

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES  
URI – ERECHIM  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ALINE MARIA CENCI**

**EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA NO CONTROLE DE  
*Penicillium* sp. NA SUPERFÍCIE DE SALAME TIPO ITALIANO**

ERECHIM, RS - BRASIL

JUNHO DE 2013

---

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES  
URI – ERECHIM  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA NO CONTROLE DE  
*Penicillium* sp. NA SUPERFÍCIE DE SALAME TIPO ITALIANO**

**ALINE MARIA CENCI**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL

JUNHO DE 2013

---

**EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA NO CONTROLE DE  
*Penicillium* sp. NA SUPERFÍCIE DE SALAME TIPO ITALIANO**

Aline Maria Cenci

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Geciane Toniazzo  
Orientador

---

Prof. Dr. Rogério Luis Cansian  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Neusa Fernandes de Moura  
FURG Santo Antônio da Patrulha

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Eunice Valduga  
URI Erechim

Erechim, junho de 2013



NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

Dedico aos meus pais, Ari e Sirlei,  
ao meu irmão Gabriel e ao meu noivo Thiago.  
Pelo incentivo e apoio em mais uma conquista.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades que colocou em meu caminho e pela força que me deu para aproveitá-las;

Aos meus pais, Ari e Sirlei Cenci, por me ensinarem a ser persistente, a acreditar e lutar pelos meus objetivos;

Ao meu irmão, Gabriel Antonio Cenci, por existir, isso me faz muito feliz;

Ao meu noivo, Thiago Henrique Bervian, pelo carinho, amor, dedicação, apoio, incentivo..... por estar sempre ao meu lado;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação da Engenharia de Alimentos da URI, em especial aos meus orientadores Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Geciane Toniazzi e Prof. Dr. Rogério Luis Cansian;

A todos os colegas do mestrado de Engenharia de Alimentos;

Aos integrantes do laboratório de Biotecnologia da URI, pelo auxílio e colaboração;

À URI –Erechim pelo apoio na realização deste projeto.

Agradeço a todos que de alguma maneira incentivaram mais esta conquista.

“Deus não escolhe os capacitados, mas capacita os escolhidos.”

(Albert Einstein)

---

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA NO CONTROLE DE  
*Penicillium* sp. NA SUPERFÍCIE DE SALAME TIPO ITALIANO**

Aline Maria Cenci

Junho/2013

Orientadores: Geciane Toniazzo

Rogério Luis Cansian

Durante o processo de fermentação de salame tipo Italiano, pode ocorrer o desenvolvimento de culturas indesejáveis, como o fungo de coloração esverdeada que retarda o tempo de cura do produto. Neste âmbito, o presente trabalho avaliou a ação *in vitro* de quatro óleos essenciais contra o crescimento de fungos contaminantes de coloração esverdeada, indesejável na fabricação de salames. Os óleos testados *in vitro* foram: óleo de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), sálvia (*Salvia officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*) e cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), nas concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 26, 10, e 6  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (100, 75, 50, 25, 10, 5, 3, 1 e 0,5%). Através das análises *in vitro* foi possível obter o halo de inibição formado pelos óleos contra o crescimento do fungo estudado. O óleo de alecrim apresentou halo de inibição apenas com 1000  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de concentração, onde apresentou halo de inibição de 9,6 mm. O óleo de sálvia apresentou halo de inibição para as três primeiras concentrações testadas, onde se verificou halos de 12,2 mm; 11,2 mm e 10,5 mm respectivamente. Os óleos de cravo e orégano foram os que apresentaram melhores resultados, proporcionando halos de inibição mesmo nas concentrações mais baixas, demonstrando potencial fungicida. Com os resultados obtidos foram escolhidos os óleos de cravo e orégano para serem aplicados na superfície do salame, com concentrações de 250 e 500  $\mu\text{L mL}^{-1}$  para o óleo de orégano, 125 e 250  $\mu\text{L mL}^{-1}$  para o óleo de cravo e uma mistura (1:1 v/v) destes dois óleos com 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de concentração. Para as cinco concentrações pré-determinadas foi realizado análise sensorial visual e de sabor. No teste visual foi possível verificar que todas as amostras aspergidas com óleo apresentaram redução significativa no crescimento do fungo. O teste sensorial de sabor revelou que as amostras que receberam óleo de cravo com 125  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de concentração e a mistura (1:1 v/v) dos dois óleos, com 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de concentração, não apresentaram diferença significativa com relação ao sabor quando comparadas com a amostra padrão (sem adição de óleo). A comparação dos resultados com a análise da composição química dos óleos indica que o carvacrol e o eugenol são os principais compostos responsáveis pela alta atividade antifúngica do óleo de orégano e do óleo de cravo-da-índia, respectivamente.

