos experimentos *in situ*, o óleo essencial de tomilho (0,2%) e o hipoclorito de sódio (120 ppm) não foram eficientes na eliminação de *Escherichia coli* inoculada em rúcula minimamente processada (3 Log UFC/g), em comparação ao controle. Os métodos de sanitização aplicados não foram eficientes para a redução da contaminação microbiológica natural da rúcula e não resultaram em extensão da vida de prateleira deste produto.

Palavras-chave: consumidor, extratos vegetais, hortaliças, minimamente processados, sanitizantes

3 CAPÍTULO I

Potential of thyme essential oil in the arugula sanitization

(Norma de acordo com a revista Ciência e Agrotecnologia UFLA)

Abstract

Essential oils from plants are important alternative sources of antimicrobial compounds against important pathogens in food safety. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity *in vitro* of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*), and to apply it in

the sanitization of arugula (*Eruca sativa*) minimally processed, aiming to increase its safety and shelf life. Antibacterial activity *in vitro* in the essential oil was evaluated by disc diffusion assays, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bacterial concentration (MBC) determination against different species of important bacteria in food, and showing a strong antibacterial activity of thyme essential oil for both Gram-positive bacteria and Gram-negative species tested, with MIC values ranging from 0.075 to 0.62 mg mL⁻¹. Thereafter, a "challenge test" was carried out to evaluate the antibacterial activity in the thyme essential oil (0.2%) applied in the sanitization of arugula, artificially contaminated with *Escherichia coli* (10³ CFU mL⁻¹), compared to sodium hypochlorite (120 ppm) and distilled water (negative control). In this experiment, there was no significant difference (p<0.05) among the treatments applied, except for a lower *E. coli* count in the sanitized arugula with sodium hypochlorite, on the second day of storage at 8°C. Afterwards, an experiment of applying the thyme essential oil (0.2%) as a sanitizing agent in minimally processed arugula was carried out to evaluate this vegetable shelf life compared to sodium hypochlorite (120 ppm) and distilled water (negative control). After the treatments, the arugula was stored at 8°C for seven days, and periodically the number of aerobic mesophilic microorganisms, pH determination, titratable acidity were counted, and color of the samples was evaluated. The microbiological evaluation showed that the sanitation methods applied were not efficient to reduce the arugula natural microbiological contamination. Therefore, pH of the samples increased during the storage period, which was also reflected on the titratable acidity reduction. The thyme essential oil had strong antimicrobial activity *in vitro* against all species of bacteria tested. In the experiments *in situ*, the thyme essential oil (0.2%), and sodium hypochlorite (120 ppm) were not efficient to eliminate the inoculated *Escherichia coli* in minimally processed arugula (3 Log CFU g⁻¹) in comparison to the control. The sanitization methods applied were not efficient to reduce the natural microbiological contamination of arugula, and did not result in an extension of the shelf life of this product.

Keywords: *Eruca sativa*, *Thymus vulgaris*, consumer, sanitizers, vegetables minimally processed

3.1 Introdução

A busca constante por alimentos saudáveis, sem residual químico, que mantenham as propriedades nutricionais e sensoriais asseguradas, tem motivado a indústria de alimentos a substituir bactericidas e bacteriostáticos químicos por produtos naturais. Outro fator preocupante é a resistência bacteriana à maioria dos antimicrobianos existentes em razão das subdosagens de concentrações nas etapas de higienização de alimentos, além de os resíduos desses produtos serem eliminados na natureza, comprometendo a saúde pública (HYUN et al., 2015).

Entre as bactérias de importância alimentar, destacam-se *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis, e *Listeria monocytogenes*, entre outras, por serem responsáveis por surtos de gastroenterites em todo o mundo. Outros microrganismos deteriorantes provocam perdas econômicas, pois afetam a qualidade sensorial dos produtos minimamente processados, pelo rompimento das paredes celulares do vegetal, provocando estresse, expondo as enzimas e substratos, diminuindo a vida útil dos alimentos (SIROLI et al., 2015).

Na busca de novas alternativas de antimicrobianos com atividade de amplo espectro, pesquisas estão sendo conduzidas com espécies vegetais que contêm compostos bactericidas e bacteriostáticos. Em estudos, vários extratos vegetais já foram testados, com resultados variados, e alguns óleos essenciais vêm sendo usados na conservação de alimentos (KHAN et al., 2014).

Entre as plantas com potencial antimicrobiano, está o tomilho (*Thymus vulgaris* L), cujo óleo essencial é composto por componentes fenólicos como o timol, com ação antibacteriana efetiva, que, em sinergismo com o p-cimeno e o carvacrol, desorganiza a estrutura celular, promovendo a desnaturação das enzimas essenciais (ULKHEIR, 2014).

