

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

**Potencial antimicrobiano de óleos essenciais de *Pimpinella anisum* L.,
Syzygium aromaticum L. e *Origanum vulgare* L., e desenvolvimento de
coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas de óleos
essenciais para produtos cárneos**

Pâmela Inchauspe Corrêa Alves

Bacharel em Nutrição

Pelotas, 2019

Pâmela Inchauspe Corrêa Alves

**Potencial antimicrobiano de óleos essenciais de *Pimpinella anisum* L.,
Syzygium aromaticum L. e *Origanum vulgare* L., e desenvolvimento de
coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas de óleos
essenciais para produtos cárneos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Cômite de orientação:

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Prof^a. Dr^a. Caroline Peixoto Bastos

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A314p Alves, Pâmela Inchauspe Corrêa

Potencial antimicrobiano de óleos essenciais de PimpinellaanisumL., SyzygiumaromaticumL.e OriganumvulgareL.,e desenvolvimento de coberturas comestíveisa base de quitosana incorporadas de óleos essenciais para hambúrguer / Pâmela Inchauspe Corrêa Alves ; Eliezer Avila Gandra, orientadora ; Caroline Peixoto Bastos, Cláudio Dias Timm, coorientadores. — Pelotas, 2019.

131 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1 . Erva-doce. 2. Cravo-da-Índia. 3. Orégano. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Bioconservante. I. Gandra, Eliezer Avila, orient. II. Bastos, Caroline Peixoto, coorient. III. Timm, Cláudio Dias, coorient. IV. Título.

CDD : 641.1

Pâmela Inchauspe Corrêa Alves

Potencial antimicrobiano de óleos essenciais de *Pimpinella anisum* L.,
Syzygium aromaticum L. e *Origanum vulgare* L., e desenvolvimento de
coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas de óleos essenciais
para produtos cárneos

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre
em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos,
Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 30/01/2019

Banca examinadora:

Prof. Dr. Eliezer Gandra Avila (Orientador). Doutor em Ciência e Tecnologia
Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas – UFPEL

Prof^a. Dr^a. Caroline Peixoto Bastos (Co-orientadora). Doutora em Ciência e
Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas – UFPEL

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (Co-orientador). Doutor em Ciência e Tecnologia
Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas – UFPEL

Prof. Dr. Fabrizio da Fonseca Barbosa. Doutor em Engenharia Agrícola pela
Universidade Federal de Viçosa – UFV
(Titular)

Prof^a. Dr^a. Tatiane Kuka Valente Gandra. Doutora em Ciência e Tecnologia de
Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas – UFPEL
(Titular)

Dedico este trabalho aos meus pais e a minha
irmã.

Agradecimentos

A Deus pela força e amparo nesta jornada.

Aos meus pais, Jussara e Clóvis, pelo apoio e incentivo incondicional em todos os momentos da minha vida e da minha formação. Vocês são a minha base!

À minha irmã Camila, pelo incentivo, ensinamentos e por ter me presenteado com a minha amada afilhada Bárbara; ao meu cunhado, Marcelo, por estar disposto a me ajudar sempre que precisei.

Às minhas grandes amigas e incentivadoras Bianka, Júlia, Manoela e Maria Eduarda, obrigada pela amizade, companheirismo e compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu namorado William, pelas palavras de apoio, paciência e compreender as minhas ausências neste período.

À Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, obrigada pelo espaço e recursos disponibilizados.

Meu eterno agradecimento ao meu orientador Prof. Eliezer Avila Gandra pela confiança em mim depositada, paciência, amizade e ajuda incansável durante estes anos de trabalho. Deixo aqui minha gratidão e admiração.

Aos meus co-orientadores, Prof^a. Caroline Peixoto Bastos e ao Prof. Cláudio Dias Timm pela confiança e disposição em me ajudar sempre que necessário.

Ao Prof. Rogério Antônio Freitag por disponibilizar o uso do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (UFPel), a doutoranda Ivandra Ignês de Santi e a estagiária Letícia Raiele pela ajuda no processo de extração e na GC/MS.

À Prof^a. Mírian Galvão Machado pela gentileza em disponibilizar inúmeras vezes os equipamentos do Laboratório de Microbiologia e aos ensinamentos passados.

Às técnicas do Laboratório de Físico-Química de Alimentos do campus Capão do Leão, Cleuza, Cristine, Dionessa, Laura e Sabrine pela disposição em ajudar sempre que necessário.

À doutoranda Marjana Radunz pela grande ajuda no início do projeto, pelo apoio, incentivo e amizade.

A todos os estagiários do Laboratório de Ciência dos Alimentos e Biologia Molecular (UFPel). Em especial, as alunas Roberta e Bruna pela dedicação prestada, incontáveis momentos de ajuda, conversas, pelo respeito e amizade.

Aos colegas e amigos do PPGNA, pela troca de conhecimentos, palavras de apoio e aos inúmeros momentos que compartilhamos.

À Prof^a. Caroline Dellinghausen Borges, pelo empréstimo da quitosana e meios de cultura.

À Prof^a. Márcia de Mello Luvielmo, pelas valiosas considerações feitas no projeto de pesquisa e auxílio na análise referente a cobertura.

Aos membros da banca examinadora, agradeço a cortesia em aceitar integrar a banca de exame desta dissertação.

E agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

Resumo

ALVES, Pâmela Inchauspe Corrêa. **Potencial antimicrobiano de óleos essenciais de *Pimpinella anisum* L., *Syzygium aromaticum* L. e *Origanum vulgare* L., e desenvolvimento de coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas de óleos essenciais para produtos cárneos.** 2018. 127 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

A aplicação de conservantes químicos em produtos cárneos pela indústria, a fim de preservá-los de alterações químicas e microbiológicas indesejáveis, implica em riscos à saúde humana quando os mesmos são consumidos em excesso. Na busca por alternativas naturais para substituí-los, se encontram os óleos essenciais, os quais são amplamente conhecidos por suas propriedades antimicrobianas e podem ser incorporados em coberturas comestíveis, que permitem preservar as características sensoriais dos alimentos e fornecer ao consumidor um alimento nutricionalmente seguro. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi testar a capacidade conservante de coberturas bioativas a base de quitosana incorporadas de óleos essenciais de erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) em hambúrgueres. Através da análise cromatográfica (CG/MS), detectou-se os componentes majoritários anetol (95,88%), eugenol (56,06%) e 4-terpineol (22,71%) nos óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano, respectivamente. Na atividade antimicrobiana *in vitro*, apenas o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Entretanto, em micro-atmosfera, os três óleos essenciais reduziram o desenvolvimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O óleo essencial de cravo-da-índia foi aplicado como componente ativo em coberturas a base de quitosana em hambúrgueres, as quais se mostraram capazes de promover o controle da proliferação microbiana de Coliformes Totais, Coliformes a 45 °C e *Staphylococcus coagulase positiva* ao longo de 7 dias de armazenamento sob refrigeração. Os hambúrgueres foram avaliados por análise sensorial com os testes de aceitação e intenção de compra, demonstrando resultados satisfatórios para cor, odor e textura.

Palavras-chave: erva-doce; cravo-da-índia; orégano; atividade antimicrobiana; bioconservante; hambúrguer.

Abstract

ALVES, Pâmela Inchauspe Corrêa. **Antimicrobial potential of essential oils of *Pimpinella anisum* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Origanum vulgare* L., and the development of chitosan-based edibles coatings of essential oils for meat products.** 2019. 127 p. Dissertation (Master in Nutrition and Food) - Graduate Program in Nutrition and Food, Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2019.

The application of chemical preservatives in meat products by industry in order to preserve them from undesirable chemical and microbiological changes implies risks to human health when they are consumed in excess. In the quest for natural alternatives to replace them are the essential oils, which are widely known for their antimicrobial properties and can be incorporated into edible toppings that allow them to preserve the sensory characteristics of food and provide the consumer with nutritionally safe food. The objective of the present work was to test the preservative capacity of chitosan based bioactive coverings of essential oils of fennel (*Pimpinella anisum* L.), clove (*Syzygium aromaticum* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) in hamburgers. Through the chromatographic analysis (GC/MS), the major components of anethole (95.88%), eugenol (56.06%) and 4-terpineol (22.71%) were detected in the essential oils of fennel, clove and oregano, respectively. In the antimicrobial activity *in vitro*, only the essential oil of clove showed antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. However, in microatmosphere, the three essential oils reduced the development of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Clove essential oil was applied as an active component in chitosan-based coatings in hamburgers, which were shown to promote the control of the microbial proliferation of Total Coliforms, Coliforms at 45 ° C and *Staphylococcus coagulase positive* over 7 days of storage under refrigeration. The burgers were evaluated by sensory analysis with the acceptance and purchase intention tests, showing satisfactory results for color, odor and texture.

Keywords: erva-doce; cravo-da-índia; orégano; atividade antimicrobiana; bioconservante; hambúrguer.

Lista de Figuras

Revisão bibliográfica

Figura 1 Apresentação das diferenças entre as paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	23
Figura 2 Aplicação de coberturas comestíveis pelo método de (A) imersão e (B) pulverização	31
Figura 3 Desacetilação da quitina em quitosana	31

Manuscrito

Figura 1 Cromatografia do óleo essencial de erva-doce. Picos dos padrões: 1) Estragol; 2) Anetol; 3) Humuleno; 4) Acetato de isoeugenol	90
Figura 2 Cromatograma do óleo essencial de cravo-da-índia. Picos dos padrões: 1) Eugenol; 2) Cariofileno; 3) α -cariofileno	91
Figura 3 Cromatograma do óleo essencial de orégano. Picos dos padrões: 1) Sabineno; 2) 2-Careneno; 3) o-Cymol; 4) β -felandreno; 5) γ -terpineno; 6) Cis- β -terpineol; 7) α -terpinoleno; 8) 2-metil-5-(1-metiletil)-Biciclo[3.1.0]hex-2-eno; 9) 1-metil-4-(1-metiletil) Ciclohexano-1,4-dieno; 10) 4-terpineol; 11) α -terpineol; 12) Metil éter timol; 13) Bergamol; 14) Timol; 15) Cariofileno; 16) γ -elemeno	92
Figura 4 Frequência de respostas (%) obtidas para o teste de aceitação da amostra de hambúrguer com cobertura de quitosana incorporada com óleo essencial de cravo-da-índia	103
Figura 5 Frequência de respostas (%) obtidas para o teste de intenção de compra da amostra de hambúrguer com cobertura de quitosana incorporada com óleo essencial de cravo-da-índia	104

Lista de Tabelas

Manuscrito

Tabela 1	Formulações dos produtos cárneos análogos a hambúrgueres	86
Tabela 2	Componentes do óleo essencial de erva-doce, cravo-da-índia e orégano identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas	92
Tabela 3	Halos de inibição obtidos pelo método de difusão em poços por aplicação do óleo essencial de erva-doce, cravo-da-índia e orégano frente as bactérias <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	94
Tabela 4	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima do óleo essencial de cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i> L.) frente as bactérias <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	96
Tabela 5	Atividade antimicrobiana do essencial de erva-doce, cravo-da-índia e orégano em microatmosfera frente as <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	98
Tabela 6	Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Coliformes a 45°C (Termotolerantes) em hambúrgueres submetidos a diferentes tratamentos armazenados a 4°C por até 7 dias	100
Tabela 7	Média das quantificações de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva em hambúrgueres submetidos a diferentes tratamentos armazenados em temperatura de 4°C por até 7 dias	101

Sumário

1 Introdução	14
2 Objetivos	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 Hipóteses	17
4 Revisão bibliográfica	18
4.1 Erva-doce (<i>Pimpinella anisum</i> L.)	18
4.2 Cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i> L.)	19
4.3 Orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.)	20
4.4 Óleos essenciais de especiarias	21
4.4.1 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais	22
4.4.2 Métodos de avaliação do potencial antimicrobiano	25
4.5 Micro-organismos de importância em alimentos	26
4.5.1 Coliformes Totais e Coliformes a 45°C (Termotolerantes)	26
4.5.2 <i>Escherichia coli</i>	27
4.5.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	28
4.6 Coberturas comestíveis	29
4.6.1 Quitosana	31
4.7 Análise sensorial de alimentos	33
5 Projeto de Pesquisa	35
6 Relatório do Trabalho de Campo	77
7 Manuscrito	78
8 Considerações Finais	112
Referências	113
Apêndices	125

1 Introdução

Os alimentos são submetidos a diversas condições físicas, químicas e microbiológicas durante a produção primária, industrialização, armazenagem, transporte e comercialização, as quais podem ocasionar alterações na sua qualidade e segurança (MACWAN et al., 2016). Neste sentido, as questões relacionadas à segurança dos alimentos são consideradas uma das principais preocupações relativas à saúde pública, pois, segundo dados do Ministério da Saúde, os micro-organismos patogênicos constituem os principais agentes etiológicos de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (BURT, 2004; CELIKTAS et al., 2007; MACWAN et al., 2016; SVS/MS, 2018).

Classificado como um substrato favorável para a multiplicação microbiana, em virtude da sua constituição bioquímica e atividade de água, os produtos cárneos são passíveis de contaminação ao longo de toda cadeia produtiva (ORDÓÑEZ, 2005), sendo necessária a utilização de conservantes sintéticos, como nitrito, nitrato e seus respectivos sais de Sódio ou Potássio, para garantir a segurança do produto e não promover riscos microbiológicos para a saúde dos consumidores (DANNENBERG et al., 2016). Entretanto, tais aditivos podem apresentar toxicidade e potencial carcinogênico quando consumidos em excesso pelo homem (OMS, 2015).

Em paralelo com a necessidade de utilização de conservantes pelas indústrias para a preservação dos alimentos, há uma crescente demanda dos consumidores por produtos com menor adição de conservantes sintéticos, o que impulsiona a busca por alternativas naturais igualmente capazes de substituí-los (CALO et al., 2015). Dessa forma, os óleos essenciais têm sido amplamente estudados em consequência da sua comprovada propriedade antimicrobiana (SANTOS et al. 2011; HUSSEIN et al., 2011; AMARIEI et al., 2016).

Os óleos essenciais também nomeados como essências, óleos voláteis ou etéreos, são compostos naturais, voláteis e complexos, oriundos do metabolismo secundário de plantas aromáticas (SIMÕES et al., 2010). Em função das suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, os óleos essenciais apresentam potencial para serem empregados em alimentos, no entanto, o forte odor e sabor, geralmente atribuídos por estas substâncias adicionadas diretamente aos produtos alimentícios, podem ser limitantes para a

sua utilização (DA SILVEIRA et al., 2014; LU et al., 2014; SILVA-SANTOS, 2006; BAKKALI et al., 2008).

Deste modo, entre as alternativas para a aplicação dos óleos essenciais em produtos alimentícios, estuda-se a sua utilização concomitante com matrizes poliméricas em forma de filmes ou coberturas, as quais atuam como veículo para a incorporação de agentes antimicrobianos naturais. Entre elas, encontra-se a quitosana, um polissacarídeo derivado da quitina, que é um componente sintetizado por diversos organismos vivos, como as conchas de crustáceos, paredes celulares de fungos e leveduras, e exoesqueleto de artrópodes e insetos (KURITA, 2006).

Estudos recentes têm demonstrado efeitos antimicrobianos satisfatórios ao aplicarem, diretamente, óleos essenciais em matrizes alimentares ou, indiretamente, em filmes ou coberturas, comprovando a sua capacidade de atuação como antimicrobiano natural em modelos alimentícios (DANNENBERG et al., 2017; LEKJING, 2016; FERNÁNDEZ-PAN et al., 2015; SANCHEZ-ORTEGA et al., 2014; KHANJARI et al., 2013). Outros estudos confirmam a ação antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano frente bactérias de importância em alimentos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (HOSSEINI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2009; RAMADAN et al., 2013; SCOPEL et al., 2014).

Diante do exposto, a junção de uma cobertura comestível e um agente antimicrobiano natural se torna uma alternativa eficiente para assegurar a qualidade microbiológica do produto e a sua conservação, além de preservar, significativamente, as suas características sensoriais (DANNENBERG et al., 2017). Em consequência, contribuir com a oferta de alimentos nutricionalmente saudáveis e livres de agentes que possam causar riscos à saúde dos consumidores (SOTO et al., 2009).

Neste sentido, o presente estudo avaliou a capacidade conservante de coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas de óleos essenciais de erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) em hambúrgueres de carne bovina.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar a capacidade conservante de coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas de óleos essenciais de erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.), de forma individual ou em combinação, em hambúrgueres de carne bovina.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair e determinar o rendimento de extração dos óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano;
- Determinar a composição química dos óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano;
- Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano frente a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, e Gram-positiva *Staphylococcus aureus*;
- Desenvolver coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas dos óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano;
- Aplicar coberturas bioativas a base de quitosana incorporadas de óleos essenciais em hambúrgueres de carne bovina e avaliar a atividade antimicrobiana frente Coliformes Totais, Coliformes a 45°C (Termotolerantes) e *Staphylococcus coagulase* positiva;
- Verificar a aceitação sensorial dos hambúrgueres revestidos com coberturas comestíveis a base de quitosana adicionadas de óleo essencial.

3 Hipóteses

- Os óleos essenciais de erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) apresentam efeito antimicrobiano *in vitro* frente às bactérias patogênicas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.
- Coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas com óleos essenciais inibem o desenvolvimento de Coliformes Totais, Coliformes a 45°C (Termotolerantes) e *Staphylococcus* coagulase positiva em hambúrgueres de carne bovina.
- Hambúrgueres com coberturas comestíveis a base de quitosana adicionadas de óleos essenciais erva-doce, cravo-da-índia e orégano apresentam aceitação sensorial.

4 Revisão bibliográfica

4.1 Erva-doce (*Pimpinella anisum* L.)

Erva-doce é o nome dado a espécie vegetal *Pimpinella anisum* L., o qual pode ser confundido com a espécie *Foeniculum vulgare* Mill. por possuírem a mesma nomenclatura comercial de anis-estrelado, anis-doce, anis-verde ou funcho (CARVALHO, 2011; MACHADO SANTOS e ABRANTES, 2015). Entretanto, diferem-se entre si no aspecto morfológico, especialmente, no porte, coloração das flores e formato das folhas (CARVALHO, 2011).

Ambas as espécies pertencem à família botânica *Apiaceae*, também reconhecida pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICBN) como *Umbelliferae*. A espécie *Pimpinella anisum* L. é uma planta herbácea, que pode medir de 30 a 50 centímetros de altura, possui haste ereta e cilíndrica, os frutos (sementes) arredondados com coloração amarelo-esverdeado e flores brancas (BESHARATI-SEIDAN et al., 2005). O cultivo da erva-doce no Brasil é raro, porém pode ser encontrada na região sul do Mediterrâneo, na Ásia Ocidental, Oriente Médio, México, Egito e Espanha (SHOJAI e FARD, 2012).

A aplicação do fruto da erva-doce em infusões e chás, na indústria farmacêutica e de alimentos, se dá em virtude das suas características fitoterápicas, tais como ação diurética, ação digestiva e ação expectorante (RODRIGUES et al., 2003). Na indústria de cosméticos, é utilizada por suas propriedades aromatizantes e antioxidantes (ÖZEL, 2008).

Das sementes e folhas da planta é obtido o óleo essencial, o qual possui como componente majoritário o anetol (ROBBERS, 1997). O potencial antimicrobiano do óleo essencial já foi avaliado por Dadalioglu e Evrendilek (2004), que observaram ação frente a *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus*, e por Al-Bayati (2008) frente a *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Assim como, análises frente ao seu potencial antifúngico e antioxidante (KOZALEC et al., 2005; SENATORE et al., 2013; DIAO et al., 2013; BADGUJAR et al., 2014).

4.2 Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.)

O craveiro da índia é uma planta de porte arbóreo, que pode atingir, em média, de 8 a 10 metros de altura, possui folhas com características ovais, aromáticas e flores de coloração vermelha, as quais apresentam-se em numerosos grupos de cachos terminais. Pertencente à família *Myrtaceae* (AFFONSO et al., 2012; LORENZI e MATOS, 2008), a planta é nativa das Ilhas Molucas no Arquipélago da Insulíndia na Indonésia e, no Brasil, o seu cultivo ocorre, principalmente, no sul da Bahia (SILVESTRI et al., 2010).

A espécie vegetal *Syzygium aromaticum* L., conhecida, popularmente, como cravo-da-índia, é colhida na forma de botão floral maduro e comercializada na forma de botão floral seco, os quais são colhidos quando atingem 1,5 a 2 centímetros de comprimento (ALMA et al., 2007). O cravo-da-índia ainda possui diversos sinônimos taxonômicos, como *Caryophyllus aromaticum* L., *Eugenia aromatica* (L.) Baill., *Eugenia caryophyllata* Thunb., *Eugenia caryophyllus* C. Spreng, Bull. & Harr., *Jambosa caryophyllus* (Spreng.) Nied. e *Myrtus caryophyllus* Spreng (GHEDIRA et al., 2010).

Das sementes de aroma ativo, se extrai o ácido eugênico, o qual é amplamente utilizado em setores da indústria, entre eles, a farmacêutica e a alimentícia, desempenhando a função de aromatizante ou condimento alimentar (SILVESTRI et al., 2010; ORWA et al., 2009; AFFONSO et al., 2014). Quimicamente, o óleo essencial extraído do cravo-da-índia é composto por eugenol, acetato de eugenol, β -cariofileno, trans-cariofileno e α -humuleno (CHAIEB et al., 2007).

Estudos evidenciam as variadas propriedades oriundas dos constituintes presentes no óleo essencial de cravo-da-índia, tais como ação antioxidante, ação antifúngica, ação antiviral e ação antimicrobiana frente aos principais microorganismos patogênicos (SILVESTRI et al., 2010; KAMATOU et al., 2012; BERALDO et al., 2013; ASCENÇÃO e FILHO, 2013; TRAGOOLPUA e JATISATIENR, 2007).

4.3 Orégano (*Origanum vulgare* L.)

Origanum vulgare L. é conhecido, popularmente, como orégano, uma planta herbácea, perene, aromática e pertencente à família *Laminaceae* (LORENZI e MATOS, 2008). O seu caule é ereto e pode atingir até 90 centímetros de altura, as suas flores são dispostas em espigas curtas e podem apresentar coloração branca, cor-de-rosa púrpura ou violeta, e suas folhas ovadas medem de 1 a 2 centímetros (PIRES e DELGADO, 2013). A maioria das espécies de orégano é originária da região do Mediterrâneo (Grécia, Irã e Turquia), mas podem ser encontradas no Sul e Sudeste do Brasil (BAYDAR et al., 2004; PÉREZ G et al., 2011).

O gênero *Origanum* possui em torno de 38 espécies, as quais são caracterizadas pela grande diversidade química e morfológica. Entre as espécies mais conhecidas e utilizadas estão o *Origanum vulgare* L. (orégano chileno), *Origanum hirtum* (orégano grego), *Origanum onites* L. (orégano turco), *Coridothymus capitatus* L. (orégano espanhol) e *Lippia graveolens* Kunt (orégano mexicano), as quais diferenciam-se entre si na coloração das flores, no tipo de cálice, na corola e tamanho dos ramos e arbusto (ARCILA-LOZANO et al., 2004).

A obtenção dos compostos ativos da planta são, essencialmente, as flores na altura da floração e as folhas, todavia todos os ramos podem ser rompidos (PIRES e DELGADO, 2013). Segundo Grondona et al. (2014), a composição química do óleo essencial de orégano está dividida em fração volátil, que constitui de 90 a 95% do óleo e fração não volátil, referente de 5 a 10% do óleo.

No óleo essencial de orégano, há o predomínio de compostos fenólicos como timol e carvacrol, compostos sesquiterpênicos (β -bisaboleno e β -cariofileno), compostos terpênicos (p -cimeno, borneol, linalol, acetato de linalilo, α -pineno, β -pineno e α -terpineno), flavonóides, derivados do apigenol, luteolol, campferol, diosmetol e os ácidos polifenólicos e seus ésteres (ácidos cafeico, clorogênico e rosmarínico) (SANTIN et al., 2014; BARANAUSKIENĖ et al., 2013; PAPAGEORGIU et al., 2008; TSIMOGIANNIS et al., 2007).

Dentro da medicina popular, é conhecido por uma diversidade de propriedades biológicas e farmacológicas, incluindo propriedades antálgicas, antissépticas, anti-inflamatórias, anti-espasmódicas, antioxidantes e ação no

tratamento de distúrbios respiratórios (ELGAYYAR et al., 2001; SOKOVIĆ et al., 2002; PUERTAS-MEJÍA et al.; SINGLETARY, 2010). Na gastronomia, é possível utilizar as suas folhas secas em preparações culinárias (MARIUTTI e BRAGAGNOLO, 2007).

Além das folhas, usadas no tratamento popular, o óleo essencial de orégano tem demonstrando eficácia em pesquisas, principalmente, como agente antimicrobiano (FRIEDMAN, 2015; PAGNO et al., 2016; ARAÚJO e LONGO, 2016, TEIXEIRA et al., 2013).

4.4 Óleos essenciais de especiarias

Segundo a *International Standard Organization* (ISO 9235, 2013), os óleos essenciais são definidos como produtos obtidos a partir de uma matéria-prima de origem vegetal, mediante destilação por arraste com vapor d'água ou obtidos pelo processamento mecânico dos pericarpos de frutos cítricos. Aliás, na literatura, também estão descritos como óleos voláteis, etéreos ou essências, em razão de algumas características físico-químicas das plantas (SIMÕES et al., 2010).

De acordo com as suas propriedades físicas, os óleos essenciais são considerados líquidos viscosos, voláteis, lipofílicos, geralmente translúcidos e odoríferos (BURT, 2004). Quimicamente, a sua composição é influenciada pela espécie da planta, localização geográfica, época de colheita, condições climáticas e técnica de extração (DIMA e DIMA, 2015; FIGUEIREDO e MIGUEL, 2010; CELIKTAS et al., 2007; GOBBO-NETO e LOPES, 2007; OUSSALAH et al., 2007).

Devido a sua origem biosintética, os constituintes dos óleos essenciais apresentam baixo peso molecular e são classificados como terpenos ou aromáticos (BAKKALI et al., 2008). A classe dos compostos aromáticos derivam do fenilproprano, porém são menos frequentes e inferiores à classe dos terpenos (PAVELA, 2015).

Embora a composição química apresente grande variação entre as espécies, os óleos essenciais são, majoritariamente, compostos de substâncias pertencentes aos terpenóides, como monoterpenos (C₁₀) e sesquiterpenos (C₁₅), variando em consequência das funções orgânicas presentes nestas

cadeias, tais como alcoóis, ácidos, ésteres, cetonas, aldeídos, epóxidos, aminas e sulfatos (ALINKINA et al., 2013; CALO et al., 2015).

No processo de extração do óleo essencial podem ser utilizados diversos métodos, entre eles, hidrodestilação, maceração, extração por solvente, enfleuragem, gases supercíticos e micro-ondas (DIMA e DIMA, 2015; BAKKALI et al., 2008). Em escala laboratorial, o método comumente aplicado é a hidrodestilação acoplada ao aparelho Clevenger, na qual o material vegetal é imerso em água. A técnica consiste na evaporação da água juntamente com os componentes voláteis do material vegetal, os quais são arrastados até um resfriador onde serão condensados e recuperados, possibilitando posterior separação (SANTOS, 2004).

4.4.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Os antimicrobianos podem ser de origem natural ou sintética e, entre as suas funções, visam eliminar ou impedir o crescimento e a proliferação de micro-organismos (RAMOS et al., 2007). As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais têm sido extensivamente estudadas, devido ao aumento da resistência microbiana aos antimicrobianos já utilizados e a procura em escala industrial por novas estratégias capazes de substituir os conservantes químicos tradicionais, em virtude dos malefícios que causam à saúde humana (AUMEERUDDY-ELALFI et al., 2015; RAI et al., 2017).

Uma das principais aplicações dos óleos essenciais em alimentos ocorre como antimicrobianos naturais. A viabilidade da sua aplicação como antimicrobiano se atribui às características das plantas de estimularem mecanismos naturais de defesa, através de seu metabolismo secundário, em circunstâncias adversas, como mudanças climáticas, ataques de micro-organismos e animais superiores (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais são compostos que possuem um grande número de moléculas ativas distintas, que podem atuar em diferentes alvos celulares com modo de ação igualmente distintos, o que impossibilita a capacidade do micro-organismos de adquirir resistência (BURT, 2004). Uma das mais importantes características dos óleos essenciais é o seu caráter hidrofóbico, pois permitem

a atuação dos compostos no rompimento da membrana celular bacteriana, fazendo com que perca a sua funcionalidade (FORSYTHE, 2010).

Os estudos que abordam a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tentam esclarecer a maior sensibilidade dos mesmos frente as bactérias Gram-positivas quando comparadas às Gram-negativas. Apesar de não estar completamente esclarecido, este fato pode ser explicado pela diferença entre as paredes celulares desses dois grupos de bactérias.

As bactérias Gram-negativas possuem em sua membrana externa uma bicamada lipídica composta por lipopolissacarídeos (LPS) (Figura 1), o que possivelmente a torna mais resistente aos componentes apolares dos óleos essenciais, enquanto as bactérias Gram-positivas possuem uma camada espessa de peptidoglicano, além de moléculas de ácido lipoteicoico com extremidades lipofílicas, que permitiriam a infiltração de compostos hidrofóbicos (COX et al., 2000).

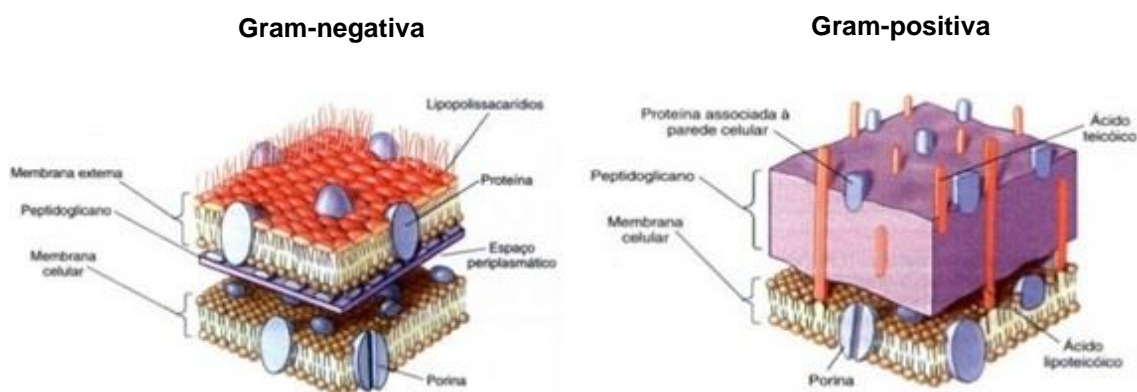


Figura 1. Apresentação das diferenças entre as paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

Em estudo sobre o efeito *in situ* da adição de óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) frente cepas de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* em almondêgas durante 14 dias, os autores constataram a ação dos óleos em diferentes concentrações (1% e 2%) frente ambos os patógenos. No entanto, essas concentrações modificaram o sabor do alimento, para as almondêgas cozidas, os óleos essenciais na concentração de 0,5% dos óleos essenciais provocaram redução significativa na contagem microbiana, revelando o potencial uso dos três óleos como conservantes de alimentos (PESAVENTO et al., 2015).

Os autores Abdollahzadeh et al. (2014) utilizaram como matriz alimentar a carne de peixe para avaliar a atividade antimicrobiana *in situ* do óleo essencial de tomilho (0,8% e 1,2%) frente a *L. monocytogenes* e verificaram significativa redução viável do patógeno após 6 dias. Os autores El Abed et al. (2014) também verificaram a redução na concentração de *L. monocytogenes* quando utilizado 1% de óleo essencial de tomilho (*Thymus capitata*), em carne bovina armazenada por 10 dias a 7°C.

Outro estudo *in situ* analisou a adição de óleo essencial de orégano (0,6%) em carne de cordeiro, a fim de avaliar a sua atividade antimicrobiana frente *Salmonella* Enteritidis durante 12 dias. No segundo dia de armazenamento, houve diminuição de 2,43 log Unidades Formadoras de Colônia/grama (UFC/g) e manteve-se inalterada, já as carnes adicionadas com 0,9% de óleo apresentou contagem inferior a 1 log UFC/g durante todo o armazenamento (GOVARIS et al., 2010).

O trabalho de Hayouni et al. (2008) ao adicionar óleo essencial de sálvia (*Salvia officinalis* L.) (1,5%) e aroeira-salsa (*Schinus molle* L.) (2%) em carne bovina armazenada a 4 - 7°C por 15 dias, demonstraram uma redução na concentração de *Salmonella*. Além disso, os autores Djenane et al. (2011) quando aplicaram óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (0,18% e 0,40%), murta-comum (*Myrtus communis*) (0,24% e 0,44%) e segulhera (*Satureja hortensis*) (0,10% e 0,20%), observaram inibição de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, em carne bovina armazenada a 5 °C por 7 dias.

A aplicação direta do óleo essencial em alimentos pode comprometer a sua aplicação como conservantes naturais, em virtude da alteração nas propriedades sensoriais dos alimentos (ASSIS et al., 2012; DANNENBERG et al., 2017; WEN et al., 2016). Os fatores intrínsecos e extrínsecos do alimento, tais como nutrientes disponíveis, atividade de água, pH, microbiota presente no alimento, presença de antimicrobianos naturais do produto, composição gasosa, temperatura de armazenamento e umidade relativa também podem influenciar (BURT, 2004).

4.4.2 Métodos de avaliação do potencial antimicrobiano

A determinação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é avaliada através dos métodos de análise categorizados em difusão e diluição, sendo efetuados em ágar ou caldo, respectivamente (BURT, 2004).

Normalmente, os estudos que analisam a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais realizam o ensaio de difusão em disco para determinar o espectro de ação do composto, a fim de identificar a sensibilidade prévia dos micro-organismos antes de estudos mais detalhados (SILVEIRA et al., 2009). Na técnica, o micro-organismo é testado em meio de cultura frente a uma substância biologicamente ativa, em que, após a difusão, relaciona-se o tamanho da zona (halo) de inibição sem o crescimento microbiano com a concentração da substância testada. Além disso, é utilizado um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona (halo) de inibição é medida partindo da circunferência do disco até a margem onde há o crescimento do micro-organismo, no entanto, servem apenas para comparação entre diferentes óleos essenciais, visto que diversos fatores podem afetar o tamanho do halo obtido (BURT, 2004). As técnicas de aplicação da substância podem ser por meio de discos de papel, cilindros de aço inoxidável, porcelana, vidro ou perfuração em ágar (SILVEIRA et al., 2009).

Em geral, após a análise de difusão em disco, os micro-organismos sensíveis aos óleos essenciais são submetidos ao teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). A CIM pode ser descrita como a menor concentração de agente antimicrobiano capaz de inibir o desenvolvimento do micro-organismo, em que o mesmo é submetido a diferentes concentrações do agente antimicrobiano e avalia-se em qual concentração a multiplicação celular foi inibida (BURT, 2004; DANNENBERG et al., 2016; GHABRAIE et al., 2016).

Logo, a CBM é definida como a menor quantidade de antimicrobiano capaz de eliminar o micro-organismo, a qual é realizada de maneira complementar e em sequência ao teste da CIM. Sendo assim, posterior a determinação da CIM, alíquotas de todas as diluições em que não houve multiplicação celular são plaqueadas em ágar, com a finalidade de verificar em quais diluições as células microbianas foram somente inibidas e em quais foram

realmente mortas. Desta maneira, a menor diluição onde não ocorre multiplicação celular é considerada a CBM (BAÇZEK et al., 2017; BASSANETTI et al., 2017; BURT, 2004; DANNENBERG et al., 2016).

Em alguns estudos, a análise em microatmosfera, também nomeada como fase de vapor, foi utilizada para verificar se uma substância possui efeito antimicrobiano sobre determinado micro-organismo (DANNENBERG et al., 2017; GHABRAIE et al., 2016; GOÑI et al., 2009; LÓPEZ et al., 2005). Diferentemente dos anteriores, este método não promove o contato direto do óleo essencial com o micro-organismo. A ação antimicrobiana ocorre pela ação dos compostos voláteis da amostra, que em fase de vapor entram em contato com a bactéria, sem a necessidade de propagar-se no meio de cultura. O resultado é expresso como percentual de redução do crescimento microbiano e comparado com as contagens das placas controles (DANNENBERG et al., 2017).

4.5 Micro-organismos de importância em alimentos

4.5.1 Coliformes Totais e Coliformes a 45°C (Termotolerantes)

O grupo dos Coliformes contém micro-organismos que, quando existentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de indicar condições sanitárias inadequadas durante a obtenção, processamento ou armazenamento (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Os Coliformes Totais pertencem à família *Enterobacteriaceae*, os quais são capazes de fermentar a lactose com produção de gás quando incubados a 35-37°C por 48 horas. São bacilos Gram-negativos e não formadores de esporos. Fazem parte desse grupo os gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, os quais podem estar presentes nos vegetais, no solo e nas fezes, exceto *Escherichia coli*, que possui como habitat primário o trato intestinal do homem e dos animais. Assim, a presença de Coliformes Totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal ou ocorrência de enteropatógenos (FRANCO e LANDGRAF, 2008; CAMPOS et al., 2006).

Os micro-organismos pertencentes ao grupo dos Coliformes a 45°C (Termotolerantes) correspondem aos Coliformes Totais que apresentam a habilidade de continuar fermentando lactose com produção de gás quando incubadas em temperaturas entre 44-45,5°C, incluindo enterobactérias do trato gastrointestinal e bactérias de origem não fecal (Silva et al., 2010). Sendo assim, a pesquisa de Coliformes Termotolerantes ou *E. coli* nos alimentos indica, com maior segurança, as condições higiênicas de um alimento e provável presença de enteropatógenos (JAY, 2005).

4.5.2 *Escherichia coli*

A bactéria *E. coli* se apresenta em forma de bacilos Gram-negativos, móveis, facultativamente anaeróbios, capazes de crescer em pH entre 4,4 e 9, e é reconhecida pela tolerância a ambientes ácidos, os quais lhe permite sobreviver no trato intestinal (JAY, 2005).

Diversas linhagens de *E. coli* envolvidas em doenças transmitidas por alimentos são patogênicas para os homens e animais, as quais são agrupadas em seis patotipos de acordo com os fatores de virulência, as manifestações clínicas e a epidemiologia das enfermidades. São elas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC). No grupo das EHEC, *E. coli* O157:H7 é o sorovar mais importante (FARROKH et al., 2013; RIBEIRO et al., 2006).

As cepas de EPEC não são invasivas e nem produzem toxinas, mas estão associadas a casos de diarreia aquosa infantil (MADIGAN et al., 2010). Entretanto, EHEC, mais precisamente, a linhagem O157:H7, é capaz de produzir uma toxina denominada verotoxina, similar a toxina produzida pela *Shigella dysenteriae*. Após a ingestão do alimento contaminado com a bactéria, a mesma aloja-se no intestino delgado onde a verotoxina é originada, podendo causar três manifestações diferentes: Colite Hemorrágica, Síndrome Hemolítica Urêmica e Púrpura Trombocitopênica Trombótica (MADIGAN et al., 2010; RIVAS et al., 2008). A bactéria ETEC causa a doença pela colonização da superfície do intestino delgado e formação de toxinas no local, o que resulta em diarreia sem sangue ou muco. Este acometimento repentino é comum, principalmente, em

peças que estão viajando, visto que os habitantes locais tendem a estar imunes à bactéria (MADIGAN et al., 2010). A EAEC ocasiona diarreia aguda que persistente por mais de 14 dias e ocorre, regularmente, em crianças (REGUAMANGIA et al., 2009). Geralmente, a bactéria EIEC não produz enterotoxina, porém causa doença invasiva no cólon e é responsável por diarreia aquosa e por vezes sanguinolenta, sendo o seu mecanismo de patogenicidade similar ao da bactéria *Shigella*. A bactéria DAEC possui a característica de se aderir de forma difusa em cultura de células epiteliais *in vitro*, podendo causar infecções no trato urinário e a patogenicidade entérica ainda não é confirmada (BARBOSA et al., 2014).

Estudos reportam o efeito de diferentes óleos essenciais na inibição do crescimento de *E. coli*, como os óleos essenciais de capim-limão, manjeriço, louro, orégano e canela (SILVEIRA et al., 2012). Assim como, os óleos essenciais das folhas de canela e tomilho branco que apresentaram o mesmo efeito frente à bactéria ETEC (SOUZA et al., 2016).

4.5.3 *Staphylococcus aureus*

Atualmente, as bactérias do gênero *Staphylococcus* possuem 53 espécies e 28 subespécies (EUZÉBY, 2018), pertencem à família *Micrococcaceae*, assim como os gêneros *Stomatococcus*, *Micrococcus* e *Planococcus* (SANTOS et al., 2007). Dentre as espécies, a bactéria *Staphylococcus aureus* se destaca por estar, frequentemente, envolvida em variadas infecções e casos de intoxicação alimentar nos seres humanos (SANTANA et al., 2010).

Staphylococcus spp. são bactérias do grupo de bacilos Gram-positivos que apresentam formato de cocos, possuem diâmetro entre 0,5-1,5 µm, são imóveis, não esporuladas e catalase positivas. Dispõem de variadas formas, pois podem estar sozinhas, em pares, em cadeias curtas ou agrupamentos semelhantes a cachos de uva (SANTOS et al., 2007).

Naturalmente, estão presentes na pele e no trato respiratório superior de animais de sangue quente, incluindo o homem, consistindo em um microorganismo oportunista (MADIGAN et al., 2010). *S. aureus* é um importante patógeno em casos de intoxicação alimentar por conta da capacidade de algumas cepas produzirem toxinas, entre elas, destacam-se as enterotoxinas, a

esfoliatina, toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), hemolisinas e leucocidinas (TRABULSI et al., 2004).

A intoxicação alimentar estafilocócica ocorre após o consumo de alimentos que contenham quantidades suficientes de uma, ou mais, enterotoxina pré-formada durante o crescimento do micro-organismo (HENNEKINNE et al., 2010). Os sintomas aparecem em média 4 horas após a ingestão de alimentos contaminados, causando náuseas, vômitos, diarreia, cólica abdominal, sudorese e dor de cabeça (JAY, 2005). Outras doenças estão relacionadas pela invasão de tecidos ou pelas toxinas, como bicho-de-pé, foliculite (infecção do folículo piloso), furúnculos situados na região cervical posterior, antraz, hidradenite (inflamação das glândulas sudoríparas), impetigo e hordéolo (terçol) (SANTOS et al., 2007).

Embora sejam bactérias mesófilas, podem crescer em temperaturas de 7°C a 47,8°C e as enterotoxinas são produzidas entre 10°C e 46°C. Em relação a concentrações de NaCl (Cloreto de Sódio), são tolerantes de 10% a 20% e ao pH entre 4 e 9,8, com um ótimo entre 6 e 7 (FRANCO e LANDGRAF, 2008). A bactéria *S. aureus* apresenta facilidade de se desenvolver em vários alimentos, em virtude da habilidade de crescer em diferentes condições ambientais e da flexibilidade nutricional (SIMEÃO DO CARMO et al., 2002; LOIR et al., 2003).

Segundo a literatura, para inibir a presença desta bactéria é possível a aplicação do óleo essencial de plantas, como o das folhas de cravo-da-índia e canela, os quais apresentaram atividade antibacteriana frente *S. aureus* (HUSSEIN et al., 2014). Assim como, o estudo de Santos et al. (2011), que analisaram os óleos essenciais de cravo-da-índia, orégano e alho, e obtiveram resultados inibitórios satisfatórios frente ao micro-organismo.

4.6 Coberturas comestíveis

Na atualidade, a indústria alimentícia vem enfrentando grandes desafios na busca por novas estratégias com o propósito de aumentar o tempo de prateleira dos alimentos, redução do crescimento microbiano e as alterações sensoriais ocorridas nos alimentos (ARHAM et al., 2016). Dessa forma, a quantidade de pesquisas envolvendo a produção e caracterização de revestimentos aumentou substancialmente (BALLESTER-COSTA et al., 2016).

Filmes ou coberturas podem ser definidos como embalagens primárias feitas a partir de componentes comestíveis, em que uma fina camada de material comestível reveste diretamente o alimento ou forma um filme e o envolve sem alterar os ingredientes originais ou o método de processamento (GALUS e KADZIŃSKA, 2015). Os filmes elaborados a partir de proteínas ou polissacarídeos apresentam boas propriedades mecânicas, ópticas e sensoriais, e caracterizam-se por serem uma boa barreira ao oxigênio e ao dióxido de carbono (CHOI et al., 2016).

Estes revestimentos comestíveis podem ser produzidos a partir de diversas matérias-primas naturais, como os carboidratos (açúcar, amido, celulosa, dextrina, xarope de milho), proteínas (albumina, caseína, gelatina, glúten), gomas (goma arábica, alginato de sódio, carragena), quitosana (obtida da casca de crustáceos), lipídeos (ácido esteárico, cera, óleos e gorduras hidrogenadas, parafina, triestearina), entre outros (SUAVE et al., 2006).

Em relação a nomenclatura, os termos diferem entre si, pois as coberturas são obtidas quando a solução filmogênica é aplicada diretamente na superfície do alimento, enquanto os filmes são películas finas obtidas pelo método de secagem (*casting*) da solução sobre um suporte e aplicados, posteriormente, no alimento (PETERSSON e STADING, 2005).

Os métodos mais utilizados para a aplicação das coberturas nos alimentos são por imersão (Figura 2A), o qual se baseia em mergulhá-los em um recipiente contendo a solução filmogênica, seguida de repouso até que ocorra a evaporação da água e a película se forme na superfície, ou por pulverização (Figura 2B) da solução filmogênica sobre o alimento (LUVIELMO, 2013; ASSIS, 2014). Em seguida à aplicação, o alimento é mantido em repouso a temperatura ambiente ou refrigerado para ocorrer a evaporação do solvente e a formação da película sobre a superfície do produto (DAS et al., 2013).

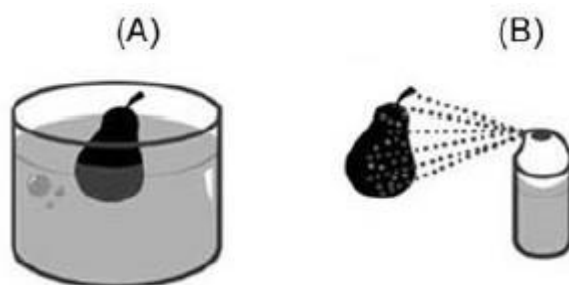


Figura 2. Aplicação de coberturas comestíveis pelo método de (A) imersão e (B) pulverização
Fonte: PAGNO, 2016

4.6.1 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo composto por unidades de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopirranose e de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose obtida pela desacetilação parcial da quitina (Figura 3) (DEMITRI et al., 2016). No processo de desacetilação da quitina, ocorre a substituição de grupos acetilas (COCH_3) por grupos aminos livres ($-\text{NH}_2$), os quais podem ser protonados em meio ácido ($-\text{NH}_3^+$), o que faz com que a quitosana seja solúvel em ácidos orgânicos, como ácido láctico, fórmico ou ácido acético com pH inferior a 6 (DANG e YOKSAN, 2015). O percentual destas unidades ao longo da cadeia quitina/quitosana é denominado grau de acetilação (ALMEIDA, 2009).



Figura 3. Desacetilação da quitina em quitosana

Fonte: Athayde, 2015

A produção da quitosana é proveniente, principalmente, de resíduos de organismos vivos, como as conchas de crustáceos (caranguejo, camarão, lagosta), sendo também encontrada nos fungos, na parede celular de microalgas, nos insetos e no endoesqueleto de moluscos (FAI et al., 2008; HAMED et al., 2016; HOSEINI et al., 2016; YOUNES et al., 2016).

A quitosana é empregada na elaboração de coberturas como um produto natural, que possui grande importância econômica e ambiental, pois é biodegradável, de baixo custo, com perfil atóxico e capacidade de formar filmes com propriedades antimicrobianas (GÓMEZ-ESTACA et al., 2009). Além da aplicabilidade em outras áreas: biofarmacêutica (antitumoral, anticoagulante), componente de cosméticos (esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar), tratamento de efluentes industriais (redução de odores, polímero ecológico), entre outros (FERREIRA et al., 2016; FAI et al., 2008).

Na literatura, inúmeras são as informações da capacidade das coberturas a base de quitosana relacionadas com a sua aplicação em produtos cárneos incorporadas com diferentes óleos essenciais, a fim de inibir o crescimento de micro-organismos, retardar oxidação na superfície, melhorar a qualidade sensorial e prolongar a vida de prateleira do produtos (BAZARGANI-GILANI et al., 2016; ASIK e CANDOGAN, 2014; PETROU et al., 2012; GIATRAKOU et al., 2010; OJAGH et al., 2010).

Os dados bibliográficos demonstraram que as coberturas comestíveis a base de quitosana adicionadas de óleo essencial cravo-da-índia promoveram redução no crescimento microbiano de 3,09 e 3,22 log UFC/g de *S. aureus* e *E. coli* em carne suína armazenadas por 7 dias (He et al., 2014). No estudo de Gómez- Estaca et al. (2009), coberturas formadas por gelatina e quitosana incorporadas com óleo essencial de cravo-da-índia (0,75 mL/g) apresentaram efeito antimicrobiano frente *Lactobacillus acidophilus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Listeria innocua* em filés de bacalhau (*Gadus morhua*) por 11 dias.

A quitosana possui a capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos, porém o seu mecanismo de ação não está completamente elucidado (CHAMORRO et al., 2011). Segundo Gomes (2007), a atividade antimicrobiana da quitosana é induzida pelo grau de desacetilação, massa molecular, pH e temperatura, as quais modificam a estrutura química e interferem na ligação às membranas celulares.

Dentre os mecanismos propostos, os autores Goy et al. (2009) explicam a atividade antimicrobiana da quitosana por três modos: 1) Ocorre a interação superficial iônica entre a quitosana e o micro-organismo, resultando em vazamento de eletrólitos e outros constituintes protéicos de baixa massa molecular pela parede celular; 2) A penetração da quitosana no núcleo dos

micro-organismos inibindo a síntese de RNA e proteínas e 3) Formação de uma barreira externa que acaba inibindo a absorção de nutrientes essenciais para o crescimento microbiano.

4.7 Análise sensorial de alimentos

A análise sensorial é uma ciência multidisciplinar que utiliza um grupo de pessoas para evocar, medir, analisar e interpretar as características sensoriais e a aceitabilidade dos produtos alimentícios e outros materiais, de forma que são percebidas pelos sentidos da visão, do olfato, do paladar, do tato e da audição (LAWLESS e HEYMANN, 1998; STONE e SIDEL, 1993; WATTS et al., 1992).