Este estudo objetivou avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas através do teste disco-difusão, determinar o efeito antimicrobiano do OE de tomilho em comparação ao cloro na sobrevivência de *E. coli*, inoculada em rúcula minimamente processada, e avaliar a vida de prateleira de rúcula sanificada com uma concentração de óleo essencial de tomilho em comparação à sanificação com hipoclorito de sódio.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Obtenção do óleo essencial

O experimento foi conduzido no laboratório de microbiologia de alimentos do Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Concórdia, SC. O óleo essencial de tomilho foi adquirido comercialmente da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda, Vargem Grande Paulista, SP, acompanhado de certificado de pureza e procedência.

3.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, foram testadas as seguintes espécies bacterianas de importância em alimentos: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, obtidos da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do IFC, Campus Concórdia.

3.2.3 Detecção da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco

A detecção da atividade antimicrobiana do extrato foi feita de acordo com o documento M2-A8 da CLSI (CLSI, 2009a), com algumas adaptações de Silveira (2012).

O inóculo foi preparado a partir da cultura ativa de cada espécie bacteriana, diluída em solução salina 0,9% a uma concentração de aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹, comparável à solução padrão de McFarland 0,5, verificada, espectrofotometricamente, a 625 nm.

A suspensão foi diluída a, aproximadamente, 10^7 UFC mL⁻¹, em solução salina, e esta suspensão foi utilizada para inocular placas de ágar Mueller- Hinton, utilizando swab estéril. Discos de papel filtro estéreis (9 mm de diâmetro) foram impregnados com 25 µL de óleo essencial de tomilho e depositados sobre as placas inoculadas, incubadas a 36°C por 18-24 horas. Discos comerciais de ampicilina (10 µL disco⁻¹) e cloranfenicol (30 µL disco⁻¹) foram utilizados como controles positivos. O diâmetro da zona de

inibição foi, então, medido em milímetros. Este ensaio foi feito em triplicata, e o valor, apresentado como a média (\pm desvio padrão).

3.2.4 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada para as espécies bacterianas que apresentaram susceptibilidade ao teste de difusão em ágar pelo método de microdiluição, com base no documento M7-A8 do CLSI (CLSI, 2009b), adaptado por Silveira (2012). Os extratos foram diluídos à concentração de 100 mg mL^{-1} em dimetilsulfóxido (DMSO). A seguir, foram preparadas séries de diluições sucessivas, na faixa de 10 mg mL^{-1} a $0,075 \text{ mg mL}^{-1}$, em caldo Mueller-Hinton. Foram adicionados aos poços das placas de microdiluição $100 \text{ }\mu\text{L}$ de cada solução diluída e $5 \text{ }\mu\text{L}$ da suspensão bacteriana. Foram mantidos controles de esterilidade (caldo Mueller-Hinton adicionado de DMSO e sem adição do inóculo) e controles de crescimento (caldo Müller-Hinton adicionado de DMSO e inóculo). As placas foram incubadas a 36°C por 18-24 h, e o crescimento microbiano, detectado visualmente e confirmado pela adição de $20 \text{ }\mu\text{L}$ de solução aquosa de cloreto de 2, 3, 5 trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% (m/v) com incubação adicional de uma hora à mesma temperatura. O ensaio foi feito em triplicata, e os resultados expressos em mg mL^{-1} . A CMI foi definida como a menor concentração do extrato capaz de inibir totalmente o crescimento microbiano.

3.2.5 Determinação da concentração mínima bactericida (CMB)

A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada a partir das placas utilizadas para a determinação de CMI, pela metodologia descrita por Celiktas et al. (2007). De cada poço onde não ocorreu crescimento microbiano, foram transferidos $10 \text{ }\mu\text{L}$ para placas de ágar tripton de soja (TSA).

As placas foram incubadas a 36°C por 24 horas, e o crescimento de colônias foi, então, verificado. As análises foram feitas em triplicata, e os resultados, expressos em mg mL^{-1} . A CMB foi definida como a menor concentração do extrato que impediu totalmente o crescimento microbiano nas placas.

3.2.6 Avaliação da atividade antimicrobiana

3.2.6.1 Sanitização prévia

As folhas de rúculas foram adquiridas de um produtor local, cuja colheita foi feita nas primeiras horas da manhã e refrigeradas a 8°C até o momento dos tratamentos. Para a seleção das folhas de rúcula, foram retiradas todas aquelas com lesões mecânicas, amareladas e pequenas, padronizadas em tamanhos de 10 cm de comprimento. Inicialmente fez-se a lavagem da rúcula em água corrente para retirada de sujidades maiores, que foi retirada da água e depositada sobre uma peneira para drenagem. Pesou-se a quantidade de 360 g de rúcula e, para sanitização prévia, as folhas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 250 ppm por 10 minutos, na proporção 1/15(p/v), com posterior drenagem. Na sequência, foi feita a imersão das folhas de rúcula em 5400 ml de água destilada por 2 min, por duas vezes, seguida de drenagem.