Dessa forma, os atributos que condicionam a aprovação ou a rejeição de um produto pelo consumidor podem ser analisados por avaliadores não-treinados ou treinados. A utilização de avaliadores não-treinados é mais simples, pois, apesar de ser constituído por um grande número de pessoas (40-50 pessoas), necessita-se desse grupo para uma única participação. Entretanto, ao utilizar avaliadores treinados é necessário que este grupo (7 a 12 pessoas) frequente assiduamente algumas semanas de treinamento, o que o torna mais complexo, pois dependerá da disponibilidade de tempo e do interesse de cada integrante da equipe sensorial em participar de um maior número de encontros (GILLETE, 1984).

Os métodos podem ser divididos em analíticos (discriminativos e descritivos) e afetivos. No método afetivo o julgador expressa seu estado emocional ou reação afetiva ao escolher um produto pelo outro. As escalas mais empregadas são: de intensidade, a hedônica, do ideal e de atitude ou de intenção. Os julgadores não precisam ser treinados, visto que os testes afetivos acessam diretamente a opinião do consumidor potencial de um produto, a respeito de características específicas do mesmo, ou ideias que o consumidor tenha do produto a ser avaliado (Nassu, 2007; IAL, 2008).

No teste de aceitação por escala hedônica, as escalas mais utilizadas são as de 7 e 9 pontos, que contêm os termos definidos situados, por exemplo, entre “gostei extremamente” e “desgostei extremamente” contendo um ponto intermediário com o termo “nem gostei; nem desgostei”. No teste, é importante

que as escalas possuam número balanceado de categorias para gosto e desgosto.

A aplicabilidade da análise sensorial na indústria de alimentos e nas instituições de pesquisa são variadas, como no controle do desenvolvimento de um novo produto, na avaliação do efeito das alterações nas matérias-primas ou no processamento tecnológico sobre o produto final, na redução de custo, na seleção de nova fonte de suprimento, no controle de qualidade entre outros (DUTCOSKY, 1996).

A qualidade sensorial não é uma característica própria do alimento, mas sim o resultado da relação entre esse alimento e o homem, sendo uma resposta individual, que varia de pessoa para pessoa, em função das experiências, de expectativas, do grupo étnico e de preferências individuais (GULARTE, 2009).

5 Projeto de Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Projeto de Dissertação

**Desenvolvimento de coberturas bioativas para produtos cárneos
utilizando óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano**

Pâmela Inchauspe Corrêa Alves

Pelotas, 2017

PÂMELA INCHAUSPE CORRÊA ALVES

**Desenvolvimento de coberturas bioativas para produtos cárneos
utilizando óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano**

Projeto de qualificação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador – Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Coorientadores – Prof^a. Dr^a. Caroline Peixoto Bastos

– Prof. Dr. Cláudio Dias Timm

Pelotas, 2017

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Carla Rosane Barboza Mendonça (Membro Efetivo)

Prof^a. Dr^a. Nadia Carbonera (Membro Suplente)

Resumo

ALVES, Pâmela Inchauspe Corrêa. **Desenvolvimento de coberturas bioativas para produtos cárneos utilizando óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano.** 2017.

A conservação dos alimentos continua sendo um assunto de importância quando relacionada ao uso de aditivos químicos sintéticos na sua preservação, em virtude dos riscos causados por seu consumo excessivo à saúde humana. Sendo assim, tem-se buscado alternativas para a substituição total ou parcial destes conservantes, como, por exemplo, o uso de óleos essenciais, devido a crescente busca dos consumidores por produtos naturais. Os óleos essenciais são oriundos da via secundária das plantas aromáticas e apresentam potencial antimicrobiano frente a diversos micro-organismos patogênicos. Além desta característica, os óleos essenciais podem ser utilizados como componentes ativos na elaboração de coberturas comestíveis para aplicação em alimentos visando sua conservação. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver coberturas bioativas comestíveis a base de quitosana adicionadas de óleo essenciais de erva-doce (*Pimpinella anisum*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.), individualmente ou em combinação, e aplicá-las em um produto cárneo, a fim de testar o seu potencial antimicrobiano frente as bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, além de testar a aceitabilidade do consumidor, através de análise sensorial. Os óleos serão extraídos pelo processo de hidrodestilação em Clevenger. A identificação dos compostos será realizada através de análise cromatográfica (CG/MS) e a avaliação da atividade antimicrobiana será determinada pelo método de disco-difusão, em microatmosfera, concentração inibitória mínima, e concentração bactericida mínima. Os testes microbiológicos *in situ* serão realizados após 0, 3^o e 7^o dia da elaboração dos produtos cárneos. Espera-se, através dos resultados adquiridos, viabilizar uma alternativa na substituição dos aditivos químicos sintéticos nos alimentos, por meio da aplicação de conservantes naturais.

Palavras-chave: antimicrobiano; quitosana; aditivos naturais; análise sensorial

Lista de Tabelas

Tabela 1	Cronograma de atividades	30
Tabela 2	Orçamento do projeto	31

Lista de Abreviaturas e Siglas

°C	Graus Celsius
µl	Microlitros
µm	Micrometros
BHA	Brain Heart Infusion agar
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Manual Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centímetros
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMB	Eosina azul de metileno
g	Gramas
h	Horas
m	Metros
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
rpm	Rotação por minuto
TSB	Caldo triptona de soja
Tween 60	Monoestearato de polioxietilenosorbitano
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

Sumário

1 Introdução	08
2 Revisão bibliográfica	11
3 Objetivos	18
3.1 Objetivo geral	18
3.2 Objetivos específicos	18
4 Hipóteses	19
5 Material e métodos	20
5.1 Aquisição da amostra	20
5.2 Extração do óleo	20
5.3 Elaboração da cobertura	21
5.4 Caracterização dos óleos essenciais	20
5.4.1 Rendimento da extração	20
5.4.2 Perfil cromatográfico de terpenos	21
5.4.3 Determinação de compostos fenólicos totais	21
5.5 Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais	22
5.5.1 Reativação dos micro-organismos	22
5.5.2 Disco difusão	23
5.5.3 Atividade antimicrobiana em microatmosfera	23
5.5.4 Concentração Mínima Inibitória	24
5.5.5 Concentração Bactericida Mínima	24
5.6 Preparação, aplicação e avaliação de coberturas de quitosana adicionadas de óleo essencial	24
5.6.1 Preparação dos hambúrgueres	25
5.6.2 Contaminação intencional dos hambúrgueres com <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	25
5.7 Preparação da solução filmogênica para cobertura	26
5.7.1 Aplicação das soluções filmogênicas de quitosana adicionadas de óleo essencial na cobertura de hambúrgueres	26
5.7.2 Avaliação das soluções filmogênicas de quitosana adicionadas de óleo essencial na cobertura de hambúrgueres	27
5.8 Avaliação sensorial	28
5.9 Análise estatística	29

6 Resultados e impactos esperados.....	30
7 Cronograma de atividades	31
8 Orçamento	32
Referências bibliográficas	33
Anexos	40

1 Introdução

A eficácia de condimentos, plantas aromáticas e dos seus extratos tem sido explorada buscando aplicações relacionadas à segurança alimentar. Estas características são conferidas a estes condimentos e extratos, na maioria dos casos, devido a presença de óleos essenciais, e outros componentes do metabolismo secundário proveniente das plantas (CALO et al., 2015). Os óleos essenciais possuem diversas propriedades biológicas, tais como efeitos antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, antivirais e anti-inflamatórios (OLMEDO et al., 2014).

Os óleos essenciais ainda podem ser nomeados como óleos voláteis, óleos etéreos ou essências (BURT, 2004; SIMÕES et al., 2010). De acordo com as suas propriedades físicas, são definidos como líquidos viscosos, voláteis, lipofílicos, geralmente translúcidos e odoríferos (BURT, 2004). A sua composição química, no entanto, é influenciada por outros fatores, como a espécie da planta, a localização geográfica, a época de colheita e as condições climáticas (CELIK TAS et al., 2007; DIMA e DIMA, 2015; FIGUEIREDO, 2010; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; OUSSALAH et al., 2007).

Dessa forma, a diversidade de atividades atribuídas aos óleos essenciais os tornam alternativas naturais com potencial para substituir os aditivos químicos e minimizar os riscos à saúde causados pelos mesmos, em que pode-se citar os nitratos e nitritos, os quais são comumente utilizados na preservação dos alimentos (BAJPAI et al., 2012; EBRAHIMABADI et al., 2010; SINDELAR; MILKOWSKI, 2011; SOLÓRZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2012;). Os benefícios da sua aplicação envolvem desde a toxicidade apresentada pelos aditivos sintéticos até a crescente busca dos consumidores por aditivos naturais (EBRAHIMABADI et al., 2010; OKE et al., 2009; PAPAS, 1993; VIUDA-MARTOS et al., 2010).

Os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos e podem causar doenças por ação de micro-organismos patogênicos ou de suas toxinas (STAMFORD et al., 2006). Neste contexto, a conservação de alimentos, como, por exemplo, de produtos cárneos, envolve a aplicação de diversas medidas para prevenir e/ou minimizar alterações físicas, químicas ou

microbiológicas, as quais os tornam impróprios para o consumo e reduzem os aspectos da sua qualidade (BURDETTE et al., 1995).

Deste modo, inúmeras matrizes estão sendo utilizadas como veículo para a incorporação de agentes antimicrobianos naturais no controle de micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos. Dentre elas, a quitosana, um polissacarídeo derivado da quitina, a qual é um componente sintetizado por uma diversidade de organismos vivos, como as conchas de crustáceos, paredes celulares de fungos e leveduras, e exoesqueleto de artrópodes e insetos (KURITA, 2006). Os filmes a base de quitosana apresentam propriedades de barreira ao oxigênio, dióxido de carbono e permeabilidade ao vapor de água, em razão da sua natureza hidrofílica (PELLISSARI, 2009; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2010;).

Estudos com filmes de quitosana e gelatina, adicionados com diferentes óleos essenciais, exibiram atividades inibitórias no crescimento de bactérias Gram negativas e Gram positivas, quando aplicados em pescados embalados a vácuo sob refrigeração (GÓMEZ-ESTACA et al., 2010; SHAKILA et al., 2015). Resultados semelhantes foram obtidos a partir de filés de carne de frango crus, salsichas de porco cozidas e trutas arco-íris também revestidos com filmes de quitosana enriquecidos com óleos essenciais (CHAMANARA et al., 2012; KHANJARI et al., 2013; LEKJING, 2016).

Outros estudos apresentam confirmada ação antimicrobiana e antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais de orégano, cravo-da-índia e erva-doce frente a algumas das principais bactérias de importância em alimentos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (HOSSEINI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2009; RAMADAN et al., 2013; SCOPEL et al., 2014). Estas atividades dos óleos essenciais estão relacionadas com a presença de componentes químicos capazes de inibir ou eliminar a presença de micro-organismos (LANG e BUCHBAUER, 2012).

Porém raros são os estudos onde os óleos essenciais são aplicados diretamente em alimentos, principalmente pela limitação sensorial de sua aplicação, as quais modificam significativamente o sabor e o aroma do produto. Desse modo, uma opção para a utilização direta seria a inclusão de óleos essenciais em filmes comestíveis ou coberturas bioativas, que permitissem a

ação do óleo sem alterar significativamente as características sensoriais do produto (DANNENBERG et al., 2017).

Com o propósito de testar a potencialidade de coberturas bioativas a base de quitosana incorporadas com óleos essenciais de orégano, cravo-da-índia e erva-doce, idealizou-se aplicá-las em hambúrgueres como uma alternativa para o desenvolvimento de conservantes naturais com potencial antimicrobiano.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Óleos essenciais

Segundo a International Standard Organization (ISO 9235, 2013), os óleos essenciais são definidos como produtos obtidos a partir de uma matéria prima de origem vegetal, mediante destilação por arraste com vapor d'água ou obtidos pelo processamento mecânico dos pericarpos de frutos cítricos (SIMÕES et al., 2010). De forma geral, são considerados misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Ainda, podem receber outras denominações como óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, em consequência de algumas características físico-químicas (MATTOS et al., 2007; SIMÕES e SPITZER, 2007).

Os óleos essenciais são constituídos por uma mistura de componentes químicos, principalmente, pertencentes às classes do grupo terpenos, como os hidrocarbonetos mono e sesquiterpeno, aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, óxidos e derivados de fenol (ALINKINA et al., 2013). Os constituintes dos óleos essenciais são agrupados em duas classes quimicamente distintas, de acordo com a biossíntese que lhes deu origem: terpenoides, sintetizados através da rota ácido mevalônico-acetato e fenilpropanoides, os quais são formados através da rota ácido chiquímico (ROBBERS et al., 1997). Do ácido mevalônico é formado o isopreno, o qual representa a unidade básica dos terpenos e consiste em uma molécula com 5 átomos de carbono (C5). Em consequência de ligações da conformação cauda-cabeça, unidades de isopreno unem-se formando as diferentes estruturas de terpenos, em que as principais presentes nos óleos essenciais são os monoterpenos, formados pela ligação de duas moléculas de isopreno (C10) e os sesquiterpenos, formados pela ligação de três moléculas de isopreno (C15) (BAKKALI et al., 2008).

O conteúdo do óleo essencial em determinadas espécies de plantas pode variar, consideravelmente, de acordo com a espécie da planta, a etapa do ciclo vegetativo, os fatores ambientais, como a altitude, a temperatura, a umidade relativa, o tempo de exposição solar, o grau de hidratação do solo e a presença de micronutrientes (MATTOS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; OUSSALAH et al., 2007).

Os métodos de extração dos óleos essenciais podem ocorrer de variados modos, pois alteram conforme a localização do óleo na planta e com a proposta da sua utilização (SIMÕES et al., 2007). Dentre eles, estão incluídos a destilação a vapor d'água, hidrodestilação, destilação assistida por micro-ondas, hidrofusão por micro-ondas e gravidade, extração com solvente orgânico, extração com solvente e alta pressão, fluido supercítico com CO₂, extração ultra-sônica e extração por micro-ondas sem solventes (OKOH et al., 2010). Entretanto, a hidrodestilação é o método mais comumente empregado (BAKKALI et al., 2008). Segundo os autores Cassel et al. (2009), dependendo do método de extração utilizado, a composição química do óleo essencial pode variar significativamente.

2.1.1 Atividade antibacteriana de óleos essenciais

Os óleos essenciais e os seus componentes são considerados os agentes antimicrobianos naturais mais importantes presentes na maioria das plantas (COWAN, 1999). Estes compostos são substâncias que podem eliminar ou inibir o crescimento de micro-organismos (RAMOS et al., 2007).

Os autores Santos et al. (2011), testaram os óleos essenciais de cravo, limão, orégano e alho sobre as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isolados do vôngole (*Anomalocardia brasiliiana*) e cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection): *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*, através da técnica de difusão de disco e em seguida a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os óleos essenciais de cravo e orégano apresentaram atividade antibacteriana frente todas as bactérias testadas, no entanto e o óleo de orégano apresentou maiores halos de inibição bacteriana (26,7 mm e 29,3 mm) para as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente.

Em outro estudo, Pereira et al. (2007) avaliaram o efeito inibitório dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Origanum vulgare* (orégano) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) *in vitro*. Nos resultados dos testes *in vitro*, os óleos essenciais de *C. citratus*, *O. vulgare* e *S. aromaticum* promoveram efeito inibitório sobre as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, porém o *S. aromaticum* apresentou melhor formação de halo de inibição nas menores concentrações. Também foram avaliados os óleos essenciais extraídos

de *Salvia officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Majorana hortensis* Moench, *Thymus vulgaris* L., *Carum carvi* L., *Pimpinella anisum* L. e *Coriandrum sativum* L. para o controle do crescimento e sobrevivência em cepas de *Listeria monocytogenes*, que mesmo em pequenas concentrações, apresentaram inibição para as bactérias patogênicas selecionadas, tornando-os alternativas na substituição aos aditivos convencionais nos alimentos (KLAUS et al., 2009).

O eugenol, principal constituinte químico presente no cravo-da-índia, apresenta efeitos antimicrobiano e antifúngico, com amplo espectro de ação contra espécies de bactérias, fungos e leveduras (GUIMARÃES et al., 2008). O mecanismo de ação do eugenol ocorre em nível de membrana plasmática, juntamente com a inativação de enzimas e/ou no material genético celular. É possível que parte do efeito antimicrobiano do eugenol esteja relacionado com a sua natureza fenólica (BOAVENTURA et al., 2006). Dentro deste contexto, entre os terpenos que destacam-se no orégano estão o timol e carvacrol, sendo estes os principais responsáveis por suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (SEYDIM e SARIKUS, 2006).

2.1.2 Micro-organismos patogênicos em alimentos

Dentre os principais micro-organismos patogênicos envolvidos nos processos de contaminação dos alimentos estão as bactérias, as quais atuam sob diversos tipos de substratos, diferentes faixas de temperatura, pH e condições do meio ambiente (SOUSA, 2003; JAY, 2005). Sendo assim, os óleos essenciais podem atuar na inibição do crescimento bacteriano em consequência ao dano que causam à integridade da membrana celular por seus constituintes lipofílicos, os quais são os responsáveis por afetar o equilíbrio de íons inorgânicos e a manutenção do pH celular (COWAN, 1999; SHYLAJA e PETER, 2004).

De acordo com Ibarra (1983), cerca de 99,9 % das alterações da carne são por ação dos micro-organismos e, geralmente, precedem as outras formas de deterioração. Neste contexto, a conservação da carne envolve a aplicação de medidas que possam retardar ou prevenir alterações microbiológicas, químicas e/ou físicas (BURDETTE et al., 1995).

Entre os métodos de conservação disponíveis e o aumento no questionamento da segurança na utilização de aditivos químicos, a indústria alimentícia viabiliza a substituição de técnicas tradicionais de conservação disponíveis por novos métodos de preservação, principalmente, devido à demanda crescente dos consumidores por produtos nutritivos, naturais e saborosos (RAHMAN e KANG, 2009; VIUDA-MARTOS et al., 2010). Segundo Gutierrez et al. (2002), para a utilização de óleos essenciais oriundos de plantas no controle de micro-organismos patogênicos e deteriorantes é necessária uma avaliação do espectro de ação frente a esses micro-organismos associados ao alimento em questão, assim como os efeitos que a composição do alimento exercerá sobre esta atividade.

Na literatura, é possível encontrar estudos que indicam que a utilização de óleos essenciais é viável em produtos cárneos. Fernandes et al. (2017) avaliou a possível substituição do conservante químico eritorbato de sódio por um antioxidante natural (extrato de orégano) sobre a estabilidade físico-química e sensorial em hambúrgueres de cordeiro. Os hambúrgueres contendo extrato de orégano, na concentração determinada (13,32; 17,79 e 24,01 mL/kg) apresentaram maior estabilidade oxidativa, evidenciada por uma redução de 80% ($P < 0,001$) em substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, inibição efetiva da oxidação proteica ($P < 0,01$) e menor perda de cor durante o armazenamento sob refrigeração, além do extrato de orégano não ter prejudicado na aceitação sensorial dos consumidores.

Em outro estudo, a aplicação de fibra de laranja e óleo essencial de orégano em mortadela tipo Bologna resultou em uma redução nas contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos e bactérias lácticas no produto (VIUDA-MARTOS, 2010). A atividade antimicrobiana do óleo essencial de manjerona também foi reportada quando aplicada em linguiça frescal, constatando um efeito bacteriostático sobre *Escherichia coli*, além de uma redução na contagem total de micro-organismos (BUSATTA et al., 2008).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo-da-índia também tem sido reportada. Em uma avaliação do efeito da combinação dos extratos de orégano, arando vermelho e lactato de sódio sobre *L. monocytogenes* em carne moída cozida promoveu a inibição do referido micro-organismo (APOSTOLIDIS et al., 2008). Os autores Mytle et al. (2006) determinaram o nível de

sobrevivência de sete cepas de *L. monocytogenes* inoculadas em diferentes níveis em salsichas de frango tipo Frankfurter e o efeito inibitório do óleo essencial de cravo-da-índia sobre este micro-organismo. Segundo os autores, foi possível observar que a adição do menor nível de óleo essencial testado (1 %) reduziu a contagem do micro-organismo e não resultou em uma alteração significativa no aroma, sabor e aceitação geral do produto, em uma avaliação sensorial preliminar.

Outro trabalho analisou quinze óleos essenciais para testar o efeito antimicrobiano e antioxidante sobre a qualidade das salsichas de frango fresco, no entanto, nove óleos essenciais mostraram resultados satisfatórios pelo ensaio de disco difusão. Verificou-se que o controle teve um pH e TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*) significativamente maior do que os produtos tratados com os óleos essenciais e os produtos com óleo de cravo apresentaram menor índice de aumento de oxidação. Ainda, a atividade total de fenólicos e DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi significativamente maior nos produtos de tratamento, estes também apresentaram menor taxa de aumento na contagem microbiana. Por fim, os produtos de óleo de cassia apresentaram menor carga microbiana no final do período de armazenamento de 45 dias (SHARMA et al., 2017).

2.2 Aplicação em alimentos

Na atualidade, os revestimentos têm sido utilizados para diversas finalidades, incluindo a área de alimentos (KROCHTA, 2002). Filmes ou coberturas podem ser definidos como embalagens primárias feitas a partir de componentes comestíveis, em que uma fina camada de material comestível reveste diretamente o alimento ou forma um filme e o envolve sem alterar os ingredientes originais ou o método de processamento (GALUS e KADZIŃSKA, 2015).

Estes revestimentos comestíveis são produzidos a partir de matérias-primas naturais, como polissacarídeos, proteínas e seus derivados (WIHODO e MORARU, 2013). Entre os polissacarídeos empregados estão os alginatos, os carregenatos, a quitosana, o amido e as gomas. Filmes elaborados a partir de proteínas ou polissacarídeos apresentam boas propriedades mecânicas, ópticas

e sensoriais, e caracterizam-se por serem uma boa barreira ao dióxido de carbono e oxigênio (GALLO, 2000).

Dentre eles, a quitosana, que é um polissacarídeo composto por unidades de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopiranosose e de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose e é obtida pela desacetilação parcial da quitina (FAI et al., 2008). A quitina chama-se quitosana quando o grau de acetilação é menor que 50 % e esta torna-se solúvel em ácidos diluídos, como ácido acético, maleico e láctico (DUTTA et al., 2011; ZHONG et al., 2011). Ali et al. (2013), aplicaram coberturas de goma arábica em tomates (*Solanum lycopersicum L.*) armazenados por 20 dias (20 °C a 80-90 % UR). Os autores verificaram que os frutos revestidos exibiram diminuição da taxa respiratória e na produção de etileno, e mantiveram a capacidade antioxidante total, o teor de licopeno, dos compostos fenólicos e carotenoides totais durante o armazenamento, já os frutos não revestidos apresentaram diminuição destes parâmetros. Em outro estudo, para avaliar o efeito de coberturas de quitosana, Ali et al., (2011), aplicaram a mesma em mamões papaia (*Caricapapaya L.*) armazenados sobre refrigeração (12 ± 1 °C a 85–90 % UR) durante cinco semanas. Os autores observaram uma lenta diminuição da acidez titulável ao longo do armazenamento nos frutos revestidos, além de menores taxas de perda de peso e firmeza. Na análise sensorial, o painel sensorial aplicado (escala hedônica de cinco pontos) exibiu diferença significativa ($p < 0,05$) no sabor, na cor da casca e polpa, textura e sabor. Os frutos tratados com quitosana atingiram pontuação máxima pelos provadores em todos os parâmetros testados.

Em relação a adição de óleos essenciais no desenvolvimento de coberturas comestíveis com atividade antimicrobiana, os autores Emiroğlu et al. (2010) elaboraram filmes com proteína de soja incorporadas com óleos essenciais de orégano e tomilho aplicados sobre carnes frescas armazenadas sob refrigeração (4 °C). Os filmes incorporados com óleos essenciais apresentaram ação antimicrobiana frente a todos os micro-organismos avaliados, *Escherichia coli* O157:H7, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Lactobacillus plantarum*. Com o mesmo propósito, foram produzidos filmes comestíveis de goma da semente de manjeriço contendo óleo essencial de orégano (OEO; 1 e 6 %) para avaliar a atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B. cereus*, assim como a sua atividade

antioxidante. Todos os filmes contendo 2 e 6 % de OEO apresentaram atividade antibacteriana significativa contra os patógenos examinados, bem como as atividades antioxidantes (HASHEMI e KHANEGAH, 2017).

Os efeitos dos filmes de quitosana (Ch) e gelatina (Ge) foram analisados, contendo óleo essencial de *Ziziphora clinopodioides* (OEZ; 0 e 1 %), extrato de casca de romã (ECM; 0 e 1 %) e nanopartículas de celulose (NC; 0 e 1 %), separadamente e em combinação, sobre o prolongamento da vida útil de camarão fresco durante o armazenamento e refrigeração frente a *Listeria monocytogenes*. Todos os camarões envoltos nos filmes Ch e Ge apresentaram contagens bacterianas mais baixas em comparação com o controle ($P < 0,05$). A população bacteriana de camarões envoltos em filmes de Ch foi significativamente menor do que os envolvidos em filmes de Ge, devido à propriedade antibacteriana inerente de Ch ($p < 0,05$). O grupo Ch tratado com EOZ 1 % + ECM 1 % + NC 1 % apresentou a melhor eficácia antibacteriana e também os maiores índices sensoriais após 11 dias ($p < 0,05$). Segundo os autores as coberturas antibacterianas de Ch e Ge podem ser usadas como uma embalagem ativa para atrasar o crescimento de micro-organismos deteriorantes de alimentos, manter a qualidade e prolongar a sua vida útil (MOHEBI; SHAHBAZI, 2016).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e aplicar coberturas bioativas com propriedades antimicrobianas adicionadas de óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano em um produto cárneo.