3.2.6.2 Preparação do inóculo

O inóculo de *Escherichia coli* ATCC 25922 foi obtido do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal Catarinense-Campus Concórdia. A ativação da cepa de *E. coli* foi feita em placas com ágar tripton de soja (TSA), incubadas a 35°C por 12 a 18 horas. A partir destas placas, tomaram-se de 3 a 5 colônias isoladas, que foram transferidas para caldo triptose de soja (TSB), incubado a 35°C por 2 a 6 horas, a fim de obter uma cultura em crescimento ativo (CLSI, 2009a). O inóculo foi preparado a partir de uma cultura ativa, diluída em solução salina 0,9%, a uma concentração de, aproximadamente, 10^8 UFC mL⁻¹, comparável à solução padrão de McFarland 0,5, verificada, espectrofotometricamente, a 625 nm.

A suspensão foi diluída a, aproximadamente, 10^6 UFC mL⁻¹ em solução salina 0,9%, e um volume adequado desta suspensão (4,3 mL) foi adicionado a 5400 mL de água destilada, a fim de obter uma suspensão contendo aproximadamente 10^3 UFC/mL¹.

Para confirmar o nível de inóculo efetivamente utilizado, foi feita a contagem de *E.coli* nesta suspensão, inoculando 0,1 mL, pela técnica de inoculação em superfície, em ágar Eosina Azul de Metileno (EAM), incubado a 35°C por 24 horas, com posterior contagem das colônias e cálculo do resultado.

A rúcula foi imersa na suspensão de *E.coli* (10^3 UFC mL⁻¹) durante dois minutos, com leve agitação com bastão de vidro, sendo após drenado o excesso de líquido. Os 360 g de rúcula foram divididos em porções de 120g para a aplicação de cada tratamento.

3.2.6.3 Aplicação dos tratamentos de sanificação

Para a aplicação dos tratamentos, 120g de rúcula foram mergulhados durante 2 min em solução de imersão (1/15, p/v) em temperatura ambiente sob suave agitação com bastão de vidro. Para o tratamento com OET a 0,2% (T1), misturou-se em um vortex o OE com 0,5% de tween 80, para garantir a miscibilidade do OE em água. Na sequência, a solução foi misturada com o volume apropriado, e a rúcula, imersa nesta solução por 2 min, após, colocando-se em peneira para drenagem. Para o tratamento com hipoclorito de sódio, preparou-se uma solução a 120 ppm (T2) em água destilada, seguindo o mesmo procedimento descrito acima, e como tratamento controle (C), utilizou-se somente água destilada. Em seguida, a rúcula foi dividida em porções de 10 g e armazenada em sacos plásticos estéreis, devidamente identificados com cada tratamento, em três repetições, perfazendo doze amostras para cada tratamento, sendo após, refrigerados à temperatura de 8°C, por sete dias.

3.2.6.4 Enumeração de E. coli

Para a enumeração da *E. coli* nos dias 0, 2, 5 e 7, foram adicionados às amostras das saquetas de cada tratamento (10 g), 90 ml de água peptonada a 0,1% e se homogeneizou em bagmixer durante 60 segundos. Após a homogeneização, as amostras foram diluídas e inoculadas em placas de ágar Eosina azul de metileno (EMB), através da semeadura em superfície. As placas foram incubadas a 35-37°C durante 48 horas e após, as colônias foram contadas.

3.2.7 Avaliação da vida de prateleira

3.2.7.1 Preparo e tratamento das amostras

Para aplicação dos tratamentos, 420 g de rúcula foram mergulhados durante 2 min em solução de imersão (1/15 p/v) em temperatura ambiente sob suave agitação com bastão de vidro. Os tratamentos consistiram de OE de tomilho a 0,2% (T1), hipoclorito de sódio a 120 ppm (T2) e água destilada (T3) preparados conforme descrito no item anterior. Em seguida a rúcula foi dividida em porções de 10 g para a realização das análises físico-químicas e embaladas em sacos plásticos, devidamente identificados e armazenados a 8°C por sete dias, sendo que análises foram feitas nos dias 0, 2, 4 e 7. Para as análises microbiológicas, os tratamentos foram divididos em amostras de 25g, armazenados em sacos plásticos estéreis, devidamente identificados, e armazenados à mesma temperatura por sete dias. Foram feitas três repetições para cada tratamento.

3.2.7.2 Contagem total de Microrganismos Aeróbios Mesófilos

Foram pesados 25 g de amostra em câmara de fluxo laminar, homogeneizados com 225 ml de água peptonada (0,1%) em Bag-mixer®, durante um minuto. Após a homogeneização, foram preparadas diluições decimais sucessivas, utilizando como diluente água peptonada 0,1%.

Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram inoculadas em “Plate Count Agar” (PCA) pela técnica de inoculação em superfície, com incubação a 35-37°C por 48 horas e posterior contagem das colônias. Os resultados foram expressos em UFC g⁻¹ (BRASIL, 2003).

3.2.7.3 Avaliação da cor

A avaliação dos parâmetros de cor foi feita por um colorímetro da marca Konica Minolta®, modelo cr 400. A cor foi expressa pelo sistema de coordenadas retangulares L*, a* e b*, conforme a CIE (Comissão Internatinal de L'Eclairage), em que L* é o croma associado à luminosidade L=0 (preto) e L= 100 (branco), a* representa a intensidade de cor vermelha (+) ou verde (-) e b*, a intensidade de cor amarela (+) ou azul (-). As amostras de rúcula foram colocadas em superfície plana, evitando sobreposições, e feitas três leituras marcando a folha em três pontos na parte média na face adaxial, procedimento feito em triplicata. O Croma é a relação entre os valores de a* e b*, em que se obtém a cor real do produto analisado. Hue-Angle é o ângulo formado entre a* e b*, indicando a saturação da cor do produto. Para cálculo do

Croma, foi utilizada a fórmula matemática $C = \sqrt{a^2 + b^2}$, e para se calcular Hue-Angle, a fórmula $H^\circ = \arctan b^*/a^*$

3.2.7.4 Determinação do pH e Acidez total (AT)

As avaliações de pH e acidez total foram feitas em triplicata e seguiram as determinações do Instituto Adolfo Lutz (IAL) (2008).

Foram pesados 10 g da amostra em um béquer, adicionados de 100 mL de água destilada. Homogeneizou-se a amostra até que as partículas ficassem uniformemente suspensas.

O pH foi determinado utilizando um pHmetro digital de bancada, marca mPA 210, MS Tecnopon®, com compensação automática de temperatura.

Para a determinação da acidez, a amostra foi titulada com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹. Por serem amostras coloridas ou turvas, utiliza-se o potenciômetro para a determinação do ponto de viragem.

O resultado foi expresso em percentual de ácidos orgânicos totais, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Acidez \% (v/p)} = [V \times N \times f \times 100] / P$$

em que: V=volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação;

f =fator de correção da solução de hidróxido de sódio; e

P=g ou ml da amostra usado na titulação.

3.2.7.5 Estatística

A análise estatística descritiva foi o método adotado para a avaliação do padrão de distribuição de frequência dos dados, detecção de valores anômalos, em um fatorial 4 x 3, utilizando o software R versão 3.5. 0. As análises foram feitas com o software R, com auxílio dos pacotes Agricolae, versão 1.2-8, e ExpDes pt, versão 1.2.0. Para testar a normalidade, foi utilizado o gráfico quantil-quantil (q-q) para distribuição normal dos resíduos, juntamente com os testes de Shapiro-Wilk (normalidade, shapiro.test) e de Bartlett (homogeneidade, bartlett.test). Também foi verificada a aditividade dos efeitos dos tratamentos e dos blocos, com as funções de aditividade de Tukey (tukey.add.test). Com os pressupostos atendidos, foi feita a análise de variância (ANOVA), aplicando-se

o teste F. Para as variáveis, cujo teste F foi significativo, foram comparadas as médias pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho

Observa-se que OET apresentou forte atividade antibacteriana frente a todas as espécies de bactérias testadas, sendo que as bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *B. cereus* e *L. monocytogenes* apresentaram maior zona de inibição do que as Gram-negativas *E. coli* e *S. typhimurium* (Tabela 1). Explica-se esse resultado pelo fato de as bactérias Gram-negativas terem uma membrana externa com a função de barrar a entrada de macromoléculas e substâncias hidrofóbicas e seu interior conter ácidos graxos que as tornam mais resistentes (NAZZARO et al., 2013; PICONE et al., 2013). Especificamente, *Salmonella* sp. tem bombas que expulsam de forma seletiva compostos tóxicos quando elas se encontram em um ambiente adverso (SHEN et al., 2014). Entre as espécies Gram-negativa testadas, *Salmonella typhimurium* foi a que apresentou maior inibição. De modo geral, os resultados alcançados pelo OET mostraram um bom potencial antibacteriano contra os cinco microrganismos testados em relação aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho, detectada no ensaio de difusão em disco (mm)

MICROORGANISMOS	ÓLEO		
	ESSENCIALDE TOMILHO	AMPICILINA	CLORANFENICOL
<i>Staphylococcus aureus</i>	40,00±1,07	23,75±0,25	27,62±0,12
<i>Bacillus cereus</i>	45,30±10,91	18,25±0,75	26,55±0,05
<i>Escherichia coli</i>	37,20±1,40	21,20±0,00	28,68±0,18
<i>Salmonella typhimurium</i>	39,10±8,36	27,45±0,05	28,10±0,10
<i>Listeria monocytogenes</i>	46,50±4,05	35,00±1,22	11,15±0,05

Zona de inibição incluindo o diâmetro do disco, de 9mm. Os dados referem-se à média de quatro repetições, \pm desvio padrão. Graus de inibição: 10 -13,9 mm: fraca; 14-18 mm: moderada; >8 mm: forte.

Em estudos *in vitro*, o OET apresentou atividade antimicrobiana contra várias estirpes bacterianas. Oulkheir et al. (2017) demonstraram que o OET teve boa atividade antibacteriana contra *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* sp., com zonas de inibição entre 18 e 22 mm.