3.2 Objetivos específicos

Extrair e determinar o rendimento de extração dos óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano;

Determinar a composição química dos óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano;

Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano frente a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*;

Desenvolver coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas dos óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano;

Aplicar coberturas bioativas a base de quitosana incorporadas de óleos essenciais em hambúrgueres de carne bovina e avaliar a atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*;

Verificar a aceitação sensorial dos hambúrgueres revestidos com coberturas comestíveis a base de quitosana adicionadas de óleo essencial.

4 Hipóteses

Os óleos essenciais *in natura* de orégano, erva-doce e cravo-da-índia apresentam efeito antimicrobiano *in vitro* frente às bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*.

Coberturas bioativas de quitosana, incorporadas com óleo essencial de orégano, erva-doce e cravo-da-índia, reduzem o desenvolvimento de bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* em hambúrgueres.

Hambúrgueres com cobertura de quitosana, adicionada de óleos essenciais orégano, erva doce e cravo-da-índia, apresentam aceitação para o consumo.

5 Material e Métodos

5.1 Aquisição da amostra

Os materiais vegetais utilizados para a extração de óleo essencial serão folhas de orégano (*Origanum vulgare* L.) e erva doce (*Pimpinella anisum* L.) adquiridos de distribuidor comercial (Luar Sul[®] - Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios Ltda., Santa Cruz do Sul, RS, Brasil) com especificação técnica dos produtos e número de lote. As amostras de botões florais secos de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) serão adquiridas no comércio local da cidade de Pelotas – RS e acondicionadas em sacos plásticos. Posteriormente, as folhas secas serão encaminhadas ao Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e armazenadas até a sua utilização.

5.2 Extração do óleo

As amostras de cravo-da-índia serão moídas em moinho de facas (Marconi). Após, o óleo essencial de orégano, erva-doce e cravo-da-índia serão extraídos de acordo com a Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010), através do processo de hidrodestilação com o auxílio do equipamento Clevenger pelo período de 4h. Após a extração, o óleo essencial de cada amostra será armazenado em frasco âmbar envolto por papel alumínio e acondicionado (-18°C).

5.3 Elaboração da cobertura

Para a elaboração das coberturas será utilizada quitosana, a qual será adquirida no comércio local da cidade de Pelotas – RS, Ácido Acético Glacial (Synth[®]), Glicerina (Synth[®]) e Tween 60.

5.4 Caracterização dos óleos essenciais

5.4.1 Rendimento da extração

Para o cálculo de rendimento de extração dos óleos essenciais serão acoplados em Clevenger um balão contendo, separadamente, 100 g de orégano, erva-doce e cravo-da-índia moído e 1000 mL de água destilada, a amostra será destilada por arraste de vapor por 4h. Após, o conteúdo de óleo será recolhido em tubo graduado e calculado através da razão entre o teor de óleo em mililitro por 100 g da amostra, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010).

5.4.2 Perfil cromatográfico de terpenos

O perfil cromatográfico dos terpenos será realizado em cromatógrafo gasoso acoplado ao detector de massas (GC/MS - QP 2010E - Shimadzu®), equipado com uma coluna capilar RTX-5MS (Restek®) (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (VALLILO et al., 2006). O detector seletivo de massas operará no modo de ionização por impacto de elétrons (IE) a uma potência de 70 eV de 1,2 mL min⁻¹, 1:50 fluxo dividido, volume de amostra injetada de 1 µL e será utilizado Hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor será fixada em 250°C e a temperatura de interface de 300°C. A temperatura inicial do forno será programada para 40°C com uma rampa de aquecimento entre 10 °C a 280 °C min⁻¹, mantendo essa temperatura estável durante 10 min. Posteriormente, a temperatura será aumentada a uma taxa de 10°C a 300°C min⁻¹, durante 41 minutos. Os compostos presentes nos óleos serão identificados com base na comparação dos índices de retenção e espectro de massa destes com os padrões presentes na biblioteca NIST EP/EPA/MIH (NIST 05) do aparelho.

5.4.3 Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais

A avaliação do efeito antimicrobiano dos óleos essenciais será realizada através de quatro metodologias fenotípicas: disco difusão, atividade antimicrobiana em microatmosfera, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Serão testados os efeitos

antimicrobianos do composto sobre as cepas padrão das espécies de bactérias *Escherichia coli* (ATCC 43895), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832).

5.5 Reativação dos micro-organismos

As bactérias utilizadas no experimento são mantidas sob congelamento em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção 3:1 (v/v). Para realizar a reativação, uma alçada dessas bactérias será transferida para caldo Soja Trypticaseína (TSB) ou BHI e incubadas em estufa durante 24h a 37°C. Após, uma alçada desse crescimento será estriada em placas de Petri (90 x 15 mm) com meios seletivos, sendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *E. coli*, ágar Oxford para *L. monocytogenes* e ágar Baird-Paker para *S. aureus*, e incubadas por 24h a 37°C, para o isolamento das colônias.

Do crescimento bacteriano nas placas de Petri (90 x 15 mm), será extraída uma alçada e ressuspendida em solução salina (NaCl 0,85%), a qual será padronizada na concentração 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Todos os ensaios serão realizados em triplicata.

5.5.2 Disco difusão

A análise de disco difusão será realizada de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2015a) com pequenas modificações. Culturas bacterianas serão suspensas em solução salina obtendo a concentração 10^8 UFC/g (0,5 McFarland), este inóculo será semeado com *swabs* estéreis na superfície de placas com ágar Mueller-Hinton, sobre o qual serão dispostos discos de papel filtro estéreis com diâmetro de 6 mm. Após, 10 µL do composto serão adicionados sobre os discos de papel e, posteriormente, as placas serão incubadas a 37°C. Após 24h, será verificada a existência de halos de inibição, quantificando os existentes com paquímetro.

5.5.3 Atividade antimicrobiana em microatmosfera

A atividade antimicrobiana em microatmosfera será avaliada pela técnica proposta por Ghabraie et al. (2016) com pequenas modificações. Alíquotas de 0,1 mL de suspensões celulares (10^3 UFC/mL) das bactérias, serão inoculadas na superfície de placas com Agar BHI (15 mL – camada de 6 mm). Na tampa de cada placa serão posicionados discos de papel estéreis nos quais serão adicionados diferentes volumes da substância antimicrobiana (100, 50, 25, 12,5 μ L), as placas serão imediatamente fechadas de modo invertido (tampa para baixo) e incubadas a 37°C por 24h. A ação antimicrobiana será expressa pelo percentual de redução na contagem celular (UFC) dos tratamentos com a substância antimicrobiana comparados com um controle contendo água estéril.

5.5.4 Concentração Mínima Inibitória

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) será realizada através do teste de microdiluição em placa, de acordo com protocolo proposto pelo *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (2015b) com pequenas modificações.

Serão utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, onde serão acrescentadas em cada poço 100 μ L de caldo BHI, 100 μ L de inóculo (80 μ L de caldo BHI e 20 μ L de água salina estéril com crescimento bacteriano) e o óleo essencial em cinco diferentes diluições: óleo essencial puro (100 μ L de óleo essencial puro); 1:5 (20 μ L de óleo essencial e 80 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO)); 1:10 (10 μ L de óleo essencial e 90 μ L de DMSO); 1:100 (1 μ L de óleo essencial e 99 μ L de DMSO) e 1:1000 (0,1 μ L de óleo essencial e 99,9 μ L de DMSO).

Após o preparo da amostra, as placas de microtitulação serão lidas em espectrofotômetro de placas (Biochrom EZ Read 400) entre 620 nm e 630 nm. Em seguida, serão incubadas a 37°C. Após 24h, será realizada nova leitura em espectrofotômetro de placas. A CMI será considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura.

5.5.5 Concentração Bactericida Mínima

Após a realização da CMI, serão retirados 15 µL dos poços das amostras que tiveram inibição e estriados em placas de Petri (90 x 15 mm) com ágar TSA ou BHA (*Brain Heart Infusion Agar*) e incubados por 24h a 37°C. Será considerada a mínima concentração bactericida aquela contida nas placas onde não houve crescimento bacteriano.

5.6 Preparação, aplicação e avaliação de coberturas de quitosana adicionadas de óleo essencial

Serão preparadas soluções filmogênicas de quitosana adicionadas de óleo essencial de orégano, cravo-da-índia e erva doce. Estas soluções serão aplicadas por imersão em hambúrgueres visando avaliar o efeito antimicrobiano frente as bactérias *E. coli* (ATCC 43895), *L. monocytogenes* (ATCC 7644) e *S. aureus* (ATCC 10832). Serão utilizados somente os óleos essenciais que apresentarem efeito antimicrobiano frente aos micro-organismos.

5.6.1 Preparação dos hambúrgueres

Os produtos cárneos serão preparados seguindo as recomendações de Terra (2005) com modificações. A formulação padrão utilizada para a formulação dos tratamentos será: 57% de carne bovina magra, 10% de gordura suína (toucinho), 15% de gelo, 15% de água gelada, 3% de proteína de soja.

Primeiramente será realizada a higienização de todos os materiais e utensílios, bancadas e mãos, utilizando água, detergente e álcool 70%. Após, com o auxílio de uma faca, a carne e o toucinho gelados serão cortados em pedaços e posteriormente moídos em moedor de carne (Britânia) com disco de 6 mm. Em seguida, serão homogeneizadas a carne, o toucinho, a proteína de soja previamente hidratada e moída, a água e o gelo.

Os produtos cárneos análogos a hambúrgueres serão porcionados e modelados em placas de Petri (90 x 15 mm) com envoltórios plásticos, e mantidos sob refrigeração.

5.6.2 Contaminação intencional dos hambúrgueres com *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*

Os hambúrgueres sem (controle positivo) e com adição dos óleos essenciais para avaliação da atividade antimicrobiana serão experimentalmente contaminados com os microrganismos que se mostrarem sensíveis aos óleos correspondentes. No final do preparo dos hambúrgueres, serão adicionados separadamente inóculos de 1 mL (padronizados na concentração 0,5 na escala de McFarland que equivale $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) de *S. aureus* (ATCC 10832), *E. coli* (ATCC 43895) e *L. monocytogenes* (ATCC 7644). Como controle também serão preparados hambúrgueres com e sem adição de óleo e não contaminados experimentalmente.

5.7 Preparação da solução filmogênica para cobertura

A solução de quitosana será preparada de acordo com a metodologia proposta por Moradi et al. (2011) com pequenas modificações. Será dissolvido 2 g de quitosana em 100 mL de solução de ácido acético glacial a 1%, agitando *overnight* em temperatura ambiente (concentração final de quitosana = 2% m/v). Após, serão adicionados à solução 0,5 ml de glicerol/ g quitosana (1 % v/v) e 0,1% m/v de Tween 60 e colocados sob agitação por 30 min.

Na preparação da solução filmogênica com o óleo essencial serão adicionados, em 100 mL da solução, 1,5 g (1,5% m/v) do óleo essencial de cravo, orégano e/ou erva doce, 0,5 ml de glicerol/ g quitosana (1% v/v) e 0,1% m/v de Tween 60. Posteriormente, a solução será agitada com Ultraturrax em uma velocidade de 27.000 rpm por 20 min em temperatura ambiente (concentração final do óleo essencial = 1,5% m/v)

5.7.1 Aplicação das soluções filmogênicas de quitosana adicionadas de óleos essencial na cobertura de hambúrgueres

As amostras de hambúrgueres serão imersas nas respectivas soluções filmogênicas por 1 min e, após, serão secas em ambiente estéril por 60 min,

embaladas em PEBD (Polietileno de Baixa Densidade) e armazenadas em temperatura de refrigeração (7°C) até a retirada das amostras.

As coberturas serão aplicadas na forma de cinco blocos com seis tratamentos cada, conforme descrito a seguir. Os blocos onde houver contaminação intencional serão repetidos para cada micro-organismo separadamente.

Bloco 1 - hambúrgueres preparados de forma convencional com adição de conservantes químicos e sem contaminação intencional bacteriana, com cobertura de quitosana (2% m/v), óleo essencial (1,5%); glicerol (1,0%) e tween - 0,1%.

Bloco 2 - hambúrgueres preparados de forma convencional com adição de conservantes químicos e com contaminação intencional bacteriana, com cobertura de quitosana (2% m/v), óleo essencial (1,5%); glicerol (1,0%) e tween - 0,1%.

Bloco 3 - hambúrgueres com redução de 50% da adição de conservantes químicos e sem contaminação intencional bacteriana, com cobertura de quitosana (2% m/v), óleo essencial (1,5%), glicerol (1,0%) e tween (0,1%).

Bloco 4 - hambúrgueres com redução de 50% da adição de conservantes químicos e com contaminação intencional bacteriana, com cobertura de quitosana (2% m/v), óleo essencial (1,5%), glicerol (1,0%) e tween (0,1%).

Bloco 5 - hambúrgueres preparados de forma convencional sem adição de conservantes químicos e com contaminação intencional bacteriana, com cobertura de quitosana (2% m/v), óleo essencial (1,5%); glicerol (1,0%) e tween (0,1%).

Bloco 6 – hambúrgueres preparados sem adição de conservantes químicos e sem contaminação intencional bacteriana.

Para cada bloco serão aplicados os seguintes tratamentos:

- a) Controle - Hambúrguer sem cobertura;
- b) Hambúrguer com cobertura de quitosana;
- c) Hambúrguer com cobertura de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia (1,5%);
- d) Hambúrguer com cobertura de quitosana e óleo essencial de orégano (1,5%);

- e) Hambúrguer com cobertura de quitosana e óleo essencial de erva-doce (1,5%);
- f) Hambúrguer com cobertura de quitosana e óleo essencial de erva-doce (0,5%), orégano (0,5%) e cravo-da-índia (0,5%).

5.7.2 Avaliação das soluções filmogênicas de quitosana adicionadas de óleo essencial na cobertura de hambúrgueres

Os produtos após elaborados de acordo com os tratamentos serão armazenados por 7 dias a 7°C. A partir de cada um dos produtos será retirada uma amostra de 25 g em três tempos, logo após a elaboração do produto, três dias após a elaboração do produtos e sete dias após a elaboração. Estas amostras serão submetidas a contagem bacteriana nos meios ágar PCA (todas as amostras), após incubação a 37°C por 24/48h; ágar Baird-Parker (amostras contaminadas com *S. aureus*) após incubação a 37°C por 48h; ágar EMB (amostras contaminadas com *E. coli*) após incubação a 37°C por 24/48h e ágar Oxford ou Palcam (amostras contaminadas com *L. monocytogenes*) após incubação a 30°C por 24/48h.

5.8 Avaliação sensorial

A análise sensorial terá como objetivo avaliar a aceitação do consumidor em relação às características gerais de hambúrgueres com cobertura de quitosana adicionada de óleos essenciais de orégano, erva-doce e cravo-da-índia.

Os hambúrgueres serão produzidos conforme descrito no item 5.5.1, os quais serão elaborados com e sem as coberturas de quitosana adicionadas de óleos essenciais de orégano, erva-doce e cravo-da-índia. Neste caso, todas as amostras estarão sem a contaminação intencional. Os hambúrgueres serão microbiologicamente analisados antes da avaliação sensorial conforme a RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Para a análise sensorial será utilizado o método afetivo de preferência, segundo norma da ABNT – NBR 13170 (1994) e de aceitação, segundo norma ABNT – NBR 14141 (1998). A equipe de avaliadores será composta de, no

mínimo, 60 pessoas, considerada uma amostra satisfatória segundo Meilgaard et al. (1999). A equipe sensorial será composta por avaliadores não treinados com faixa etária entre 18 e 75 anos de idade, os quais assinarão um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Será aplicada a ficha hedônica de nove pontos (Anexo A) e a ficha de intenção de compra (Anexo B). A análise será realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos – UFPel, equipada com área de apoio para preparo das amostras e cabines individuais para os avaliadores. As amostras serão porcionadas em tamanhos iguais, assadas, codificadas e distribuídas aos provadores.

A análise sensorial será realizada após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pelotas.

5.9 Análise estatística

Os resultados serão avaliados estatisticamente através de Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.). As contagens bacteriana terão seus valores logaritmizados antes da análise estatística.

6 Resultados e impactos esperados

Com este estudo espera-se que as coberturas com os óleos essenciais de orégano, erva-doce e cravo-da-índia apresentem efeito antimicrobiano, e que estes resultados sejam base para que os óleos essenciais possam atuar como conservantes naturais em alimentos como, por exemplo, em produtos cárneos, na adição e/ou substituição de conservantes químicos comumente utilizados.

8 Orçamento

O orçamento será realizado conforme exposto na tabela 2.

Tabela 2. Orçamento do projeto

Descrição	Quantidade	Valor Total (R\$)
Cloreto de Sódio (NaCl)	500 g	8,20
Ágar Triptona de Soja (TSA)	500 g	207,70
Extrato de Levedura (YE)	500 g	173,25
Infusão Cérebro e Coração (BHI)	500 g	218,65
Caldo Triptona de Soja (TSB)	500 g	182,75
Etanol P. A.	1 L	15,45
Papel toalha	1 Pacote	14,50
Caixa porta ponteira de 200 microlitros	5	21,00
Microtubo 1,5 mL pacote com 1000 unidades	2 Pacotes	62,00
Ponteira amarela 1-200 uL pacote com 1000 unidades	2 Pacotes	22,00
Ponteira azul 100-1000 uL pacote com 1000 unidades	2 Pacotes	48,00
Tubos de ensaio grandes de vidro com rosca e tampa (abertura larga na tampa)	50 Unidades	141,67
Placa de Petri Estéreis. Descartáveis. 90x15mm Pacote com 10 unidades	44 Pacotes	199,47
Copo Béquer - Graduado com bico – em vidro volume de 2000ml	2 Unidades	57,33
Microplaca com 96 poços com tampa	30 Unidades	126,50
Qitosana (50-190 kda)	50 g	636,00
TOTAL		2134,47

Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13170: Teste de ordenação em análise sensorial. Rio de Janeiro, 1994.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14141: Escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1998

ALI, A. et al. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 620–626, 2011.

ALI, A. et al. Effect of gum arabic as an edible coating on antioxidant capacity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 76, p. 119–124, 2013.

ALINKINA, E. S.; MISHARINA, T. A.; FATKULLINA, L. D. Antiradical properties of oregano, thyme, and savory essential oils. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 73-78, 2013.

APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y. I.; SHETTY, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. **International Journal of Food microbiology**, v. 128, p. 317-324, 2008.

BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 722–734, 2012.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food Chemical Toxicology**. v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BOAVENTURA, A. O.; CASTRO, A. H. F.; MENDES-COSTA, M. C.; DA SILVEIRA, I. A. **Avaliação das atividades antifúngicas e antibacterianas do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.)**, Anais do CNPq, 20 de Junho 2006, Belo Horizonte-MG.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira, v. 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2010, p. 904.

BURDETTE, C. B.; KINSMAN, D. M.; KOTULA, A. W. **Muscle Foods: Meat Poultry and Seafood Technology**. 6. Ed. Boston, MA: Springer US, 1994. 574 p.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

BUSATTA, C.; VIDAL, R. S.; POPIOLSKI, A. S.; MOSSI, A. J.; DARIVA, C.; RODRIGUES, M. R.; CORAZZA, F. C.; VLADIMIR OLIVEIRA, J. CANSIAN, R. L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v. 25, p. 207-211, 2008.

CALO, J. R.; CRANDALL P. G.; O'BRYAN C. A.; RICKE S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; MARTINEZ, N.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v.29, p.171-176, 2009.

CELIK TAS, O. Y.; HAMES KOCABAS, E. E.; BEDIR, E.; VANDAR SUKAN, F.; OZEK, T.; BASER, K. H. C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 553–559, 2007.

GALLO, J. Q. Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. **Journal of Membrane Science**, v. 180, n. 1, p. 37–46, 2000.

CLSI, M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI (Clinical Lab. Stand. Institute) 35. 2015a.

CLSI, M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI (Clinical Lab. Stand. Institute) 35. 2015b.

COWAN, M. M. Plant products and antimicrobial agentes. **Clinical Microbiology Reviwes**, v. 12, n. 4, p. 564-82, 1999.

DANNENBERG, G. DA S.; FUNCK, G. D; CRUXEN, C. E. DOS S.; MARQUES, J. DE L.; DA SILVA, W. P.; FIORENTINO, A. M. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 314–318, 2017.

DIMA, C.; DIMA, S. Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 29–35, 2015.

DUTTA, J.; TRIPATHI, S.; DUTTA, P. K. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. **Food Science and Technology International**, vol. 18, n. 1, p. 3–34, 2011.

EBRAHIMABADI, A. H.; EBRAHIMABADI, E. H. DJAFARI-BIGDOLI, Z.; KASHI, F. J.; MAZOOCHI, A.; BATOOLI, H. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 452–458, 2010.

EMIROGLU, Z. K.; YEMIS, G. P.; COSKUN, B. K.; CANDOGAN, K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 283–288, 2010.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, vol.9, n. 5, p. 435-451, 2008.

FERNANDES, R. P. P.; TRINDADE, M. A.; TONIN, F. G.; LIMA, C. G.; LORENZO, J. M.; DE MELO, M. P. Evaluation of oxidative stability of lamb Burger with *Origanum vulgare* extract. **Food Chemistry**, v. 233, p. 101-109, 2017.

FIGUEIREDO, A. C.; MIGUEL, M. G. Aromatic plants, spices and volatiles in food and beverages. **Flavour and Fragrance Journal**, v.25, p.251-252, 2010.

GHABRAIE, M.; VU, K.D.; TATA, L.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. **LWT- Food Science and Technology**. v. 66, p. 332–339. 2016.

GALUS, S.; KADZIŃSKA, J. Food applications of emulsion-based edible films and coatings. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 273–283, 2015.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ DE LACEY, A.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, London, v. 27, n.7, p. 889-896, 2010.

GUIMARÃES, S. S.; MAZARO, S. M.; RAMOS, C. E. P.; DE GOUVEA, A.; SZEPANHUK, V.; PADILHA, T. R. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja (*Glycine max*) em resposta a derivados de capítulos florais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.). **Ciência Rural**, Paraná, v. 38, n. 7, 2008.

GUTIERREZ, J. R. V. Dano oxidativo, radicales libres y antioxidantes. **Revista Cubana de Medicina Militar**, Havana, v. 31, n. 2, p. 126-133, 2002.

HASHEMI, S. M. B.; MOUSAVI KHANEGHAH, A. Characterization of novel basil-seed gum active edible films and coatings containing oregano essential oil. **Progress in Organic Coatings**, v. 110, n. March, p. 35–41, 2017.

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 403–413, 2015.

IBARRA, P. **Meat Processing for Small and Medium Scale Operations**. University of the Philippines at Los Baños, p. 418, 1983.

IOS. Aromatic natural raw materials - vocabulary. **International Standard Organization (IOS 9235:2013)**, p. 14, 2013.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

KHANJARI, A.; KARABAGIAS, I. K.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of N,O-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat fillets. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 94–99, 2013.

KLAUS, A.; BEATOVIC, D.; NIKSIC, M.; JELACIC, S.; PETROVIC, T. Antibacterial activity of aromatic plants essential oils from serbia against the *Listeria monocytogenes*. **Journal of Agriculture Sciences**, v. 54, n. 2, p. 95-104, 2009.

KROCHTA, J. Proteins as Raw Materials for Films and Coatings: Definitions, Current Status, and Opportunities. **Protein-Based Films and Coatings**, p. 1–41, 2002.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers of marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, vol. 8, p. 203-226, 2006.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, n. 1, p. 13–39, 2012.

LEKJING, S. A chitosan-based coating with or without clove oil extends the shelf life of cooked pork sausages in refrigerated storage. **Meat Science**, v. 111, p. 192–197, 2016.

MATTOS, S. H.; INNECCO, R.; MARCO, C. A.; ARAÚJO, A. V. **Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007. p. 61-63.

MEILGAARD, M.; CIVILE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 2. ed. Editora CRC Press, Nova York, 1991. 354 p.

MOHEBI, E.; SHAHBAZI, Y. Application of chitosan and gelatin based active packaging films for peeled shrimp preservation: A novel functional wrapping design. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 108–116, 2017.

MORADI, M.; TAJIK, H.; ROHANI, S. M. R.; OROMIEHIE, A. R. Effectiveness of *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract impregnated chitosan film on ready-to-eat mortadella-type sausages during refrigerated storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, n.15, p.2850-2857, 2011.

MYTLE, N.; ANDERSON, G. L.; DOYLE, M. P.; SMITH, M. A. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food Control**, v. 17, p. 102-107, 2006.

OKE, F.; ASLIM, B.; OZTURK, S.; ALTUNDAG, S. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 874–879, 2009.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hidrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 308-312, 2010.

OLIVEIRA, A. C. DE.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G.; AKISSUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 2007. 412 p.

OLMEDO, R.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Antioxidant activity of fractions from oregano essential oils obtained by molecular distillation. **Food Chemistry**, v. 156, p. 212–219, 2014.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SALMIÉRI, S.; SAUCIER, L. LACROIX, M. Antimicrobial effects of alginate-based films containing essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* present in bologna and ham. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 4, p. 901–908, 2007.

PAPAS, A. M. Oil-soluble antioxidants in foods. **Toxicology and Industrial Health**, v. 9, n. 1–2, p. 123–149, 1993.

PELLISSARI, Francieli Maria. **Produção e caracterização de filmes de amido de mandioca, quitosana e glicerol com incorporação de óleo essencial de orégano**. 2009. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M., G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Chemical characterization and inhibitory effect of essential oils on the growth os *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 887-893, 2007.

RAHMAN, A.; KANG, S. C. Inhibition of foodborn pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of *Erigeron ramosus* (Walt.) B. S. P. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 176-189, 2009.

RAMADAN, M. F.; ASKER, M. M. S.; TADROS, M. Lipid profile, antiradical power and antimicrobial properties of *Syzygium aromaticum* oil. **Grasas y Aceites**, v. 64, n. 5, p. 509–520, 2013.

RAMOS, E.; MACHADO, A.; LOPES, J. G.; COSTA, S. H. M. **Antimicrobianos em ginecologia e obstetrícia**. Porto Alegre: Artmed, 2007, 373 p.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. Tradução de Benedetti, I. C. Supervisão Científica de Bastos, J. K. e outros. 1ª ed. Editorial Premier. São Paulo. 1997. 372 p.

SANTOS, J. C.; CARVALHO FILHO, C. D.; BARROS, T. F.; GUIMARÃES, A. G. Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 1557-1564, 2011.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHÁFER, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 277-283, 2010.

SCOPEL, R.; FALCÃO, M. A.; LUCAS, A. M. ALMEIDA, R. N.; GANDOLFI, P. H. K.; CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F. Supercritical fluid extraction from *Syzygium aromaticum* buds: Phase equilibrium, mathematical modeling and antimicrobial activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 223–230, 2014.

SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, v. 39, n. 5, p. 639-644, 2006.

SHAKILA, R. J.; JEEVITHAN E.; VARATHARAJAKUMAR, A.; JEYASEKARAN, G. Suitability of Antimicrobial Grouper Bone Gelatin Films as Edible Coatings for Vacuum-Packaged Fish Steaks. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 25, n. 5, p. 724–734, 2015.

SHARMA, H.; MENDIRATTA, S. K.; AGRAWAL, R. K.; GURUNATHAN, K.; KUMAR, S.; SINGH, T. P. Use of various essential oils as bio preservatives and their effect on the quality of vacuum packaged fresh chicken sausages under frozen conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 118-127, 2017.

SHYLAJA. M. R.; PETER, K. V. The functional role of herbal spices. In: PETER, K. V. **Handbook of herbs and spices**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, v. 2, p. 360, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: Ed. Da UFRGS; Florianópolis: Ed. Da UFSC, 2004. 821 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK. P. R. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104 p.

SINDELAR, J. J.; MIKOWSKI, A. L. Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curing and examining the risk/benefits of its use. **American Meat Science Association**, n. 3, 2011.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136–141, 2012.

SOUSA, C. P. Pathogenicity mechanisms of prokaryotic cells: na evolutionary view. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 23-31, 2003.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; NETO, A. C. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus spp*: isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 41-45, 2006.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.- The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 63-68, 1959.

TERRA, N. N. **Apontamentos em Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo: Editora da Universidade do Vale do Rio dos Sinos, 2005. 216 p.

VALLILO, M.I.; BUSTILLOS, O.V.; AGUIAR, O.T. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (cambessédes) o. berg – myrtaceae*. **Revista do Instituto Florestal**, v.18, p. 15-22, 2006.

WIHODO, M.; MORARU, C. I. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 3, p. 292-302, 2013.

ZHONG, Y.; SONG, X.; LI, Y. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch-chitosan composite films as a function of acid solvent types. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 335–342, 2011.

Anexos

Anexo A – Ficha Hedônica

NOME: _____ DATA: ___ / ___ / ___

FAIXA ETÁRIA: 18 à 30 anos: _____ 30 à 45 anos: _____

45 à 60 anos: _____ 60 à 75 anos: _____ maiores de 75 anos _____

SEXO: _____

Você está recebendo uma amostras de hambúrguer com aplicação de uma cobertura adicionada com óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano. Avalie globalmente, segundo o grau de gostar ou desgostar, utilizando a escala abaixo.

- Gostei extremamente
- Gostei moderadamente
- Gostei regularmente
- Gostei ligeiramente
- Não gostei, nem desgostei
- Desgostei ligeiramente
- Desgostei regularmente
- Desgostei moderadamente
- Desgostei extremamente

Comentários: _____

Anexo B – Ficha de Intenção de Compra

NOME: _____ DATA: ___ / ___ / ___

FAIXA ETÁRIA: 18 à 30 anos: _____ 30 à 45 anos: _____

45 à 60 anos: _____ 60 à 75 anos: _____ maiores de 75 anos _____

SEXO: _____

Você está recebendo uma amostra de hambúrguer com aplicação de uma cobertura adicionada com óleos essenciais de orégano, erva-doce, cravo-da-índia. Avalie segundo a sua intenção de compra, utilizando a escala abaixo.

- Decididamente eu compraria
- Provavelmente eu compraria
- Talvez sim/ Talvez não
- Compraria ocasionalmente
- Provavelmente eu não compraria
- Decididamente eu não compraria
- Compraria somente se fosse forçado

Comentários: _____

6 Relatório do Trabalho de Campo

Na Dissertação procurou-se seguir a proposta apresentada no Projeto de Pesquisa, porém algumas alterações necessárias foram realizadas em função de limitações e para que o experimento pudesse ser executado em tempo hábil com êxito.

A avaliação do efeito antimicrobiano dos óleos essenciais não foi realizada por meio do método de difusão em disco, conforme descrito no Projeto de Pesquisa, em função do volume proposto para adição (10 μ L) nos discos de papel se dispersar pelo meio de cultura, impossibilitando a medição posterior do halo de inibição.

Foi incorporado somente o óleo essencial de cravo-da-índia na cobertura comestível a base de quitosana, pois foi o óleo essencial que apresentou *in vitro* maior efeito antimicrobiano frente aos micro-organismos testados.

7 Manuscrito

Manuscrito para submissão ao periódico *LWT – Food Science and Technology*.

Fator de impacto: 3.129

ISSN: 0023-6438

Desenvolvimento de coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas de óleos essenciais e aplicação em produto cárneo

Pâmela Inchauspe Corrêa Alves¹, Marjana Radunz², Márcia de Mello Luvielmo³,
Márcia Arocha Gularte¹, Caroline Peixoto Bastos⁴, Caroline Dellinghausen
Borges¹, Cláudio Dias Timm¹, Eliezer Avila Gandra¹

¹Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos (PPGNA), Departamento da Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA), Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

³Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

⁴Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, UFPEL, Pelotas, RS, Brasil

*E-mail: gandraea@hotmail.com

Resumo

A indústria alimentícia busca por estratégias que previnam o crescimento microbiano a fim de garantir a segurança e a vida útil dos alimentos. No entanto, a utilização de conservantes químicos sintéticos em produtos cárneos implica em riscos à saúde humana quando são consumidos em excesso. Nesse sentido, os óleos essenciais são compostos naturais amplamente conhecidos por suas propriedades antimicrobianas e capacidade de interação com coberturas comestíveis, tornando-se uma alternativa natural com potencial para substituí-los. Neste trabalho, objetivou-se testar a capacidade conservante de coberturas bioativas a base de quitosana incorporadas de óleo essencial em hambúrgueres, como embalagem ativa no controle do desenvolvimento de micro-organismos relevantes em alimentos. A ação antimicrobiana dos óleos essenciais foi avaliada por difusão em meio sólido (ágar), dispersão em meio líquido (caldo), volatilização (micro-atmosfera) e *in situ* (hambúrguer). Observou-se que o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou forte atividade antimicrobiana, tendo efeito bactericida em meio sólido e líquido frente *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, enquanto o óleo essencial de erva-doce e orégano exibiram por volatilização. O óleo essencial de cravo-da-índia foi aplicado como componente ativo em coberturas a base de quitosana em hambúrgueres, as quais se mostraram capazes de promover o controle da proliferação microbiana

de Coliformes Totais, Coliformes a 45°C e *Staphylococcus* coagulase positiva ao longo de 7 dias de armazenamento sob refrigeração. Os hambúrgueres foram avaliados por análise sensorial com os testes de aceitação e intenção de compra, demonstrando resultados satisfatórios para cor, odor e textura.

Palavras-chave: óleo essencial; atividade antimicrobiana; bioconservante; hambúrguer.

1. Introdução

A indústria emprega diferentes métodos de conservação durante a produção e comercialização dos produtos de origem animal, a fim de retardar ou prevenir as alterações microbiológicas, químicas ou físicas, que os tornam impróprios para o consumo (Macwan, Dabhi, Aparnathi, & Prajapati, 2016). No entanto, há o crescente aparecimento de micro-organismos patogênicos resistentes e tolerantes aos principais antimicrobianos já utilizados (Rai et al., 2017).

Aliado a esse fato, a adição de conservantes químicos sintéticos nos alimentos confronta com a gradativa demanda dos consumidores na busca por produtos de origem natural, em vista de uma alimentação saudável (Calo, Crandall, O'Bryan, & Ricke, 2015), uma vez que tais conservantes podem ocasionar problemas à saúde humana quando consumidos em excesso pela produção de compostos tóxicos e potencial carcinogênico (Sindelar & Milkowski, 2011; OMS, 2015).

Nesse contexto, dentre as alternativas com potencial para substituir parcialmente ou completamente os conservantes químicos sintéticos, há os compostos oriundos do metabolismo secundário de plantas aromáticas (Burt, 2004), nomeados como óleos essenciais, os quais têm sido amplamente estudados, em consequência da sua comprovada propriedade antimicrobiana (Santos, Carvalho Filho, & Guimarães, 2011; Hussein, Abaas, & Ali, 2011; Amariei et al., 2018).

A viabilidade da sua aplicação como antimicrobianos se dá em virtude da sua composição química, pois as plantas desencadeiam mecanismos naturais de defesa frente a variações climáticas, ataques de micro-organismos e animais

superiores, sintetizando moléculas biologicamente ativas como terpenos e compostos fenólicos (Burt, 2004).

Dentre as plantas já utilizadas para obtenção de óleo essencial encontram-se a erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e o orégano (*Origanum vulgare* L.), que já demonstraram em estudos anteriores ação antimicrobiana frente patógenos de origem alimentar (Ghabraie, Vu, Tata, Salmieri, & Lacroix, 2016; Hosseini, Rezaei, Zandi, & Farahmandghavi, 2015; Scopel et al., 2014), porém, pode haver uma indesejável interferência sensorial do óleo essencial pela aplicação direta no alimento diminuindo a aceitação do produto pelo consumidor (Dannenberg, Funck, Mattei, da Silva, & Fiorentini, 2016).

Todavia, esse problema pode ser reduzido com a aplicação do óleo essencial em coberturas comestíveis, evitando a incorporação direta no alimento, e, assim, concentrando sua ação na superfície do mesmo, onde a contaminação microbiana é mais intensa (Appendini & Hotchkiss, 2002; Coma, 2008). Dentre as opções para as coberturas, encontra-se a quitosana, um polissacarídeo derivado da quitina, que é um componente sintetizado por uma diversidade de organismos vivos (Kurita, 2006). A quitosana é empregada na elaboração de coberturas como um produto natural, atóxico e com capacidade de formar filmes com propriedades antimicrobianas (Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén, & Montero, 2010).

Dado o contexto exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas de óleos essenciais sobre as características microbiológicas e sensoriais em hambúrgueres de carne bovina.

2. Materiais e Métodos

2.1 Material vegetal

As amostras de folhas secas de erva-doce e orégano foram adquiridas do distribuidor comercial Luar Sul[®] - Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios Ltda., da cidade de Santa Cruz do Sul/RS, Brasil, latitude 29°41'303" e longitude 52°26'175", botanicamente identificadas como *Pimpinella anisum* L. e *Origanum*

vulgare L., respectivamente. As amostras de botões florais secos de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) foram adquiridas no comércio local da cidade de Pelotas – RS, latitude 31°46'325" e longitude 52°20'199". Todas as amostras estavam acondicionadas em sacos plásticos até sua utilização.

2.2 Extração do óleo essencial

As amostras dos botões florais secos de cravo-da-índia foram moídas em moinho de facas (Marconi) e, posteriormente, o óleo essencial de cada amostra foi extraído pelo método de hidrodestilação descrito pela Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010). Foram inseridos, separadamente, 300 gramas de erva-doce, orégano e cravo-da-índia, em balão de vidro com 1000 mL de água destilada, o qual foi acoplado ao equipamento Clevenger e submetido ao aquecimento até a ebulição (100°C) em manta aquecedora durante 4 horas. Após sua obtenção, o óleo essencial obtido foi transferido para um frasco de vidro âmbar, cada, e armazenado sob congelamento (-18°C) até a realização das análises.

2.3 Composição química do óleo essencial de erva-doce, cravo-da-índia e orégano

A determinação da composição do óleo essencial de erva-doce, cravo-da-índia e orégano foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado ao detector de massas (GC/MS – QP2010 - Shimadzu®), equipado com uma coluna capilar RTX-5MS (Restek®) (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) nas seguintes condições cromatográficas: transportador de gás de Hélio obtido por fragmentos de impacto de elétrons (IE) a uma potência de 70 eV de 1,2 mL/min, 1:50 fluxo dividido e o volume de amostra injetada de 1 µL. A temperatura do forno foi programada partindo de 40°C com uma rampa de aquecimento entre 10°C a 280°C/min, mantendo-se estável a essa temperatura durante 10 min. Subsequentemente, a temperatura foi aumentada a uma taxa de 10°C a 300°C/min. durante um tempo total de 41 min. com uma temperatura de injetor de 250°C e temperatura de interface de 300°C. Os compostos presentes no óleo foram identificados com base na comparação dos índices de retenção e espectro de massa destes com

os padrões presentes na biblioteca NIST EP/EPA/MIH (NIST 05) do aparelho e as percentagens relativas da área de cada pico sobre a área total.

2.4 Atividade antimicrobiana

2.4.1 Micro-organismos

Foram utilizados dois micro-organismos, sendo uma bactéria Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832), e uma Gram-negativa: *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895).

As bactérias utilizadas no experimento foram mantidas sob congelamento em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção 3:1 (v/v). Para realizar a reativação, uma alçada dessas bactérias foi transferida para caldo Soja Trypticaseína (TSB) e incubada em estufa durante 24h a 37°C. Após, uma alçada desse crescimento foi estriada em placas de Petri (90 x 15 mm) com meios seletivos, sendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *E. coli* e ágar Baird Parker para *S. aureus*, e incubadas a 37°C durante 24h para o isolamento das colônias.

2.4.2 Difusão em poços

A análise de difusão em poços foi realizada de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2015) com pequenas modificações.

Inicialmente, do crescimento bacteriano nas placas de Petri, as culturas bacterianas foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85%), obtendo a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (0,5 *McFarland*). Na técnica, foram feitos três pequenos poços equidistantes (diâmetro 5 mm) com cilindro estéril de alumínio no centro das placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (MH). A suspensão celular foi inoculada na superfície do ágar com o auxílio de *swabs* estéreis e 10 µL do óleo essencial foram adicionados em cada poço, como controle negativo foram utilizados 10 µL de água destilada estéril. As placas foram incubadas a 37°C e as leituras realizadas após 24h de incubação, em que analisou-se a existência de halos de inibição, quantificando os existentes com régua. Halos

com diâmetros iguais ou superiores a 7 mm foram considerados indicativos de sensibilidade bacteriana ao óleo (Arora & Kaur, 1999).

2.4.3 Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada através do teste de microdiluição em placa, de acordo com o método descrito por Cabral et al. (2009) com pequenas modificações.

Para isto foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, em que foram acrescentados em cada poço 100 µL de caldo BHI com Tween 80 a 1%, 100 µL de inóculo (80 µL de caldo BHI e 20 µL solução salina com crescimento bacteriano) e óleo essencial em cinco diferentes concentrações de óleo: puro (100 µL de óleo essencial puro); 1:5 (20 µL de óleo essencial e 80 µL de caldo BHI); 1:10 (10 µL de óleo essencial e 90 µL de caldo BHI); 1:100 (1 µL de óleo essencial e 99 µL de caldo BHI) e 1:1000 (0,1 µL de óleo essencial e 99,9 µL de caldo BHI). Como controle negativo foi utilizado apenas o meio de cultura e para o controle positivo foi utilizado o meio de cultura acrescido do inóculo bacteriano. Após o preparo da amostra, as placas de microtitulação foram avaliadas em espectrofotômetro (Biochrom EZ Read 400) a 620 nm. Em seguida, procedeu-se a incubação a 37°C por 24h e, após o período de incubação, foi realizada uma nova leitura em espectrofotômetro. A CIM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura.

2.4.4 Concentração Bactericida Mínima

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada de acordo com o método descrito por Cabral et al. (2009) com pequenas modificações.

Para detectar a CBM foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar BHI alíquotas de 15 µL de cada poço onde houve inibição no teste da CIM, sendo incubadas a 37°C durante 24h. Após o período de incubação, foi verificado em quais concentrações o óleo essencial teve ação bactericida, indicado pela ausência do crescimento de colônias na superfície do meio de cultura.

2.4.5 Atividade antimicrobiana em microatmosfera

A atividade antimicrobiana em microatmosfera foi avaliada pela técnica proposta por Ghabraie et al. (2016) com pequenas modificações.

Alíquotas de 0,1 mL de suspensões celulares (10^8 UFC/mL) das bactérias foram inoculadas na superfície de placas de Petri com ágar BHI. Na tampa de cada placa foram posicionados discos de papel filtro estéreis (15 mm) nos quais foram adicionados diferentes volumes do óleo essencial (100 μ L, 50 μ L, 25 μ L e 12,5 μ L), as quais foram imediatamente fechadas e incubadas de modo invertido (tampa para baixo) a 37°C por 24h. A ação antimicrobiana foi expressa pelo percentual de redução na contagem celular (UFC) dos tratamentos com o óleo essencial comparados com um controle contendo água destilada estéril. Todos os testes foram realizados em triplicata, com três repetições para cada bactéria.

2.5 Elaboração da cobertura de quitosana

As soluções de quitosana foi preparada de acordo com a metodologia proposta por Moradi, Tajik, Razavi Rohani, & Oromiehie (2011) com pequenas modificações.

A solução de revestimento foi elaborada a partir da dissolução de 2 gramas de quitosana (2% m/v - Polymar Ciência e Nutrição S/A) em ácido acético glacial a 1% (v/v) com posterior agitação *overnight* em agitador magnético em temperatura ambiente. Após, adicionou-se à solução 0,5 mL de glicerol (1% v/v) e 0,1% (m/v) de Tween 80, a qual foi colocada sob agitação em Ultra Turrax (27.000 rpm/30 minutos) em temperatura ambiente.

2.5.1 Elaboração da cobertura de quitosana incorporada com óleo essencial

Em 100 mL da solução de quitosana foram adicionados 1g de óleo essencial (1% m/v), 0,5 mL de glicerol (1% v/v) e 0,1% (m/v) de Tween 80, a qual foi colocada sob agitação em Ultra Turrax (27.000 rpm / 30 minutos) em temperatura ambiente.

2.6 Elaboração dos hambúrgueres

Os hambúrgueres, utilizados como matriz alimentar, foram preparados seguindo as recomendações de Terra (2005) com pequenas modificações. A formulação padrão empregada nos tratamentos constou de 73% de carne bovina magra, 7% de gordura suína, 20% de proteína de soja e 1,5% de sal.

Inicialmente, a carne bovina refrigerada e a gordura suína obtidas comercialmente foram fatiadas e, em seguida, com a adição do sal e da gordura suína aos pedaços de carne, moídas em moedor de carne (Bermar Indústria e Comércio[®]) com disco de 6 mm. Após o processo, adicionou-se a proteína de soja hidratada à massa cárnea e, ao final do preparo, os hambúrgueres foram modelados individualmente com filmes plásticos (Policloreto de vinila – PVC) em placas de Petri (60 x 15 mm).

A seguir, as amostras de hambúrgueres foram revestidas com as respectivas coberturas de quitosana e posicionadas em ambiente estéril sob refrigeração (4°C) por 7 dias, analisando nos tempos 2, 5 e 7 dias. Na tabela 1 podem ser visualizadas as formulações utilizadas neste estudo.

Tabela 1. Formulações dos produtos cárneos análogos a hambúrgueres.

Tratamento	Ingredientes
Tratamento 1	FPPC*
Tratamento 2	FPPC* + Cobertura de quitosana
Tratamento 3	FPPC* + Cobertura de quitosana incorporada com óleo essencial
Tratamento 4	FPPC* + Cobertura de quitosana incorporada com óleo essencial + Nitrito de Sódio 50%
Tratamento 5	FPPC* + Nitrito de Sódio 100%

*FPPC – Formulação padrão do produto cárneo: carne, gordura suína, proteína de soja e sal.

2.7 Atividade antimicrobiana *in situ*

As análises foram realizadas de acordo com os procedimentos propostos pela *American Public Health Association* (APHA) (Downes & Ito, 2001) com modificações.

2.7.1 Coliformes Totais e Coliformes a 45°C (Termotolerantes)

Para a enumeração de Coliformes a 45°C foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP). Inicialmente, foram pesadas assepticamente 25 g da amostra de cada tratamento e diluídas em 225 mL de solução salina estéril, a fim de se obter a diluição inicial 10^{-1} , a partir da qual foram obtidas as demais diluições decimais até 10^{-3} .

Em seguida, de cada uma das diluições foram transferidas alíquotas de 1 mL para três séries de tubos de ensaio contendo 9 mL de caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST) com tubos de Durham invertidos e incubação a 35°C por 48h. Os tubos que apresentaram formação de gás no caldo LST foram considerados positivos no teste presuntivo.

Em uma segunda etapa, com o auxílio da alça níquel-cromo, foram retiradas alíquotas dos tubos positivos e transferidas para tubos contendo caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB), com incubação a 35°C por 24h, e caldo *E. coli* (EC), com incubação a 45,5°C em banho-maria por 24h, ambos contendo tubos de Durham invertidos. Os tubos que apresentaram formação de gás nos tubos com caldo VB foram considerados positivos para coliformes totais e os tubos com formação de gás em caldo EC foram considerados positivos para Coliformes a 45°C (Termotolerantes). Os resultados foram expressos em NMP.g^{-1} .

2.7.2 *Staphylococcus coagulase positiva*

Foram inoculados 0,1 mL de cada diluição seriada pela técnica de semeadura em superfície em ágar Baird Parker (BP) e em duplicata, em seguida, as placas foram incubadas a 36°C por 24 - 48h. As colônias foram enumeradas e, no mínimo, cinco colônias que apresentaram morfologia típica e cinco atípica foram selecionadas para realização de teste de produção de coagulase livre.

2.8 Análise sensorial

Os hambúrgueres com aplicação da cobertura incorporada com óleo essencial foram elaborados, com a formulação já citada anteriormente, 24 horas antes da realização da análise sensorial, a qual foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas. Participaram da análise sensorial uma equipe não treinada de 52 avaliadores, de ambos os gêneros, constituídos por estudantes e funcionários da Universidade Federal de Pelotas.

Em todos os testes, as amostras foram apresentadas grelhadas em pratos de porcelana acompanhadas de um copo com água. O teste foi realizado em cabines individuais, com luz branca, isentas de ruídos e odores, em horário distante das principais refeições, e além da ficha de análise sensorial (Apêndice A) os avaliadores também receberam o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B).

Foi verificada a aceitação do produto e sua intenção de compra (Apêndice A), com escala hedônica de 9 pontos (gostei muitíssimo a desgostei muitíssimo) e de 7 pontos (certamente compraria a certamente não compraria), respectivamente (Meilgaard, Civile, & Carr, 2006). Os resultados foram avaliados por frequência (%) de respostas. Para o teste de aceitação foram considerados os parâmetros cor, odor, textura, sabor e impressão global, sendo este último utilizado para calcular o Índice de Aceitabilidade (IA), adotando a seguinte expressão matemática:

$$IA = (A*100) / B$$

Onde:

IA = índice de aceitabilidade

A = média dos resultados

B = nota mais alta obtida na escala hedônica

2.9 Análise estatística

A análise estatística dos resultados da atividade antimicrobiana foi realizada através de uma análise de variância (ANOVA main effects analysis) utilizando o *software* STATISTICA (StatSoft – versão 7.0). Foi aplicado o teste de Fisher para detectar diferença mínima significativa - teste LSD ($p \leq 0,05$). As contagens microbianas foram logaritmizadas antes da análise estatística.

3. Resultados e discussão

3.1 Rendimento de extração

O rendimento da extração do óleo essencial de erva-doce foi de 2,5%, após o processo de hidrodestilação. Este resultado foi semelhante ao rendimento de 2,3% obtido por Khalil, Ashour, Fikry, Singab & Salama (2018), utilizando o mesmo método de extração. No entanto, cabe ressaltar que tal resultado foi superior ao rendimento de 1,29% observado por Radaelli et al. (2016) e ao estudo de Pino, Sánchez, Rojas, Abreu, & Correa (2012), em que o rendimento foi de 0,8%.