Os baixos valores apresentados pela concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB), apresentados na Tabela 2, confirmam forte atividade antibacteriana do OET, com CMI entre 0,075 mg mL⁻¹ e 0,62 mg mL⁻¹ para os cinco microrganismos testados. *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* sofreram maior inibição frente ao OET (0,075 mg mL⁻¹), porém se mostraram mais resistentes à sua ação bactericida (1,25 mg mL⁻¹). *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*, patógenos de grande importância alimentar, mostraram a mesma sensibilidade ao OET, com CMI de 0,62 mg mL⁻¹.

Tabela 2. Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) (mg/ml) do óleo essencial de tomilho contra microrganismos testados

BACTÉRIA	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,62	0,62
<i>Bacillus cereus</i>	0,075	1,25
<i>Escherichia coli</i>	0,075	1,25
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,62	0,62
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,62	1,25

Os testes foram feitos em triplicata e os valores modais são apresentados.

Os compostos do OET são constituídos por 50% de timol, 30% p-cimeno e 5% de carvacrol. O timol é um composto fenólico com ação antibacteriana efetiva e a coesão com os demais componentes desorganiza a estrutura celular, promovendo a desnaturação das enzimas essenciais (PEREIRA et al., 2014). O mesmo foi observado por Pirbalouti et al. (2013), que identificaram 24 compostos no tomilho, sendo os principais o timol, carvacrol, p-cimeno e s-terpineno. Resultados semelhantes são mencionados por Santurio et al. (2014), que verificaram que o OET mostrou atividade bacteriostática e bactericida superior a seu principal composto, o timol, que foi testado de forma isolada contra cepas de *E. coli*, pressupondo que a atividade antimicrobiana mostrada por alguns óleos essenciais resultasse do sinergismo dos componentes. Por outro lado, Ivanovic et al. (2013) testaram compostos isolados de tomilho como o timol e p-cimeno contra *E. coli*, *Salmonella enteritidis* e *Bacillus cereus*, tendo os resultados demonstrado maior atividade antibacteriana contra as cepas de *Bacillus cereus*, sendo este o microrganismo mais suscetível. Testes conduzidos por Siroli et al. (2015), com diferentes concentrações de OET, orégano e o componente isolado carvacrol, evidenciaram que os melhores resultados observados, tanto de CMI como de CMB, foram os do OET, com inibição ligeiramente maior das bactérias Gram-positivas *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, seguida das Gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*).

3.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho sobre *Escherichia coli* inoculada em rúcula minimamente processada

Os resultados dos tratamentos frente a *E. coli*, inoculada em amostras de folhas de rúcula, com uma carga inicial de 10^3 UFC/mL, demonstraram que não houve diferença significativa entre as amostras de rúcula submetidas aos diferentes tratamentos (Tabela 3), com exceção da rúcula sanificada com hipoclorito de sódio, que apresentou uma menor contaminação por *E. coli* ($p < 0,05$), ao segundo dia de armazenamento.

Tabela 3. Efeito do óleo essencial de tomilho, hipoclorito de sódio e água destilada na sobrevivência da *Escherichia coli* inoculada em amostras de rúcula armazenadas durante 7 dias a 8°C (log UFC/g)

Dias	Tratamentos		
	Controle	Hipoclorito de sódio	OET
0	2,00±0,3 Ac	2,12±0,48 Ac	3,07±0,61 Ac
2	3,67±0,93Ab	1,91±1,68 Bc	4,88±0,68 Ab
5	4,77±0,24 b	4,80±0,07 Ab	4,88±0,61 Ab
7	6,98±0,05 Aa	6,45±0,49 Aa	7,45±0,22 Aa

Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0,05$. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

Estes resultados podem ser explicados pelo fato de a *Escherichia coli* ser uma bactéria gram-negativa, pois nos testes *in vitro* ela mostrou menor suscetibilidade em relação aos demais microrganismos testados. Quando *in situ* a *E. coli* sofre mudanças fisiológicas celulares importantes em ambientes estressantes como a falta de nutrientes, o calor e a alta salinidade (FORSYTHE, 2002); por outro lado, o OET pode sofrer algumas alterações quando em contato com o ambiente, pois sofre volatilização, e o calor, luz ou oxigênio alteram seus componentes, sendo necessário um cuidado maior na dosagem e aplicação, limitando seu uso (VARONA et al., 2011).

A literatura mostra que resultados positivos foram observados por outros autores, porém foram utilizadas concentrações maiores de OET nos tratamentos e diferentes temperaturas de armazenamento. Como exemplo, Scollard et al. (2016) aplicaram, por aspersão, 0,5 mL de OET não diluído em folhas de alface contaminadas com *Listeria monocytogenes*, obtendo um efeito inibitório significativo. Sirolli et al. (2015) também obtiveram resultados promissores com a aplicação do OET quando

utilizado para sanificar alface de cordeiro (*Valerinella locusta* sp.) no combate a *E. coli*, estando este microrganismo sempre abaixo dos limites de detecção. Karagözlü et al. (2011) utilizaram OE de menta e manjerição em diferentes concentrações, em alface e boldroegas armazenados a 4°C, contra *E. coli* e *Salmonella typhimurium*, tendo a concentração de óleo essencial de menta e manjerição na concentração de 0,08 ml L⁻¹ sido a mais eficaz contra as duas bactérias. Walker al. (2016) observaram potencial aplicação do OE de manjerona na concentração de 0,5% no tratamento de rúcula armazenada a 8°C.

3.3.3 Avaliação da vida de prateleira

3.3.3.1 Contagem total de Microrganismos Aeróbios Mesófilos

De acordo com os resultados, é possível observar que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos entre o controle e os tratamentos aplicados para a sanitização das folhas de rúcula, desde o dia de aplicação dos tratamentos até o quinto dia de armazenamento a 8°C (Tabela 4). Ao final de sete dias, a contagem deste grupo de microrganismos na rúcula tratada com óleo essencial de tomilho foi superior ao controle e ao tratamento com hipoclorito de sódio ($p < 0,05$).

Tabela 4. Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos (Log UFC/g) em folhas de rúcula sanificadas com OE de tomilho, hipoclorito de sódio e água destilada, durante o período de armazenamento a 8°C

Dias	Tratamentos		
	Controle	Hipoclorito de sódio	OET
0	7,15 ± 0,24 Ab	5,84 ± 1,32 Aa	6,59 ± 0,62 Ab
2	8,19 ± 0,40 Aa	6,86 ± 0,68 Aa	7,83 ± 0,54 Aab
5	8,15 ± 0,47 Aa	7,89 ± 0,88 Aa	8,11 ± 0,55 Aa
7	8,35 ± 0,2 Ba	8,08 ± 0,11 Ba	9,01 ± 0,10 Aa

Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0,05$. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

A concentração do óleo essencial de tomilho pode ter contribuído para que houvessem um crescimento maior de microrganismos aeróbicos mesófilos a partir do quinto dia de armazenamento. Dependendo das condições de armazenamento,

tratamentos e de características específicas de cada alimento, a flora bacteriana total pode aumentar durante o armazenamento, influenciando o tempo de vida de prateleira, causando alterações nos tecidos, cor, sabor e odor (FORSYTHE, 2002, HYIUN et al., 2015; MONTEIRO, 2016).

A eficácia dos óleos essenciais aplicados em frutas e vegetais depende da sua concentração, do tempo de contato do vegetal com a solução contendo o óleo essencial e de fatores físicos, químicos e metabolismo inerentes ao produto, como presença de gordura, proteína, teor de água, antioxidantes, pH e sal, morfologia de superfície, capacidade de repelir ou absorver água, rugosidades e características dos microrganismos (BAJPAI et al., 2012; MOORE-NEIBEL et al., 2013). Por outro lado, maiores concentrações de óleos essenciais podem causar mudanças organolépticas indesejáveis nos alimentos, pelo forte aroma e sabor, como observados por diversos autores em estudos anteriores (HYIUN et al., 2015; SANTOS, R. et al., 2017; SCOLLARD et al., 2016).

3.3.3.2 Determinação do pH e Acidez total

Observa-se que pH inicial das amostras variou entre 6,34 e 6,44 e que não houve variação significativa do pH entre os diferentes tratamentos nos dois primeiros dias de armazenamento (Tabela 5). Observou-se que no quarto dia de armazenamento o pH do controle teve uma elevação significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o tratamento com hipoclorito de sódio e o tratamento com OET. No sétimo dia de armazenamento, a rúcula sanitizada com OET apresentou maior pH ($p < 0,05$) do que aquela tratada com hipoclorito de sódio e o controle.

Tabela 5. Valores de pH e Acidez titulável total (ATT) em folhas de rúcula sanificadas com óleo essencial de tomilho, hipoclorito de sódio e controle durante o período de armazenamento a 8°C

Dias	Tratamentos		
	Controle	Hipoclorito de sódio	OET
Ph			
0	6,34 Ac	6,43 Ab	6,44 Ac
2	6,74 Ab	6,68 Ab	6,66 Abc
4	7,87 Aa	7,10 Ba	7,00 Bb
7	7,52 Ba	7,4 Ba	8,20 Aa
ATT			
0	0,50 Aba	0,37 Ba	0,57 Aa
2	0,53 Aa	0,40 Aa	0,37 Ab
4	0,10 Bb	0,27 Aba	0,37 Ab
7	0,20 Ab	0,23 Aa	Não titulado

Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0,05$. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

Valores semelhantes de pH foram encontrados por Jardina et al. (2017) até o sexto dia de armazenamento de cultivares de rúcula sanificadas com hipoclorito de sódio, refrigeradas a 8°C.