Para o óleo essencial de cravo-da-índia o rendimento (1%) foi inferior aos encontrados na literatura, que variam de 1,87% e 4,33% (Silvestri et al., 2010; Saeed & Shahwar, 2015; Stanojević, Stanojević, Cvetković, & Ilić, 2016; Barros Gomes et al., 2018). Possivelmente, essa diversidade entre os valores possa ser atribuída às diferenças de solo, época de colheita, clima e umidade relativa do ar (Burt, 2004).

Quando se compara o rendimento do óleo essencial de orégano (0,97%), obtido neste trabalho, com o atingido por Borges, Pereira, Cardoso, Alves, & Lucena (2012), que determinaram o valor de 0,77%, verifica-se que o rendimento encontrado foi inferior ao presente estudo. Possivelmente, os óleos essenciais apresentem distintos rendimentos devido aos diferentes estágios do ciclo vegetativo da planta, como o observado por Béjaoui, Chaabane, Jemli, Boulila, & Boussaid (2013), os quais notaram que existe uma variação no rendimento do óleo de orégano neste período entre 0,2% e 1,7%.

Assim, os resultados obtidos mostram a relevância da informação do local de colheita, espécie da planta, além do modelo e tempo de extração para obtenção do teor de óleo essencial.

3.2 Caracterização química do óleo essencial de erva-doce, cravo-da-índia e orégano

A Figura 1 apresenta o cromatograma do óleo essencial de erva-doce. A identificação dos principais compostos presentes no óleo, determinada por CG/MS, pode ser observada na Tabela 2.

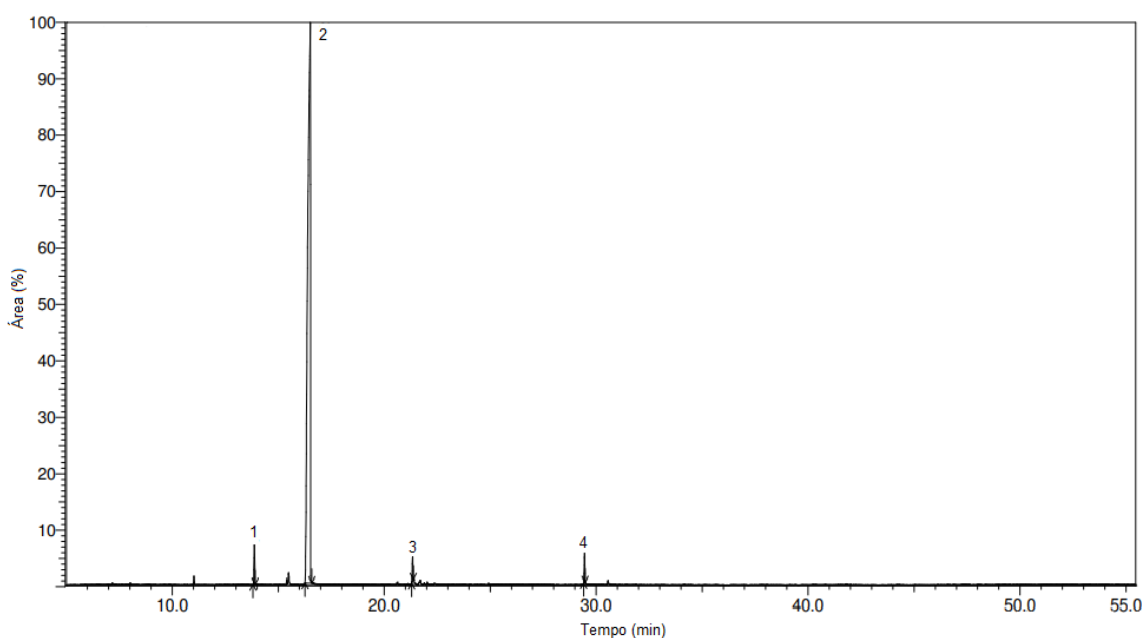


Figura 1. Cromatografia do óleo essencial de erva-doce. Picos dos padrões: 1) Estragol; 2) Anetol; 3) Humuleno; 4) Acetato de isoeugenol.

Na figura 2 é possível visualizar o cromatograma do óleo essencial de cravo-da-índia. A análise cromatográfica do óleo essencial identificou três compostos, sendo o componente majoritário o eugenol com 56,06% (Pico 2), seguido pelo cariofileno com 39,63% (Pico 1) e pelo α -cariofileno com 4,31% (Pico 3), conforme demonstrado na Tabela 2.

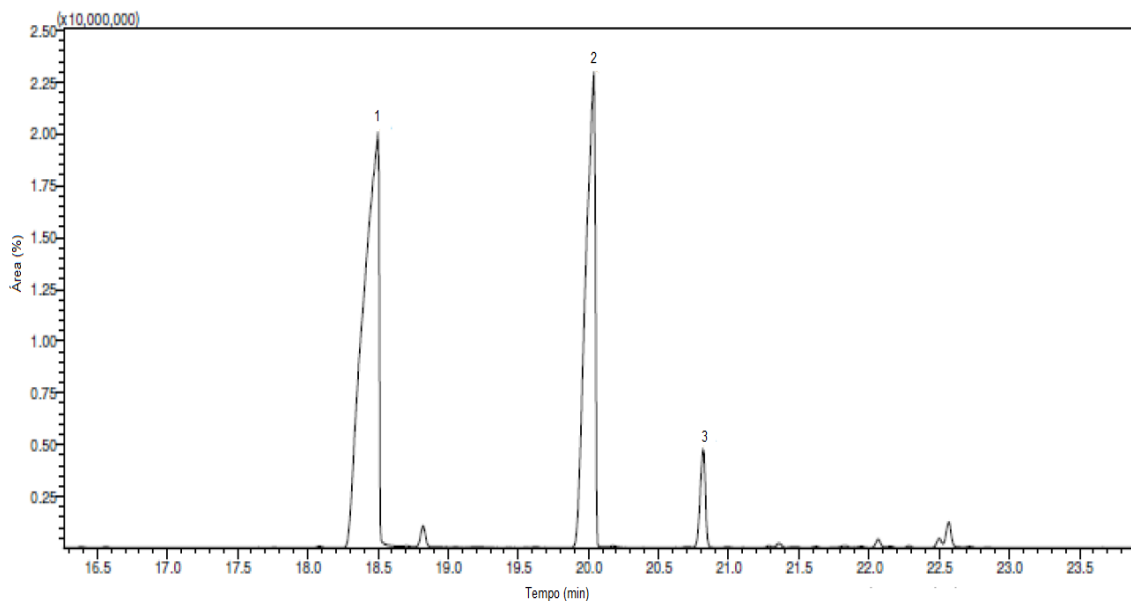


Figura 2. Cromatograma do óleo essencial de cravo-da-índia. Picos dos padrões: 1) Eugenol; 2) Cariofileno; 3) α -cariofileno.

O cromatograma do óleo essencial de orégano pode ser visualizado na Figura 3. Por meio deste estudo foram detectados dezesseis componentes, dentre eles o 4-terpineol (22,71% - Pico 10), o γ -terpineno (13,63% - Pico 5) e o timol (11,35% - Pico 14) foram os majoritários (Tabela 2).

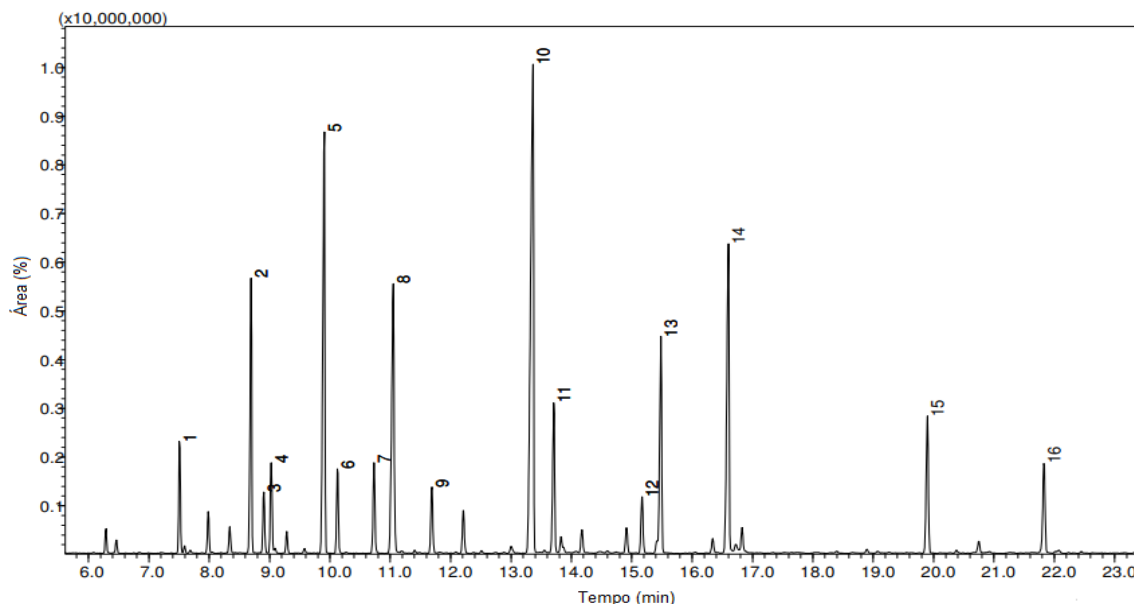


Figura 3. Cromatograma do óleo essencial de orégano. Picos dos padrões: 1) Sabineno; 2) 2-Careneno; 3) *o*-Cymol; 4) β -felandreno; 5) γ -terpineno; 6) Cis- β -terpineol; 7) α -terpinoleno; 8) 2-metil-5-(1-metiletil)-Biciclo[3.1.0]hex-2-eno; 9) 1-metil-4-(1-metiletil) Ciclohexano-1,4-dieno; 10) 4-terpineol; 11) α -terpineol; 12) Metil éter timol; 13) Bergamol; 14) Timol; 15) Cariofileno; 16) γ -elemeno.

Tabela 2. Componentes do óleo essencial de erva-doce, cravo-da-índia e orégano identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.

Pico	Composto*	Tempo de retenção (min)	Quantidade relativa em área de espectro (%)
Erva doce			
1	Estragol	13,872	1,70
2	Anetol	16,512	95,88
3	Humuleno	21,338	1,08
4	Acetato de isoeugenol	29,451	1,34
Cravo-da-índia			
1	Cariofileno	18,498	39,63
2	Eugenol	20,038	56,06
3	α -cariofileno	20,819	4,31
Orégano			
1	Sabineno	7,511	3,00
2	2-Carenenol	8,691	7,22
3	o-Cymol	8,906	1,43
4	β -felandreno	9,029	2,79
5	γ -terpineno	9,905	13,63
6	Cis- β -terpineol	10,128	2,26
7	α -terpinoleno	10,732	2,61
8	2-metil-5-(1-metiletil)- Biciclo [3.1.0] hex-2-eno	11,047	9,93
9	1-metil-4-(1-metiletil)- Ciclohexano-1,4-dieno	11,689	1,83
10	4-terpineol	13,363	22,71
11	α -terpineol	13,710	5,00
12	Metil éter timol	15,171	1,85
13	Bergamol	15,482	7,21
14	Timol	16,599	11,35
15	Cariofileno	19,897	4,20
16	γ -elemeno	21,828	2,99

*Padrões presentes na biblioteca NIST EP/EPA/MIH (NIST 05).

Apesar da composição química dos óleos essenciais ser influenciada por condições climáticas, localização geográfica da planta, características do solo de cultivo e época de colheita (Gobbo-neto & Lopes, 2007), os resultados

encontrados neste estudo foram semelhantes aos já relatados na literatura consultada, havendo concordância com alguns grupos de compostos.

Na identificação dos compostos do óleo essencial de erva-doce, determinada por CG/MS, foram encontrados quatro componentes: anetol, estragol, acetato de isoeugenol e humuleno, sendo majoritário o primeiro composto com 95,88% (Tabela 2). Samojlik et al. (2016) ao avaliarem a composição química do óleo essencial das sementes de erva-doce verificaram como componente majoritário o *trans*-anetol (87,96%), seguido por γ -himacaleno, (3,17%), *cis*-isoeugenol (2,21%) e linalol (1,78%). No estudo de Radaelli et al. (2016) o óleo essencial, também derivado das sementes de erva-doce, continha 95,59% de anetol, assim como o estudo de Tepe et al. (2006), os quais identificaram vinte e um componentes no óleo, tendo como principais o anetol com 82,8% e o estragol com 14,5%.

Ainda na Tabela 2, é possível verificar os constituintes do óleo essencial de cravo-da-índia, em que consta como composto majoritário o eugenol (56,06%), corroborando com os resultados de outros autores (Sienkiewicz et al., 2017; Zhang et al., 2017; Saeed & Shahwar, 2015; Oliveira et al. 2013). Os autores Barros Gomes et al. (2018), por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, identificaram cinco constituintes do óleo essencial e constataram o eugenol com 52,53% e o cariofileno com 37,25% como os componentes majoritários.

Resultados semelhantes foram encontrados por Pradebon Brondani, Alves da Silva Neto, Antonio Freitag, & Guerra Lund (2018) ao analisarem o óleo essencial de orégano provenientes da mesma espécie e localização avaliada neste estudo. Foi identificado o 4-terpineol (41,17%) como composto majoritário e concentrações de 21,95% de timol, 5,91% de γ -terpineno e 4,71% de carvacrol. Concentrações de γ -terpineno (30,5%), carvacrol (15,7%) e 4-terpineol (13%) foram indicadas por Couto et al. (2015) do óleo essencial extraído de folhas de orégano. Os autores Hashemi & Khaneghah (2017) destacaram o timol (28,1%) como composto predominante, seguido por 4-terpineol (10,2%) e α -terpineno (7,5%).

3.3 Atividade antimicrobiana

3.3.1 Difusão em poços

No método de difusão em poços não foram detectados halos de inibição dos óleos essenciais de erva-doce e orégano, entretanto, verificou-se a sensibilidade das bactérias *E. coli* e *S. aureus* frente ao óleo essencial de cravo-da-índia, devido a formação de halos de inibição (Tabela 3). A ausência de inibição dos óleos essenciais de erva-doce e orégano pode estar associada a baixa presença de compostos antimicrobianos nestes óleos, fato que está associado as condições de clima, solo e cultivo que estas espécies vegetais foram submetidas.

Tabela 3. Halos de inibição obtidos pelo método de difusão em poços por aplicação do óleo essencial de erva-doce, cravo-da-índia e orégano frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Bactérias	Halos de inibição (mm)*		
	OEE	OEC	OEO
<i>Escherichia coli</i>	ND	12	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	16	ND

*Média das triplicatas; ND = Não detectado; OEE = Óleo essencial de erva-doce; OEC = Óleo essencial de cravo-da-índia; OEO = Óleo essencial de orégano.

Ao utilizar a classificação proposta por Arora & Kaur (1999) para avaliar a atividade antimicrobiana de substâncias, baseado no tamanho do halo de inibição presente, considera-se como ativos os halos iguais ou superiores a 7 mm de diâmetro. De acordo com esses critérios, o óleo essencial de cravo-da-índia testado neste estudo pode ser considerado ativo frente todas as bactérias avaliadas.

Apesar da variação no tamanho do halo de inibição, quando se comparam distintos estudos, decorrente das variações nas características e composição dos óleos essenciais associadas aos fatores externos, pode-se verificar que os halos de inibição formados pelo óleo essencial de cravo-da-índia, no presente trabalho, foram similares aos relatados por outros pesquisadores.

Quando analisada a inibição do óleo essencial de cravo-da-índia para *E. coli*, foi formado halo de 12 mm, resultado similar aos 11 mm encontrado por Santos et al. (2011), os quais ainda verificaram halos de 15,7 mm frente a *S. aureus*. Os autores Pereira et al. (2008) também detectaram a ação antimicrobiana do óleo em diferentes concentrações, pelo método de difusão em poços, os halos apresentaram variação entre 8 mm e 12 mm para *E. coli*, e 10 mm a 15 mm para *S. aureus*.

Pelos dados descritos na Tabela 3, pode-se verificar que o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou halo de inibição de 16 mm para *S. aureus*. No trabalho de Ghabraie et al. (2016), os autores não detectaram ação antimicrobiana do óleo essencial de cravo-da-índia frente a *E. coli*, no entanto, apontam halos de inibição de 19,9 mm para *S. aureus*.

Em relação a técnica de avaliação da atividade antimicrobiana, na literatura existem outros estudos em que é possível observar a formação de halos do óleo essencial de cravo-da-índia pela técnica de difusão em disco frente a *E. coli* e *S. aureus* (Sienkiewicz et al., 2017; Vasile et al., 2017; Oliveira et al., 2013; Trajano, Lima, Souza, & Travassos, 2009).

A ação antimicrobiana do óleo essencial de cravo-da-índia pode ser atribuída ao seu componente majoritário eugenol (56,06%) (Tabela 2). Considera-se que o mecanismo de atuação deste composto ocorra em virtude da desnaturação da membrana plasmática, o que promove o aumento da sua permeabilidade. Consequentemente, ocorre o extravasamento de íons e a perda de outros componentes celulares, resultando na morte celular (Devi et al., 2010).

Ainda, é possível que o efeito antimicrobiano do óleo esteja relacionado com a sua natureza hidrofóbica, pois permite uma interação entre o óleo essencial e os fosfolípídeos da membrana celular da bactéria, modificando a permeabilidade da mesma (Bakkali et al. 2008; Costa et al., 2011).

3.3.2 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

Na Tabela 4 podem ser visualizados os resultados referentes a CIM e CBM do óleo essencial de cravo-da-índia, o qual apresentou efeito inibitório até a concentração 3,74 mg.mL⁻¹ frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, sem distinção em relação as características das membranas dos micro-organismos.

Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de cravo-da-índia frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Bactérias	Concentrações mg.mL ⁻¹	
	CIM	CBM
<i>Escherichia coli</i>	3,74	374,33
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,74	374,33

O estudo de Silvestri et al. (2010) também avaliou o óleo essencial de cravo-da-índia e encontrou valor de CIM de 0,300 mg.mL⁻¹ para *S. aureus*, enquanto outros autores encontraram valores de 0,600 mg.mL⁻¹ (Beraldo et al., 2013), 0,640 mg.mL⁻¹ (Ivanovic, Dimitrijevic-Brankovic, Misic, Ristic, & Zizovic, 2013), 0,500 mg.mL⁻¹ (Santos et al., 2011), 0,800 mg.mL⁻¹ (Lu, Ding, Ye, & Ding, 2011) e 0,625 mg.mL⁻¹ (Xu, Liu, Hu, & Cao, 2016), resultados inferiores ao presente estudo (3,74 mg.mL⁻¹). Diferentemente, entre os óleos essenciais avaliados por Santos, Piccoli, & Tebaldi (2017), o de cravo-da-índia foi o único que não promoveu inibição no crescimento microbiano em nenhuma concentração avaliada.

Para *E. coli*, foi encontrado valor de CIM de 3,74 mg.mL⁻¹, superior ao avaliado em outros estudos com óleo essencial de cravo-da-índia. Nos estudos de Santos et al., (2011) e Sienkiewicz et al. (2016) foram observados valores de inibição de 0,100 mg.mL⁻¹, no mesmo sentido, encontram-se os valores de 0,600 mg.mL⁻¹ (Beraldo et al., 2013), 0,550 mg.mL⁻¹ (Da Silva et al., 2015) e 0,027 mg.mL⁻¹ (Gõni et al., 2009).

Com relação a ação antimicrobiana do óleo essencial de cravo-da-índia, isto pode ser explicado pela presença do composto eugenol em sua estrutura, o qual tem a hidrofobicidade como característica, a qual pode permitir a divisão dos lipídios presentes na membrana celular bacteriana, tornando-os mais permeáveis, promovendo o vazamento de íons e outros constituintes celulares, que resulta na morte celular (Devi, Nisha, Sakthirel, & Pandian, 2010).

No presente estudo, o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou efeito bactericida somente na concentração de óleo puro (374,33 mg.mL⁻¹) para os dois micro-organismos avaliados (Tabela 4). Os estudos referidos, anteriormente, sobre os resultados da CIM, também avaliaram a CBM do óleo essencial de

cravo-da-índia. Beraldo et al. (2013) apontam CBM de $1,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ para *S. aureus* e Da Silva et al. (2015) obtiveram a CBM de 1 mg.mL^{-1} , ambos inferiores ao encontrado neste ensaio.

Os autores Da Silva et al. (2015) referiram CBM de $0,100 \text{ mg mL}^{-1}$ para inibir *E. coli*, assim como, Sienkiewicz et al. (2017), os quais constataram a necessidade de $0,100 \text{ mg.mL}^{-1}$.

A diferença de valores nos resultados obtidos na análise da CIM e da CBM pode ser explicada pelas variações entre os métodos de avaliação empregados, condições de cultivo dos micro-organismos, solubilidade do óleo ou de seus componentes e concentração das substâncias testadas (Opalchenova & Obreshkova, 2003).

De qualquer forma, a ação antimicrobiana do óleo essencial de cravo-da-índia foi constatada neste estudo, mesmo em concentrações mais elevadas quando comparada aos outros trabalhos, atribuindo esse potencial para ser utilizado como um agente antimicrobiano natural, inclusive em alimentos.

3.3.3 Atividade antimicrobiana em microatmosfera

Os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana em microatmosfera dos óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana do essencial de erva-doce, cravo-da-índia e orégano em microatmosfera frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Óleo essencial	Volume (μL)	<i>Escherichia coli</i> (%)*	<i>Staphylococcus aureus</i> (%)*
Erva-doce	12,5	9,1	19,7
	25	54,5	12,7
	50	72	15
	100	21	36,6
Cravo-da-índia	12,5	15,8	18,9

	25	51,7	31
	50	61,7	34
	100	70	76
Orégano	12,5	67,5	41,25
	25	6,25	60,4
	50	80	100
	100	100	58

*Percentual de redução na contagem celular (UFC) comparados com um controle contendo água estéril.

No ensaio da atividade antimicrobiana em microatmosfera, os óleos essenciais de erva-doce, cravo-da-índia e orégano se mostraram ativos frente as duas bactérias avaliadas (Tabela 5). A aplicação do óleo essencial de erva-doce nas concentrações de 50 μL e 25 μL em microatmosfera, reduziu a contagem de células bacterianas viáveis de *E. coli* em 72% e 54,5%, respectivamente. Assim como, *S. aureus* que apresentou redução de 36% em 100 μL do óleo.

A concentração de 100 μL do óleo essencial de cravo-da-índia foi capaz de promover reduções entre 70% e 76% frente as bactérias testadas. Não obstante, o menor volume de óleo adicionado (12,5 μL) resultou em diminuições de até 39%. Da mesma forma, o óleo essencial de orégano promoveu o decréscimo de 100% das contagem de células bacterianas viáveis nos volumes de 50 μL e 100 μL para *E. coli* e *S. aureus*, enquanto a concentração de 12,5 μL de diminui a contagem de células de *E. coli* em 67,5%.

Em microatmosfera, foi possível verificar a ação dos óleos essenciais de erva-doce e orégano frente a bactéria Gram-negativa *E. coli* e Gram-positiva *S. aureus*, em que o mesmo não foi possível observar nas análises anteriores por difusão em meio sólido (ágar) e líquido (caldo). Estes resultados apontam que o meio onde o óleo essencial é aplicado influencia, diretamente, na sua difusão/propagação, interferindo a sua atividade antimicrobiana.

Os autores Ghabraie et al. (2016) explicam que o caráter apolar dos óleos essenciais dificulta a sua difusão/propagação em meios com base aquosa, visto que, em microatmosfera, os constituintes antimicrobianos dos óleos essenciais entram em contato com a célula microbiana por volatilização.

3.3.4 Atividade antimicrobiana *in situ*

A análise *in situ* se procedeu com a incorporação apenas do óleo essencial de cravo-da-índia à solução filmogênica, em virtude da sua efetiva ação antimicrobiana nos ensaios *in vitro* comparada aos demais óleos essenciais avaliados neste estudo.

Os resultados referentes às médias obtidas nas contagens microbianas de Coliformes Totais e a 45°C (Termotolerantes) dos hambúrgueres submetidos a diferentes tratamentos e avaliados ao longo de 7 dias de armazenamento sob refrigeração estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e a 45°C (Termotolerantes) em hambúrgueres submetidos a diferentes tratamentos armazenados a 4°C por até 7 dias.

Tratamento	Tempo (dias)	Coliformes Totais (NMP/g)	Coliformes a 45°C (Termotolerantes) (NMP/g)
T1	0	0,94	<0,3
T2	2	<0,3	<0,3
	5	<0,3	<0,3
	7	<0,3	<0,3
T2	2	<0,3	<0,3
	5	<0,3	<0,3
	7	<0,3	<0,3
T3	2	<0,3	<0,3
	5	<0,3	<0,3
	7	<0,3	<0,3
T4	2	<0,3	<0,3
	5	<0,3	<0,3
	7	<0,3	<0,3
T5	2	<0,3	<0,3
	5	<0,3	<0,3

7	<0,3	<0,3
---	------	------

T1 – Controle (Formulação padrão do produto cárneo - FPPC); T2 – FPPC com cobertura de quitosana sem óleo essencial de cravo-da-índia; T3 – FPPC com cobertura de quitosana incorporada com óleo essencial de cravo-da-índia; T4 – FPPC com cobertura de quitosana incorporada com óleo essencial de cravo-da-índia e 50% de conservante; T5 – FPPC e 100% de conservante.