A faixa de pH entre 6,5 e 7,5 é a mais favorável para o desenvolvimento da maioria dos microrganismos, tanto os deteriorantes quanto os patogênicos. A deterioração dos alimentos de origem vegetal pelos microrganismos leva ao aumento do pH e à consequente diminuição da acidez (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

Com relação à acidez total, observou-se que, de modo geral, este parâmetro físico-químico refletiu as alterações de pH ocorridas durante o período de armazenamento da rúcula, ou seja, ao passo que o pH aumentou durante o armazenamento, os valores de acidez decaíram, o que era esperado em razão do natural processo de deterioração do vegetal. A partir do segundo dia de armazenamento, os valores de acidez total tiveram uma queda significativa em todos os tratamentos até o último dia de armazenamento.

Valores elevados de pH e valores inferiores de acidez são indicadores de alimentos em processo de deterioração (CHITARRA, M.; CHITARRA, A., 2005), estando a acidez total diretamente ligada à conservação dos vegetais, pois é ela que

mede os ácidos orgânicos, ou seja, menores valores de acidez significam qualidade inferior dos vegetais (COSTA et al., 2007).

3.3.3.3 Avaliação da cor

Os parâmetros instrumentais L*, a* e b* foram mensurados visando à detecção de possíveis mudanças de cor durante a vida de prateleira da rúcula (Tabela 6). Neste sentido, foi analisado de forma individual o parâmetro de L*, que indica a luminosidade (ou teor de branco de uma amostra). Em relação a este parâmetro, foi percebida diferença significativa ($p < 0,05$) do tratamento contendo OET ao final de vida de prateleira, que foi de 42,91, comparando com 46,85 e 49,26 para controle e Hipoclorito de sódio, respectivamente. Este fato se deve, muito provavelmente, ao efeito antioxidante, comportamento este vastamente conhecido dos óleos essenciais (ALMELA et al., 2013; KHAN et al., 2014; RUNYORO et al., 2010).

Tabela 6. Médias para o parâmetro físico cor, com valores individuais L*, b* e a* nas folhas de rúcula minimamente processadas

Dias	Tratamentos		
	Controle	OET	Hipoclorito de sódio
	L*		
0	45,08 Aa	42,74 Ba	45,27 Aa
2	46,28 Aa	41,60 Aab	46,03 Aa
4	38,12 A b	35,78 Ab	34,31 Ab
7	46,85 Aba	42,91 Ba	49,26 Aa
	a*		
0	-28,28 Aa	-17,36 Aa	-19,57 Ab
2	-20,43 Aa	-15,97 Aa	-20,03 Ab
4	-14,02 Ba	-13,04 Aa	-13,83 Ba
7	-20,52 Aa	-18,94 Aa	-20,77 Ab
	b*		
0	27,08 Ab	30,21 Ab	30,01 Ab
2	32,12 Ab	31,74 Ab	31,04 Ab
4	17,41 Aa	16,19 Aa	17,24 Aa
7	34,94 Bb	29,34 Ab	36,28 Bc

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0,05$. Médias seguidas de mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

As coordenadas de a* (verde/vermelho) apresentaram diferença significativa no sétimo dia de armazenamento, sendo maior no tratamento controle e hipoclorito de sódio, -20,52 e -20,77, respectivamente, em relação ao OET (-18,94). A coordenada cromática b* (azul/amarelo) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores

apresentados pelo tratamento com óleo essencial de tomilho no último dia da vida de prateleira, que foi de 29,34, comparada a 34,9 para o Controle e Hipoclorito de Sódio, de 36,28. Neste trabalho foi observado que, para a rúcula minimamente processada, são esperados valores de L* e b* menores, ou seja, mais escuros, e parâmetros de a* mais negativos, que indicam manutenção do produto “Fresco”, ou seja, que mantenha a cor característica do verde-escuro da rúcula. Frutas e vegetais no período de pós-colheita deterioram-se rapidamente pelo aumento da taxa de respiração, aumento da produção de etileno, conseqüentemente ativando/iniciando reações de alteração como perdas de nutrientes e alteração da cor (BEM-FADHEL et al., 2017).

3.4 Conclusão

O óleo essencial de tomilho apresentou forte atividade antimicrobiana *in vitro*, frente a todas as espécies de bactérias testadas.

Nos experimentos *in situ*, o óleo essencial de tomilho (0,2%) e o hipoclorito de sódio (120 ppm) não foram eficientes na eliminação de *Escherichia coli* inoculada em rúcula minimamente processada (3 Log UFC g⁻¹), em comparação ao controle.

Os métodos de sanitização aplicados não foram eficientes para redução da contaminação microbiológica natural da rúcula e não resultaram em uma extensão da vida de prateleira deste produto.

3.5 Referências

ALMELA et al. Influence of minimally processed grapes washing with lemon essential oil. **Food Research Journal**. 21(5):1851-1857. 2013.

BAJPAI, V. K. et al. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: a review. **Food Research International**, n. 45, p. 722-734, 2012.