Na análise de Coliformes Totais e a 45°C (Termotolerantes) foi possível observar que todas as formulações com a presença da cobertura de quitosana sem (T2) e com (T3) a incorporação do óleo essencial de cravo-da-índia indicaram contagens <0,3 NMP/g ao longo do período de armazenamento, mantendo-se constantes. Concomitantemente, houve a redução da contagem inicial de 0,94 NMP/g de Coliformes Totais na formulação controle (T1).

Conforme os padrões exigidos pela Resolução RDC nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), produtos cárneos crus, refrigerados ou congelados devem apresentar tolerância de 5×10^3 NMP/g para Coliformes a 45°C (BRASIL, 2001). Dessa forma, os resultados obtidos indicaram que os hambúrgueres analisados estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação em vigor e aceitáveis para o consumo.

Os resultados apontam a eficiência da atuação da cobertura de quitosana adicionada de óleo essencial como um antimicrobiano natural em alimentos, pois é capaz de promover o controle da proliferação microbiana que poderia permitir a multiplicação de micro-organismos patogênicos. Comportamento similar foi verificado em coberturas formadas por quitosana (2%) e gelatina (6%) incorporadas de óleo essencial de cravo-da-índia 0,75%, que reduziram as contagens de bactérias deteriorantes em filés de bacalhau (*Gadus morhua*) durante 11 dias de armazenamento refrigerado (Gómez-Estaca et al., 2010).

As médias das quantificações de *Staphylococcus* coagulase positiva presentes na formulação de hambúrgueres submetidos a diferentes tratamentos podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7. Médias das quantificações de *Staphylococcus* coagulase positiva em hambúrgueres submetidos a diferentes tratamentos armazenados a 4°C por até 7 dias.

Tratamento	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (Log.UFC.g ⁻¹)			
	Tempo 0 (0 dias)	Tempo 1 (2 dias)	Tempo 2 (5 dias)	Tempo 3 (7 dias)
T1	4,35 ^{aA}	-	-	-
T2	-	1,13 ^{bA}	0,00 ^{bB}	0,00 ^{bB}
T3	-	1,13 ^{bA}	0,00 ^{bB}	0,00 ^{bB}
T4	-	0,00 ^{bA}	0,00 ^{bB}	0,00 ^{bB}
T5	-	0,00 ^{bA}	0,00 ^{bB}	0,00 ^{bB}

T1 – Controle (Formulação padrão do produto cárneo - FPPC); T2 – FPPC com cobertura de quitosana sem óleo essencial de cravo-da-índia; T3 – FPPC com cobertura de quitosana incorporada com óleo essencial de cravo-da-índia; T4 – FPPC com cobertura de quitosana. Letras minúsculas diferentes na linha ou maiúsculas diferentes na coluna indicam diferenças significativas (Fisher – $p \leq 0,05$).

Para o micro-organismo *Staphylococcus* coagulase positiva, os tratamentos T2 e T3, com a aplicação da cobertura, reduziram significativamente ($p \leq 0,05$) as contagens de 4,35 para 1,33 log UFC/g em comparação ao tratamento controle (T1), mantendo-se inferiores até o último tempo analisado. No entanto, não houve uma redução significativa ($p > 0,05$) no número de células viáveis entre os tempos após o segundo dia de armazenamento (Tempo 1). Os hambúrgueres elaborados com a cobertura de quitosana atenderam às exigências estabelecidas pela legislação para *Staphylococcus* coagulase positiva com contagens abaixo de 5×10^3 NMP/g (BRASIL, 2001).

Para os autores Goy, Brito, & Assis (2009), a atividade antimicrobiana da quitosana pode ser explicada por três mecanismos, tais como: a interação superficial iônica entre a quitosana e o micro-organismo, resultando em vazamento de eletrólitos e outros constituintes proteicos de baixa massa molar pela parede celular; a penetração da quitosana dentro do núcleo dos micro-organismos inibindo a síntese de RNA e proteínas; e a formação de uma barreira externa que provoca a diminuição de nutrientes essenciais para o crescimento microbiano.

Alguns autores sugerem que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais esteja relacionada à sua estrutura hidrofóbica, tendo em vista os

fosfolipídeos da membrana citoplasmática como os seus principais alvos celulares, pois facilitaria a sua difusão em meio a estrutura da membrana (Asbahani et al., 2015). Essa acumulação altera a densidade da membrana celular e, conseqüentemente, a permeabilidade, ocasionando a perda gradativa de componentes celulares vitais para o meio externo (Burt, 2004; Rai et al., 2017).

A análise *in situ* demonstrou a potencial aplicação do óleo essencial de cravo-da-índia incorporado à cobertura de quitosana como antimicrobiano natural em hambúrgueres durante o armazenamento, visto que promoveu o controle microbiológico igualmente aos tratamentos com a aplicação do conservante químico.

3.3.5 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada pela avaliação de hambúrguer bovino com aplicação de cobertura de quitosana incorporada com óleo essencial de cravo-da-índia.

Foi solicitado que na amostra os atributos cor (gostei muitíssimo a desgostei muitíssimo), odor (gostei muitíssimo a desgostei muitíssimo), textura (gostei muitíssimo a desgostei muitíssimo), sabor (gostei muitíssimo a desgostei muitíssimo) e impressão global, pontuando-os com base na escala hedônica de nove pontos.

Participaram da análise 52 avaliadores, em que 71% se enquadraram no gênero feminino e 29% no masculino, sendo a maioria (86,5%) com idade entre 20 a 55 anos, seguido de 11,5% menores de 19 anos e 2% acima de 56 anos. Quando questionados sobre o grau de escolaridade, os entrevistados declararam ter ensino superior (61,5%), ensino médio (27%) e pós-graduação (11,5%). Os avaliadores também foram questionados sobre já terem consumido ou consumir hambúrguer de carne bovina e, para essa resposta, 100% dos avaliadores responderam já terem consumido.

Na Figura 4 está apresentado o histograma com as distribuições percentuais para a amostra de hambúrguer bovino com aplicação de cobertura de quitosana incorporada com óleo essencial de cravo-da-índia sobre os atributos cor, odor, textura, sabor e impressão global.

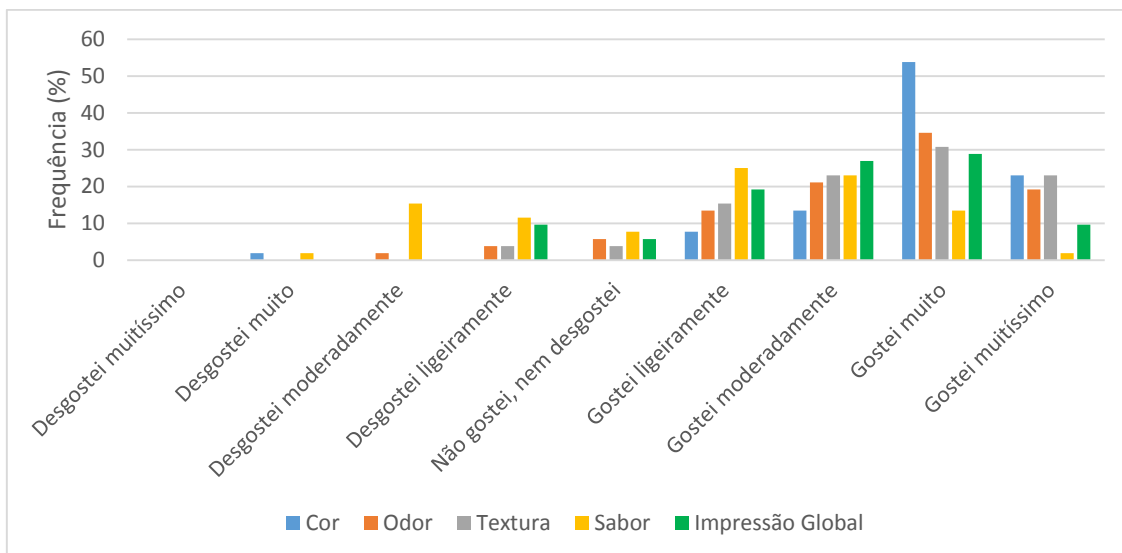


Figura 4. Frequência de respostas (%) obtidas para o teste de aceitação da amostra de hambúrguer com cobertura de quitosana incorporada com óleo essencial de cravo-da-índia.

De acordo com a Figura 4, um alto percentual de respostas positivas (gostei ligeiramente a gostei muitíssimo) foram obtidos para os atributos cor (98,1%), odor (88,4%) e textura (91,4%), recebendo destaque a elevada ocorrência de respostas no termo da escala “gostei muito” sobre o parâmetro cor (53,9%). Estes fatos podem ser explicados por comentários observados nas fichas de avaliação como: “muito agradável”, “textura maravilhosa e cor também”, “gostei muito” e “poderia consumir mais”. Ainda sobre a amostra, destaca-se um importante valor para o atributo impressão global (84,6%) entre “gostei ligeiramente a gostei muito”.

No entanto, o atributo sabor teve uma menor frequência de respostas positivas (63%), em que foi possível observar nas fichas de avaliação comentários como: “sabor de cravo muito acentuado” e “o sabor do cravo ficou bem evidente”.

O Índice de Aceitabilidade (IA) do produto, utilizando o atributo impressão global como referência, obteve valor de 62,1%. Na Figura 5 estão apresentados os resultados obtidos para análise de intenção de compra de hambúrguer com aplicação de cobertura incorporada com óleo essencial de cravo-da-índia. A frequência de respostas positivas para a compra do produto foi de 38,5%, seguida de pessoas que talvez comprassem ou talvez não comprassem (38,4%) e 23,1% para demonstrações de intenção de não comprar o produto.

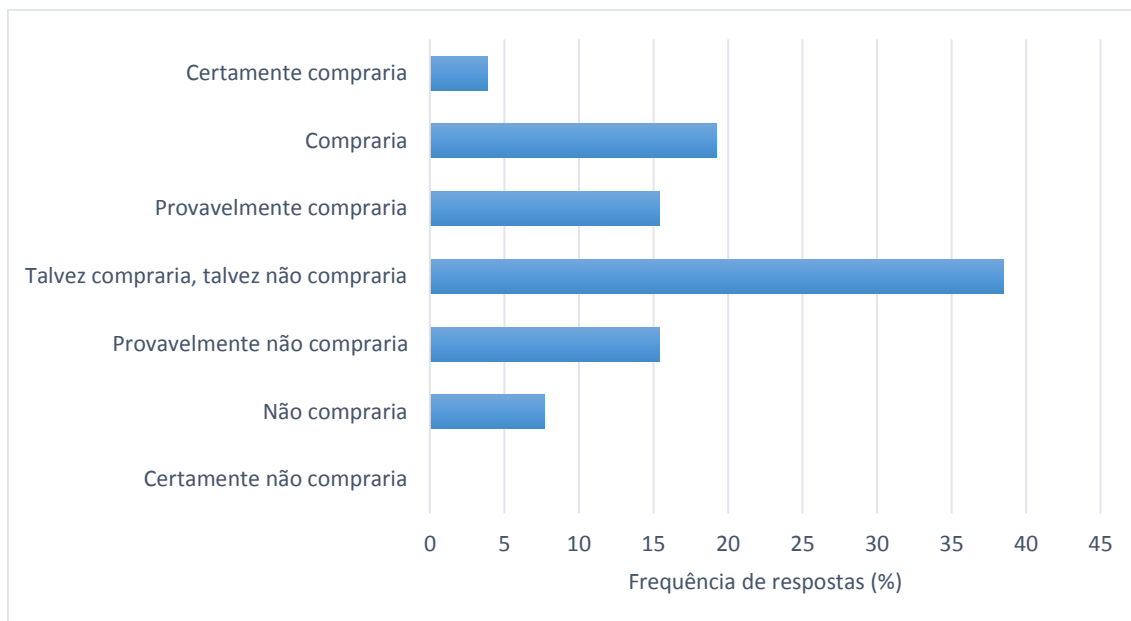


Figura 5. Frequência de resposta (%) obtidas para o teste de intenção de compra da amostra de hambúrguer com cobertura de quitosana incorporada com óleo essencial de cravo-da-índia.

A intenção de compra fez com que fossem avaliados, criteriosamente, os comentários nas fichas de avaliação e, assim, foi possível verificar que a melhora do produto está relacionada ao sabor, pois na maioria dos comentários foi classificado como forte, em virtude da presença do óleo essencial.

Embora os óleos essenciais tenham suas ações antimicrobianas documentadas, uma das maiores limitações ao seu uso como conservante nos alimentos é a atribuição de indesejáveis interferências nas características sensoriais dos produtos (Dannenberg et al., 2016; Ghabraie et al., 2016). Como na presente pesquisa o óleo não foi incorporado diretamente na matriz do alimento, mas sim nas coberturas, esperava-se que esse efeito estivesse menos pronunciado.

5. Conclusão

Diante dos resultados encontrados no presente estudo, pode-se concluir que entre os óleos essenciais analisados, o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou efetiva atividade antimicrobiana *in vitro* frente *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Nos hambúrgueres avaliados, as coberturas de quitosana incorporadas com o óleo essencial se mostraram capazes de promover o controle da proliferação microbiana de Coliformes Totais,

Termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva ao longo de 7 dias de armazenamento sob refrigeração, verificando o seu potencial para ser utilizado como alternativa na substituição aos conservantes químicos sintéticos para aplicação em alimentos.

6. Referências

- Amariei, S., Poroach-Seritan, M., Gutt, G., Oroian, M., & Ciornei, E. (2018). Rosemary, thyme and oregano essential oils influence on physicochemical properties and microbiological stability of minced meat. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6(1), 670-676. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.6.1.670-676>
- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 113-126. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00012-7)
- Arora, D. S., & Kaur, J. (1999). Antimicrobial activity of spices. *International Journal of Antimicrobials Agents*, 12(3), 257-262. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00074-6](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00074-6)
- Asbahani, a El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., ... Elaissari, a. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Bakkali, F., Averbeck, S., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Barros Gomes, P. R., Mouchrek Filho, V. E., Ferreira Rabêlo, W., Albuquerque do Nascimento, A., Costa Louzeiro, H., Da Silva Lyra, W., & Alves Fontenele, M. (2018). Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 47(1), 37-52. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v47n1.70657>
- Béjaoui, A., Chaabane, H., Jemli, M., Boulila, A., & Boussaid, M. (2013). Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at Different Phenological Stages. *Journal of Medicinal Food*, 16(12), 1115-1120. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0079>
- Beraldo, C., Daneluzzi, N. S., Scanavacca, J., Doyama, J. T., Fernandes Júnior, A., & Moritz, C. M. F. (2013). Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 43(4), 436-440. <https://doi.org/10.1590/S1983-40632013000400006>

Borges, A. M., Pereira, J., Cardoso, M. G., Alves, J. A., & Lucena, E. M. P. (2012). Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14(4), 656–665. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000400013>

BRASIL (2010) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, 2, 546p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 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, 02 de jan. 2001.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253. [10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022)

Cabral, I. S. R., Prado, A., Bezerra, R. M. N., Alencar, S. M., Ikegaki, M., & Rosalen, P. L. (2009). Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*, 32 (6), 1523-1527. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600031>

Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015a). Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems— A Review. *Food Control*, 54, 111–119. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>

CLSI. (2015). M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. *CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)*, 35 (1).

Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78, 90–103. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.035>

Couto, C., Raposo, N., Rozental, S., Borba-Santos, L., Bezerra, L., De Almeida, P., & Brandão, M. (2015). Chemical Composition and Antifungal Properties of Essential Oil of *Origanum vulgare* Linnaeus (Lamiaceae) against *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14(7), 1207. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v14i7.12>

Costa, A. R., Amaral, M. F. Z., Martins, P., Paula, J. A., Fiuza, T., Tresvenzol, L. M., ... Bara, M. T. (2011). Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13(2), 240–245. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000200018>

- Cutter, C. N. (2000). Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection*, 63(5), 601–607. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.5.601>
- Dannenber, G. da S., Funck, G. D., Mattei, F. J., Silva, W. P. da, & Fiorentini Â. M. (2016). Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in vitro and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Food Science and Emerging Technologies*, 36, 120–127. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.009>
- Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., & Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.025>
- Djenane, D., Yangüela, J., Amrouche, T., Boubrit, S., Boussad, N., & Roncalés, P. (2011). Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. *Food Science and Technology International = Ciencia Y Tecnología De Los Alimentos Internacional*, 17(6), 505–515. <https://doi.org/10.1177/1082013211398803>
- Downes, F. P., & Ito, H. (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: American Public Health Association (APHA), 4, 676p.
- Ghabraie, M., Vu, K. D., Tata, L., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2016). Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 332–339. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.055>
- Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2), 374–381. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>
- Gómez-estaca, J., López De Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, London, 27(7), 889–896. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.012>
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4), 982–989. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.058>
- Goy, R. C.; Britto, D.; Assis, O. B. G. A (2009). Review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 19(3), 241–47. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>

- Hashemi, S. M. B., & Mousavi Khaneghah, A. (2017). Characterization of novel basil-seed gum active edible films and coatings containing oregano essential oil. *Progress in Organic Coatings*, 110, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2017.04.041>
- Hayouni, E. A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J.-Y., Mohammed, H., & Hamdi, M. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 125(3), 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.005>
- He, S., Yang, Q., Ren, X., Zi, J., Lu, S., Wang, S., ... Wang, Y. (2014). Antimicrobial Efficiency of Chitosan Solutions and Coatings Incorporated with Clove Oil and/or Ethylenediaminetetraacetate. *Journal of Food Safety*, 34(4), 345–352. <https://doi.org/10.1111/jfs.12134>
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Farahmandghavi, F. (2015). Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Industrial Crops and Products*, 67, 403–413. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.062>
- Hussein, H. A., Abaas, I. S., & Ali, R. H. (2014). Antibacterial Activities of Cinnamon *Zelanicum Syzygium Aromaticum* Essential Oil. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(5), 165-168.
- Ivanovic, J., Dimitrijevic-Brankovic, S., Misic, D., Ristic, M., & Zizovic, I. (2013). Evaluation and improvement of antioxidant and antibacterial activities of supercritical extracts from clove buds. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.11.014>
- Khalil, N., Ashour, M., Fikry, S., Singab, A. N., & Salama, O. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of selected Apiaceous fruits. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 88–92. <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2017.10.004>
- Kurita, K. (2006). Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8(3), 203-226. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-0097-5>
- Lu, F., Ding, Y., Ye, X., & Ding, Y. (2011). Antibacterial Effect of Cinnamon Oil Combined with Thyme or Clove Oil. *Agricultural Sciences in China*, 10(9), 1482–1487. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(11\)60142-9](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(11)60142-9)
- Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Aparnathi, K. D., & Prajapati, J. B. (2016). Essential Oils of Herbs and Spices: Their Antimicrobial Activity and Application in Preservation of Food. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(5), 885–901. <http://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.505.092>
- Meilgaard, M., Civile, G. V., & Carr, B. T. (1991). Sensory evaluation techniques, 2, 354p.

Moradi, M., Tajik, H., Rohani, S. M. R., & Oromiehie, A. R. (2011). Effectiveness of *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract impregnated chitosan film on ready-to-eat mortadella-type sausages during refrigerated storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91 (15), 2850-2857. <http://doi.org/10.1002/jsfa.4531>

Oliveira, T. L. C. de, Cardoso, M. das G., Soares, R. de A., Ramos, E. M., Piccoli, R. H., & Tebaldi, V. M. R. (2013). Inhibitory activity of *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. essential oils against *Listeria monocytogenes* inoculated in bovine ground meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 357–365. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000040>

Opalchenova, G., & Obreshkova, D. (2003). Comparative studies on the activity of basil—an essential oil from *Ocimum basilicum* L.—against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. *Journal of Microbiological Methods*, 54(1), 105–110. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00012-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00012-5)

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. Comunicado de prensa del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer sobre el Cáncer evalúa el consumo de la carne roja y de la carne processada. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/cancer-red-meat/es/>. Acesso em 13 de dezembro de 2016.

Pereira, A. de A., Cardoso, M. das G., Abreu, L. R. de, Morais, A. R. de, Guimarães, L. G. de L., & Salgado, A. P. S. P. (2008). Chemical characterization and inhibitory effect of essential oils on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Ciência e Agrotecnologia*, 32(3), 887–893. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000300028>

Pino, O., Sánchez, Y., Rojas, M. M., Abreu, Y., & Correa, T. M. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L., 27(3), 7.

Pradebon Brondani, L., Alves da Silva Neto, T., Antonio Freitag, R., & Guerra Lund, R. (2018). Evaluation of anti-enzyme properties of *Origanum vulgare* essential oil against oral *Candida albicans*. *Journal de Mycologie Médicale*, 28(1), 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.001>

Radaelli, M., da Silva, B. P., Weidlich, L., Hoehne, L., Flach, A., da Costa, L. A. M. A., & Ethur, E. M. (2016). Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 424–430. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.10.001>

Rai, M., Paralikar, P., Jogee, P., Agarkar, G., Ingle, A. P., Derita, M., & Zacchino, S. (2017). Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*, 519(1–2), 67–78. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.013>

Saeed, A., & Shahwar, D. (2015). Evaluation of biological activities of the essential oil and major component of *Syzygium aromaticum*. *J. Anim. Plant Sci.*, 25(4), 1095–1099.

Samojlik, I., Petković, S., Stilinović, N., Vukmirović, S., Mijatović, V., & Božin, B. (2016). Pharmacokinetic Herb-Drug Interaction between Essential Oil of Aniseed (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae) and Acetaminophen and Caffeine: A Potential Risk for Clinical Practice: Aniseed essential oil changes acetaminophen and caffeine kinetics. *Phytotherapy Research*, 30(2), 253–259. <https://doi.org/10.1002/ptr.5523>

Santos, J. C., Filho, C. D. C., Barros, T. F., & Guimarães, A. G. (2011). In vitro antimicrobial activity of essential oils from oregano, garlic, clove and lemon against pathogenic bacteria isolated from *Anomalocardia brasiliana*. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 32(4), 1557-1564. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4p1557>

Santos, C. H. S., Piccoli, R. H., & Tebaldi, V. M. R. (2017) Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, 76, 1719. <http://doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4p1557>

Scopel, R.; Falcão, M. A., Lucas, A. M. Almeida, R. N., Gandolfi, P. H. K., Cassel, E., & Vargas, R. M. F. (2014). Supercritical fluid extraction from *Syzygium aromaticum* buds: Phase equilibrium, mathematical modeling and antimicrobial activity. *Journal of Supercritical Fluids*, 92, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.06.003>

Sienkiewicz, M., Łysakowska, M., Kowalczyk, E., Szymańska, G., Kochan, E., Krukowska, J., Olszewski, J., & Zielińska-Bliźniewska, H. (2017). The ability of selected plant essential oils to enhance the action of recommended antibiotics against pathogenic wound bacteria. *Burns*, 43(2), 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.08.032>

Silva, A. A. da, Anjos, M. M. dos, Ruiz, S. P., Panice, L. B., Mikcha, J. M. G., Junior, M. M., & Filho, B. A. de A. (2015). AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Thimus vulgaris* (TOMILHO), *Syzygium aromaticum* (CRAVO-DA-ÍNDIA) E *Rosmarinus officinalis* (ALECRIM) E DOS CONSERVANTES BENZOATO DE SÓDIO E SORBATO DE POTÁSSIO EM *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus*. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 33(1). <https://doi.org/10.5380/cep.v33i1.43814>

Silvestri, J. D. F., Paroul, N., Czyewski, E., Lerin, L., Rotava, I., Cansian, R. L., Mossi, A., Toniazzo, G., Oliveira, D., & Treiche, H. (2010). Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Revista Ceres*, 57 (5), 589-594. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2010000500004>

Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curity and examining the risk/benefits of its use. *American Meat Science Association*, 3, 2011.

Stanojević, L. P., Stanojević, J. S., Cvetković, D. J., & Ilić, D. P. (2018). Antioxidant activity of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.). *Biologica Nyssana*, 7(2). Retrieved from <http://journal.pmf.ni.ac.rs/bionys/index.php/bionys/article/view/160>

Tepe, B., Akpulat, H. A., Sokmen, M., Daferera, D., Yumrutas, O., Aydin, E., ... Sokmen, A. (2006). Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chemistry*, 97(4), 719–724. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.045>

Terra, N. N. (2005). *Apontamentos em Tecnologia de Carnes*. São Leopoldo: Editora da Universidade do Vale do Rio dos Sinos, 216p.

Trajano, V. N., Lima, E. O., Souza, E. L., & Travassos, A. E. R. (2009). Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(3), 542-545. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000300014>

Vasile, C., Sivertsvik, M., Miteluț, A., Brebu, M., Stoleru, E., Rosnes, J., ... Popa, M. (2017). Comparative Analysis of the Composition and Active Property Evaluation of Certain Essential Oils to Assess their Potential Applications in Active Food Packaging. *Materials*, 10(1), 45. <https://doi.org/10.3390/ma10010045>

Xu, J.-G., Liu, T., Hu, Q.-P., & Cao, X.-M. (2016). Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil from Clove Buds against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 21(9), 1194. <https://doi.org/10.3390/molecules21091194>

Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, X., Cao, P., Wei, S., & Lu, Y. (2017). Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry (clove) leaf against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Microbial Pathogenesis*, 113, 396–402. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.054>

Wu, J., Ge, S., Liu, H., Wang, S., Chen, S., Wang, J., ... Zhang, Q. (2014). Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. *Food Packaging and Shelf Life*, 2(1), 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.04.004>

8 Considerações Finais

O trabalho realizado possibilitou verificar que o óleo essencial de erva-doce apresentou um rendimento de 2,5%, o do cravo-da-índia 1% e o do orégano 0,97%.

O óleo essencial de erva-doce apresentou como principal constituinte o componente anetol, o óleo essencial de cravo-da-índia o eugenol, sendo o principal responsável pela atividade antimicrobiana, e o óleo essencial de orégano o composto 4-terpineol.

No teste *in vitro*, o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou efeito inibitório frente *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e bactericida frente as bactérias testadas nas concentrações 374,33 mg.mL⁻¹.

Em fase de vapor (microatmosfera), o óleo essencial de erva-doce promoveu reduções de até 72% no desenvolvimento de *E. coli* e 36,6% para *S. aureus*, do mesmo modo, o óleo essencial de cravo-da-índia proporcionou reduções em até 70% frente todas as bactérias analisadas. Além do mais, o óleo essencial de orégano propiciou diminuições de até 100% no desenvolvimento das bactérias testadas.

Quando avaliada a aplicação *in situ*, a incorporação do óleo essencial de cravo-da-índia em coberturas bioativas a base de quitosana foi eficaz na redução do crescimento de Coliformes Totais, Termotolerantes e *Staphylococcus coagulase positiva* em hambúrgueres ao longo dos 7 dias de armazenamento sob refrigeração, demonstrando possibilidade de aplicação como coberturas comestíveis para produtos cárneos.

Sensorialmente, os hambúrgueres revestidos com cobertura de quitosana incorporada de óleo essencial de cravo-da-índia receberam uma classificação positiva dos avaliadores para os atributos cor, odor e textura, ganhando destaque a elevada ocorrência de respostas no termo da escala “gostei muito” sobre o parâmetro cor. No entanto, o sabor acentuado do óleo essencial nos hambúrgueres ocasionou na diminuição do Índice de Aceitabilidade do produto, apresentando o valor de 62,1%.

Referências

ABDOLLAHZADEH, E.; REZAEI, M.; HOSSEINI, H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 177–183, jan. 2014.

AFFONSO, R. S. et al. Quantification and Characterization of the Main Components of the Ethanolic Extract of Indian Cloves, *Syzygium aromaticum* [I] Merr. et Perry. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, 2014.

AL-BAYATI, F. A. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 403–406, 28 mar. 2008.

ALINKINA, E. S.; MISHARINA, T. A.; FATKULLINA, L. D. Antiradical properties of oregano, thyme, and savory essential oils. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 73-78, 2013.

ALMA, M.H.; ERTAS, M.; NITZ, S.; KOLLMANNSBERGER, H. Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.). **BioResources**, v. 2, n.2, p.265-269, 2007.

ALMEIDA, T. L. **Desenvolvimento de membrana de quitosana composta de PVAI e quitosana compatível com sistema dermoepidérmico**. Dissertação (Mestrado em Ciências em Tecnologia Nuclear) – Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo – SP, 2009.

AMARIEI, S. et al. ROSEMARY, THYME AND OREGANO ESSENTIAL OILS INFLUENCE ON PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND MICROBIOLOGICAL STABILITY OF MINCED MEAT. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 8, n. 2, p. 670–676, 10 jan. 2018.

ARAÚJO, M. M. DE; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, n. 0, 2016.

ARHAM, R.; MULYATI, M. T.; METUSALACH, M.; SALENGKE, S. Physical and mechanical properties of agar based edible film with glycerol plasticizer. **International Food Research Journal**, v. 4, p.1669-1675, 2016.

ASCENÇÃO, V. L.; FILHO, V. E. M. SENTIAL OIL *Syzygium aromaticum* (CLOVE). v. 20, p. 8, 2013.

ASENSIO, C. M. et al. Antioxidant Stability Study of Oregano Essential Oil Microcapsules Prepared by Spray-Drying. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 12, p. 2864–2872, dez. 2017.

AŞIK, E.; CANDOĞAN, K. Effects of Chitosan Coatings Incorporated with Garlic Oil on Quality Characteristics of Shrimp: Chitosan Coatings with Garlic Oil on Shrimp. **Journal of Food Quality**, v. 37, n. 4, p. 237–246, ago. 2014.

ASSIS, L. M. DE et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais 2164 aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2165 2, p. 99–109, 2012.

ATHAYDE, A. A. A. avaliação da aplicação combinada de quitosana e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* DC. Ex Nees para controle pós-colheita de *Rhizopus stolonifer* em tomates. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco – PE, 2015.

AUMEERUDDY-ELALFI, Z.; GURIB-FAKIM, A.; MAHOMOODALLY, F. Antimicrobial, antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of Mauritius. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 197–204, 1 set. 2015.

BAÇZEK, K. B. et al. Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 102, p. 154–163, 1 ago. 2017.

BADGUJAR, S. B.; PATEL, V. V.; BANDIVDEKAR, A. H. *Foeniculum vulgare* Mill: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–32, 2014.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, fev. 2008.

BALLESTER-COSTA, C.; SENDRA, E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; VIUDA-MARTOS, M. Evaluation of the antibacterial and antioxidant actives of chitosan edible films incorporated with organic essential oils obtained from four *Thymus* species. **Journal of Food Science and Technology**, v.53, p.3374-3379. 2016.

BARANAUSKIENĖ, R. et al. Harvesting time influences the yield and oil composition of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* and ssp. *hirtum*. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 43–51, ago. 2013.

BARBOSA, M. M. C. et al. Sorologia e suscetibilidade antimicrobiana em isolados de *Escherichia coli* de pesque-pagues. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 43–48, mar. 2014.

BASSANETTI, I. et al. Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives. **Food Control**, v. 73, p. 606–612, 1 mar. 2017.

BAYDAR, H. et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 3, p. 169–172, 1 abr. 2004.

BAZARGANI-GILANI, B.; ALIAKBARLU, J.; TAJIK, H. Influence of Coating Based on Pomegranate Juice-Chitosan- *Zataria multiflora* Oil on Chemical Stability of Chicken Meat during Frozen Storage: Pomegranate Juice, Chitosan and Chicken Meat. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 40, n. 2, p. 192–201, abr. 2016.

BERALDO, C. et al. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 4, p. 436–440, dez. 2013.

BESHARATI-SEIDANI, A.; JABBARI, A.; YAMINI, Y. Headspace solvent microextraction: a very rapid method for identification of volatile components of Iranian Pimpinella anisum seed. *Anal. Chim. Acta.*, v. 530, p. 155-161, 2005.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 1 ago. 2004.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 1 ago. 2015.

CAMPOS, M. R. H., et al. Caracterização Fenotípica pelo Antibiograma de Cepas de *Escherichia coli* Isoladas de Manipuladores, de Leite Cru e de Queijo —Minas Frescall em um Laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1221-1227, 2006.

CARVALHO, L.M. *Foeniculum vulgare* Mill. ou *Pimpinella anisum* L.? Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2007. Disponível em: Acesso em: 01 de agosto de 2018.

CELIK TAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 553–559, 1 jan. 2007.

CHAI EB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 6, p. 501–506, jun. 2007.

CHAMORRO, S. A. V.; PALOU, L.; RIO, M. A. D.; GAGO, M. B. P. Critical Reviews, Antimicrobial Edible Films and Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables. **Food Science and Nutrition**, n. 51, p. 872-900, 2011.

CHOI, W. S.; SINGH, S.; LEE, Y. S. Characterization of edible film containing essential oils in hydroxypropyl methylcellulose and its effect on quality attributes of 'Formosa' plum (*Prunus salicina* L.) Woo Suk Choi, Suman Singh, Youn Suk Lee. **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 213-222, 2016.

COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 2228-2237, 2000.

DADALIOGLU, I.; EVRENDILEK, G. A. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8255–8260, 29 dez. 2004.

DANG, K. M.; YOKSAN, R. Development of thermoplastic starch blown film by incorporating plasticized chitosan. **Carbohydrate Polymers**. v. 155, p. 575-581, 2015.

DANNENBERG, G. DA S. et al. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 314–318, 1 ago. 2017.

DANTAS, L. I. S. et al. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis schauer* sobre patógenos de importância na indústria de alimentos. **HOLOS**, v. 5, n. 0, p. 114, 14 mar. 2011.

DAS, D. K.; DUTTA, H.; MAHANTA, C. L. Development of a rice starch-based coating with antioxidant and microbe-barrier properties and study of its effect on tomatoes stored at room temperature. **LWT-Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 272-278, Jan 2013.

DEMITRI, C. et al. Nanostructured active chitosan-based films for food packaging applications: Effect of graphene stacks on mechanical properties. **Measurement**, v. 90, p. 418–423, 1 ago. 2016.

DIAO, W.-R. et al. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 109–116, jan. 2014.

DIMA, C.; DIMA, S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 29–35, out. 2015.

DJENANE, D.; YANGÜELA, J.; AMROUCHE, T.; BOUBRIT, S.; BOUSSAD, N.; RONCALÉS, P. Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. **Food Science and Technology International = Ciencia Y Tecnologia De Los Alimentos Internacional**, v. 17, n. 6, p. 505–515, dez. 2011.

EI ABED, N. et al. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Thymus capitata* Essential Oil with Its Preservative Effect against *Listeria monocytogenes* Inoculated in Minced Beef Meat. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-11, 2014.

ELGAYYAR, M. et al. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 7, p. 1019–1024, jul. 2001.

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial names with Standing in Nomenclature. 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 28 set. 2018.

FAI, A. E. C. et al. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. p. 17, 2008.

FAI, A. E. C., et al. *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. **Ciência saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v.16, n.2, 2011.

FARROKH, C. et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 190–212, 15 mar. 2013.

FRIEDMAN, M. Chemistry and Multibeneficial Bioactivities of Carvacrol (4-Isopropyl-2-methylphenol), a Component of Essential Oils Produced by Aromatic Plants and Spices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 31, p. 7652–7670, 6 ago. 2014.

FERNÁNDEZ-PAN, I. et al. Effect of chitosan molecular weight on the antimicrobial activity and release rate of carvacrol-enriched films. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 60–68, 1 out. 2015.

FERREIRA, S. R. S.; VALCAREGGI, S. A. A.; HENSE, H. Subprodutos com importância tecnológicas provenientes do resíduo de crustáceos e suas aplicações. **Tecnologia para Competitividade Industrial**, Florianópolis. v. 9, n. 2, p. 117- 134, 2016.

FIGUEIREDO, A. C.; MIGUEL, M. G. Aromatic plants, spices and volatiles in food and beverages. **Flavour and Fragrance Journal**, v.25, p.251-252, 2010.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2010, v. 2, 606 p.

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

GALUS, S.; KADZIŃSKA, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. **Trends in Food Science & Technology**, 45(2), 273-283.

GIATRAKOU, V.; NTZIMANI, A.; SAVVAIDIS, I. N. Effect of chitosan and thyme oil on a ready to cook chicken product. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 132–136, fev. 2010.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. Barueri: Manole, 2008.

GHEDIRA, K.; GOETZ, P.; LE JEUNE, R. Matière médicale pratique. **Phytothérapie**, v. 10, n. 1, p. 38–43, fev. 2012.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, abr. 2007.

GOMES, R. V. **Imobilização de esporos de *Bacillus subtilis* em esferas de quitosana obtida de quitina de camarão para o uso na biodegradação de hidrocarbonetos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2007.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 889–896, out. 2010.

GOÑI, P. et al. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of 2268 cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 982–2269 989, 2009.

GOVARIS, A. et al. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2–3, p. 175–180, 28 fev. 2010.

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 3, p.241-47, 2009.

GRONDONA, E. et al. Bio-efficacy of the essential oil of oregano (*Origanum vulgare* Lamiaceae. Ssp. *Hirtum*). **Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)**, v. 69, n. 4, p. 351–357, dez. 2014.

HAMED, I.; ÖZOGUL, F.; REGENSTEIN, J. M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 40–50, 1 fev. 2016.

HAYOUNI, E. A. et al. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p. 242–251, 2008.

HE, S. et al. Antimicrobial Efficiency of Chitosan Solutions and Coatings Incorporated with Clove Oil and/or Ethylenediaminetetraacetate. **Journal of Food Safety**, v. 34, n. 4, p. 345–352, 1 nov. 2014.

HENNEKINNE, J.-A.; DE BUYSER, M.-L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 815–836, jul. 2012.

HOSSEINI, S. F. Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. **Industrial crops and products**, v. v. 67, p. 403–413, maio 2015.

HOSEINI, M. H. M.; MORADI, M.; ALIMOHAMMADIAN, M. H.; SHAHGOLI, V. K.; DARABI, H.; ROSTAMI, A. Immunotherapeutic effects of chitin in comparison in with chitosan against *Leishmania major* infection. **Parasitology International**. v. 65, p. 99-104, 2016.

HUSSEIN, H. A.; ABAAS, I. S.; ALI, R. H. Antibacterial activities of cinnamon *zelanicum syzygium aromaticum* essential oil. v. 6, n. 5, p. 4, 2014.

IOS. Aromatic natural raw materials - vocabulary. **International Standard Organization (IOS 9235:2013)**, p. 14, 2013.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. Eugenol--from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 6, p. 6953–6981, 6 jun. 2012.

KHANJARI, A.; KARABAGIAS, I.; KONTOMINAS, M. Combined effect of N,O-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat fillets. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, p. 94–99, 1 set. 2013.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; KU, D. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). **Acta Pharm.**, p. 9, 2005.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 8, n. 3, p. 203–226, jun. 2006.

LEKJING, S. A chitosan-based coating with or without clove oil extends the shelf life of cooked pork sausages in refrigerated storage. **Meat Science**, v. 111, p. 192–197, jan. 2016.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, n. 55, p. 645–659, 2006.

LOIR, Y. L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v.2, p.63-76, 2003.

LÓPEZ, P. et al. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 17, p. 6939–6946, 24 ago. 2005.

Lorenzi, H.; Matos, F. J. A. 2008. **Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum.

MACWAN, S. R. et al. Essential Oils of Herbs and Spices: Their Antimicrobial Activity and Application in Preservation of Food. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 885–901, 15 maio 2016.

MACHADO SANTOS, J.; DE MELLO PEREIRA ABRANTES, S. Presença de matérias estranhas em erva-doce, *Pimpinella anisum* L. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 3, 28 set. 2015.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: antioxidantes naturais da família lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.

OJAGH, S. M.; REZAEI, M.; RAZAVI, S. H.; HOSSEINI, S. M. H. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 193–198, 1 maio 2010.

OLIVEIRA, A. C. DE et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

Organização Mundial da Saúde – OMS. Comunicado de prensa del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer sobre el Cáncer evalúa el consumo de la carne roja y de la carne processada. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/cancer-red-meat/es/>. Accessed 31/08/18.

ORDÓÑEZ, A. J. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de origem animal, volume 2**. São Paulo: Artmed, 2005.

OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial Effects of Alginate-Based Films Containing Essential Oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* Present in Bologna and Ham. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 4, p. 901–908, abr. 2007.

ÖZEL, A. Anise (*Pimpinella anisum*): Changes in yields and component composition on harvesting at different stages of plant maturity, *Expl Agric.*, v. 45, p. 117-126, 2008.

PAGNO, C. H. **Efeito da Adição de Nanoestruturas, Óleos Essenciais e Quitosana no Desenvolvimento de Filmes e Coberturas Biodegradáveis com Propriedades Antioxidantes e Antimicrobianas**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – RS, 2016.

PAGNO, C. H. et al. Physical and antimicrobial properties of quinoa flour-based films incorporated with essential oil. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 16, 20 abr. 2016.

PAPAGEORGIU, V.; MALLOUCHOS, A.; KOMAITIS, M. Investigation of the antioxidant behavior of air- and freeze-dried aromatic plant materials in relation to their phenolic content and vegetative cycle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 5743- 5752, 2008.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, v. 76, p. 174–187, 2015.

PERES, N. D. et al. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n.4, 2010.

PESAVENTO, G. et al. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*, v. 54, p. 188–199, ago. 2015.

PETERSSON, M.; STADING, M. Water vapour permeability and mechanical properties of mixed starch-monoglyceride films and effect of film forming conditions. *Food Hydrocolloids*, v. 19, n. 1, p. 123-132, Jan 2005.

PETROU, S.; TSIRAKI, M.; GIATRAKOU, V.; SAVVAIDIS, I. N. Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. *International Journal of Food Microbiology*, v. 156, n. 3, p. 264–271, 1 jun. 2012.

PIRES, P.; DELGADO, F.M.G. (2013) - Orégão-vulgar (*Origanum vulgare* L.): uma revisão. *Agroforum: Revista da Escola Superior Agrária de Castelo Branco*. Ano 21:31, p. 17-21. PÉREZ G, S. et al. Anti-inflammatory Activity of Some Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research*, v. 23, n. 5, p. 38–44, 1 set. 2011.

PONTELLO, M. et al. *Listeria monocytogenes* serotypes in human infections (Italy, 2000-2010). *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita*, v. 48, n. 2, p. 146–150, 2012.

PUERTAS-MEJÍA, M. et al. *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil: *IN VITRO* SCAVENGING ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM COLUMBIAN PLANTS. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 17, n. 5, p. 380–384, set. 2002.

RAI, M.; PARALIKAR, P.; JOGEE, P.; AGARKAR, G.; INGLE, A. P.; DERITA, M.; ZACCHINO, S. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 519, n. 1, p. 67–78, 15 mar. 2017.

RAMADAN, M. F.; ASKER, M. M. S.; TADROS, M. Lipid profile, antiradical power and antimicrobial properties of *Syzygium aromaticum* oil. *Grasas y Aceites*, v. 64, n. 5, p. 509–520, 2013.

RAMOS, et al. **Antimicrobianos em Ginecologia e Obstetrícia**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

REGUA-MANGIA, A. H., et al. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC): Filotipagem e Resistência a Antimicrobianos em um Enteropatógeno Emergente. **Revista Patologia Tropical**, v. 38, n.1, 2009.

RIBEIRO, M. G., et al. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Belo Horizonte, v.58, n.5, 2006.

RIVAS, M. et al. Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections in Children, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 763-771, 2008.

ROBBERS, J. E. Farmacognisia e farmacobiocologia. São Paulo: Editora Premier, 1997.

RODRIGUES, V. M. et al. Supercritical Extraction of Essential Oil from Aniseed (*Pimpinella anisum* L) Using CO₂: Solubility, Kinetics, and Composition Data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1518–1523, mar. 2003.

SÁNCHEZ-ORTEGA, I. et al. Antimicrobial Edible Films and Coatings for Meat and Meat Products Preservation. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–18, 2014.

SANTANA, E. H. W. et al. Estafilococos em Alimentos. **Arquivos do Instituto de Biologia**. v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SANTIN, R. et al. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 367–373, abr. 2014.

SANTOS, A. S. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. p. 6, 2004.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

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**, v. 32, n. 4, p. 1537–1564, 19 out. 2011.

SCHMID, B. et al. Role of Cold Shock Proteins in Growth of *Listeria monocytogenes* under Cold and Osmotic Stress Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1621–1627, 15 mar. 2009.

SCOPEL, R. et al. Supercritical fluid extraction from *Syzygium aromaticum* buds: Phase equilibrium, mathematical modeling and antimicrobial activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 223–230, 1 ago. 2014.

SENATORE, F. et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of anethole-rich oil from leaves of selected varieties of fennel [*Foeniculum vulgare* Mill. ssp. *vulgare* var. *azoricum* (Mill.) Thell]. **Fitoterapia**, v. 90, p. 214–219, out. 2013.

SHOJAI, A.; ABDOLLAHI FARD, M. Review of Pharmacological Properties and Chemical Constituents of *Pimpinella anisum*. **ISRN pharmaceutics**, v. 2012, p. 510795, 2012.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S.; DA CRUZ, A. L.; MENDES, J. C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de Agar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, n.90, p. 124-128, 2009.

SILVEIRA, S. M. DA et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1300–1306, jul. 2012.

SILVESTRI, J. D. F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, n. 5, p. 589–594, out. 2010.

SIMEÃO DO CARMO, L. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 9–14, 1 fev. 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SINGLETARY, K. Oregano: Overview of the Literature on Health Benefits. **Nutrition Today**, v. 45, n. 3, p. 129–138, maio 2010.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN net). Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, 2018.

SOKOVIĆ, M. et al. Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece. **Die Nahrung**, v. 46, n. 5, p. 317–320, out. 2002.

SOUZA, A. A. et al. Composição química e concentração mínima bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 105–112, mar. 2016.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, n.2, p.12-20, 2006.

TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil: Composition and bioactivity of oregano products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 11, p. 2707–2714, 30 ago. 2013.

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. **Staphylococcus aureus**. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 175-182.

TRAGOOLPUA, Y.; JATISATIENR, A. Anti-herpes simplex virus activities of *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock & S. G. Harrison and essential oil, eugenol. **Phytotherapy research: PTR**, v. 21, n. 12, p. 1153–1158, dez. 2007.

TSIMOGIANNIS, D.; SAMIOTAKI, M.; PANAYOTOU, G.; et al. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*, v. 12, p. 593-606, 2007.

VALERIANO, C. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.1, p.57-67, 2012.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 584–640, jul. 2001.

YOUNES, I.; HAJJI, S.; RINAUDO, M. CHAABOUNI, M. JELLOULI, K.; MONCEF, N. Optimization of proteins and minerals removal from *Srimp* shells to produce highly acetylated chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 84, p. 246-253, 2016.

WELLER D.; ANDRUS A.; WIEDMANN M.; DEN BAKKER H.C. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n.1, p.286-292, 2015.

WEN, P. et al. Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. **Food Control**, v. 59, p. 366–376, 1 jan. 2016.

Apêndices

Apêndice A – Ficha de análise sensorial

Faixa etária

 < 19 anos 20 a 55 anos > 56 anos

Gênero

 Feminino Masculino

Escolaridade

 Ensino fundamental Ensino médio Ensino Superior Pós graduação

Você já consumiu ou consome hambúrguer de carne bovina?

 Sim Não**TESTE DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA - AVALIAÇÃO SENSORIAL**

Você está recebendo uma amostra de hambúrguer bovino com aplicação de uma cobertura adicionada com óleo essencial. Observe, prove e diga o quanto você gostou ou desgostou de cada atributo, dando uma nota para cada um deles, de acordo com a escala de 1 a 9.

9 - Gostei muitíssimo

8 - Gostei muito

7 - Gostei moderadamente

6 - Gostei ligeiramente

5 - Não gostei, nem desgostei

4 - Desgostei ligeiramente

3 - Desgostei moderadamente

2 - Desgostei muito

1 - Desgostei muitíssimo

Cor _____

Odor _____

Textura _____

Sabor _____

Impressão global _____

Agora avalie a amostra segundo a sua intenção de compra conforme a relação ao lado.

 Certamente compraria Compraria Provavelmente compraria Talvez comprasse Provavelmente não compraria Não compraria Certamente não compraria

Comentários: _____

Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pelo presente termo de consentimento livre e esclarecido, eu, _____, CPF _____, declaro que fui informado (a) de forma clara e detalhada, dos objetivos, da justificativa e da forma de trabalho desta pesquisa através de encontro individual e livre de qualquer forma de constrangimento e coerção.

Projeto: Desenvolvimento de cobertura comestível bioativa a base de quitosana incorporada de óleos essenciais e aplicação em produto cárneo

Objetivo: Fui informado (a) de que o objetivo desta pesquisa é avaliar as características sensoriais de hambúrguer bovino com aplicação de uma cobertura de quitosana adicionada com óleo essencial de cravo-da-índia.

Procedimentos: Fui informado (a) de que receberei amostra de hambúrguer bovino com aplicação de uma cobertura de quitosana adicionada com óleo essencial de cravo-da-índia para que eu avalie as características sensoriais (avaliação que utiliza os sentidos humanos: visão, olfato, tato, paladar e audição, para descrever características dos alimentos) do produto. Onde deverei olhá-lo, prová-lo e avaliar cuidadosamente os seguintes aspectos: cor, odor, textura, sabor, impressão global e intenção de compra.

Composição dos hambúrgueres: Carne bovina, gordura suína, proteína de soja, sal.

Riscos e possíveis reações: Fui informado (a) de que existem riscos mínimos por a pesquisa ser realizada com seres humanos, também fui informado que o produto não possui glúten, lactose e ovo, além de ter sido elaborado utilizando Boas Práticas de Fabricação.

Benefícios: O benefício de participar da pesquisa relaciona-se ao fato que os resultados serão incorporados ao conhecimento científico e posteriormente a situações de ensino-aprendizagem.

Participação voluntária: A minha adesão à pesquisa ocorrerá de forma voluntária e nenhum tipo de penalidade será aplicado caso não seja do meu interesse participar.

Confidencialidade: Estou ciente que a minha identidade permanecerá confidencial durante o estudo e que os dados coletados só serão utilizados para fins de pesquisa.

Consentimento: Ciente das informações citadas anteriormente, eu concordo em participar da avaliação sensorial dos produtos elaborados na pesquisa.

Assinatura: _____

Pelotas, novembro de 2018.

Assinatura dos pesquisadores responsáveis:

Pesquisador (a): Pâmela Inchauspe Corrêa Alves

Professor supervisor: Dr. Eliezer Avila Gandra

Universidade Federal de Pelotas