BEM-FADHEL et al. Active edible coating and γ -irradiation as cold combined treatments to assure the safety of broccoli florets (*Brassica oleracea* L.). **International Journal Of Food Microbiology**, v. 241, p. 30-34, 2017.

BRASIL. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análise Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Seção 1, p. 14, 2003.

CELIK TAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of metanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, p. 553-559, 2007.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: Fisiologia e Manuseio**. 2 ed. Ver. Amp. Lavras: Ed. UFLA, 783 p. il. Color. 2005.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Tenth Edition**. CLSI document M2-A10 [ISBN 1-56238-688-3]. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087 USA, 2009a.

_____. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Eighth Edition**. CLSI document M7-A8 [ISBN 1-56238-689-1]. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087 USA, 2009b.

COSTA, J. M. C. et al. Comparação dos parâmetros físico-químicos e químicos de pós alimentícios obtidos de resíduos de abacaxi. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 38, n. 2, p. 228-232, 2007.

FORSYTHE, S. J. **Microrganismos causadores de doenças de origem alimentar: Microbiologia de segurança alimentar**. Artmed, p.164-168, 2002.

FRANCO, F.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Cap. 6, 576 p. 2003.

HYUN, J. E. et al. Preservative effectiveness of essential oils in vapor phase combined with modified atmosphere packaging against spoilage bacteria on fresh cabbage. **Food Control**, v. 51, p. 307-313, 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Método físico-químico para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea – São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, p.1020.

IVANOVIC, J. et al. Evaluation and improvement of antioxidant and antibacterial activities of supercritical extracts from clove buds. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 416-423, 2013.

JARDINA, L. L. et al. Comportamento fisiológico pós-colheita de cultivares de rúcula minimamente processadas. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 10, n. 1, p. 50-64, 2017.

KARAGOZLÜ, N. et al. Determination of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of *E. coli* 0157:H7 and *S. typhimurium* in fresh-cut lettuce and purslane. **Food Control**, v. 22, p. 1851- 1855, 2011.

KHAN, A. et al. Nanocellulose-based composites and bioactive agents for food packaging. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, p.163-174, 2014.

MONTEIRO, S. E. A. Avaliação da qualidade microbiológica de saladas prontas para consumo comercializadas na região de Lisboa. **Dissertação**, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2016.

- MOORE-NEIBEL, K. et al. Antimicrobial activity of oregano oil against antibiotic-resistant *Salmonella enterica* on organic leafy greens at varying exposure times and storage temperatures. **Food Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 123-129, 2013.
- NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, p.1451-1474, 2013.
- OULKHEIR, S. et al. Antibacterial Activity of Essential Oils Extracts from Cinnamon, Thyme, Clove and Geranium Against a Gram Negative and Gram Positive Pathogenic Bacteria. **Journal of Diseases and Medicinal Plants**, v. 3, n. 2-1, p. 1-5, 2017.
- PEREIRA, A. et al. Inativação termoquímica de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica* Enteritidis por óleos essenciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 11, p. 2022-2028, 2014.
- PICONE, G. et al. Evaluation of the effect of carvacrol on the *Escherichia coli* 555 metabolome by using H NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 141, p. 4367-4374, 2013.
- PIRBALOUTI, A. G. et al. Essential oil compositions, antibacterial and antioxidant activities of various populations of *Artemisia chamaemelifolia* at to phenological stages. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.23, p.861-869, 2013.
- RUNYORO, D. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. **Food Chemistry**, v.119, p. 311e316, 2010.
- SANTOS, R.R. et al. Use of essential oil in active food packaging: Recent advances and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, v.61, p.132-140, 2017.
- SANTURIO, D. F M. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho e de timol contra cepas de *Escherichia coli*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.42, p.1234, 2014.
- SCOLLARD, J. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth on fresh cut produce with thyme essential oil and essential oil compound verbenone. **Postharvest Biology and Technology**, v.120, p.61-68, 2016.
- SHEN, Y. et al. High Vanillin tolerance of an evolved *Saccharomyces cerevisiae* strain owing to its enhanced vanillin reduction and antioxidative capacity. **Journal in Microbiology Biotechnology**, v. 41, n. 11, p. 1637-45, 2014.
- SILVEIRA, S. M. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de louro (*L. nobilis*) como agente conservador natural em embutido cárneo frescal. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2012.
- SIROLI, L. et al. Natural antimicrobials to prolong the shelf- life of minimally processed lamb's lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, v.103, p. 35-44, 2015.
- VARONA, S. et al Liposomal incorporation of lavandin essential oil by a *thyme*-film hydration method and by particles from gas-saturated solutions. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 4, p. 2088-2097, 2011.

WALKER, J. F. et al. Antimicrobial activity of marjoram (*Origanum majorana*) essential oil against the multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar schwarzengrund inoculated in vegetables from organic farming. **Journal of Food Safety**. 2016. In: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfs.12266>>. Acesso: 24/10/2018.