**Palavras-chave:** Óleos essenciais, salame tipo italiano, *Penicillium* sp.

---

Abstract of dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

**ESSENTIAL OILS EFFECT IN ALTERNATIVE CONTROL OF *Penicillium* sp.  
SURFACE IN DRY SAUSAGE ITALIAN TYPE**

Aline Maria Cenci

June/2013

Advisors: Geciane Toniazzo  
Rogério Luis Cansian

During the fermentation process of Italian type sausages, there may be undesirable development of microorganisms, such as greenish fungus that retards the curing time of the product. In this context, the present study evaluated the in vitro effect of essential oils against four fungal growth contaminants greenish undesirable in the manufacture of sausages. The essential oils tested in vitro were: rosemary (*Rosmarinus officinalis*), sage (*Salvia officinalis*), oregano (*Origanum vulgare*) and clove (*Eugenia caryophyllata*) at concentrations of 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 26, 10 and 6  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (100, 75, 50, 25, 10, 5, 3, 1 and 0.5%). Through the in vitro assays was possible to obtain the inhibition halo formed by the oils against fungal growth. The rosemary oil showed inhibition zone only for oil in 1000  $\mu\text{L mL}^{-1}$  concentration where there was a halo of 9.6 mm. The sage oil showed inhibition zone for oil in first three concentration where was a halo of 12.2 mm; 11.2 mm e 10.5 mm respectively. Oils of clove and oregano presented the best results, providing zones of inhibition even at the lowest concentrations, demonstrating potential fungicide. With the results, were chosen oils of clove and oregano to be applied on the surface of Italian type sausage, with concentrations of 250 and 500  $\mu\text{L mL}^{-1}$  for oregano oil, 125 and 250  $\mu\text{L mL}^{-1}$  for clove oil and a mixture (1:1 v/v) of these two oils, with 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . For the five predetermined concentrations test was performed visual sensory and flavor. In the visual test was verified that all samples sprayed with oil decreased significant on fungal growth. The sensory test showed that the samples received clove oil concentration of 125  $\mu\text{L mL}^{-1}$  and (1:1v/v) mixture of two oils with 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$  concentration, no difference with regard to significant ( $p < 0,05$ ) flavor when compared with a standard sample (without adding oil). The comparison of the results with the analysis of the chemical composition of the oils indicates that carvacrol and eugenol are the main component responsible for the antifungal activity of oregano and clove oil, respectively.

**Keywords:** Essential oils, Italian type sausage, *Penicillium* sp.

---

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 PRODUÇÃO DE SALAME .....	4
2.1.1 ADIÇÃO DE CULTURA <i>STARTER</i> .....	5
2.1.2 DEFUMAÇÃO, CURA E FERMENTAÇÃO.....	6
2.2 DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS .....	7
2.3 CONDIMENTOS, PLANTAS AROMATICAS E ÓLEOS ESSENCIAIS.....	8
2.3.1 Óleo essencial de cravo-da-índia ( <i>Eugenia caryophyllata</i> ).....	9
2.3.2 Óleo essencial de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) .....	10
2.3.3 Óleo essencial de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ) .....	11
2.3.4 Óleo essencial de sálvia ( <i>Salvia officinalis</i> ) .....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 ANÁLISES REALIZADAS <i>IN VITRO</i> .....	15
3.1.1 Coleta e Isolamento do Fungo Filamentoso Contaminante Industrial .....	15
3.1.2 Identificação do Fungo Contaminante.....	16
3.1.3 Composição química dos óleos essenciais .....	17
3.1.4 Avaliação do Efeito dos Óleos ESSENCIAIS Contra o Crescimento do Fungo Contaminante.....	17
3.2 ANÁLISES REALIZADAS NO SALAME TIPO ITALIANO .....	18
3.2.1 Elaboração do Salame Tipo Italiano.....	18
3.2.2 Aplicação dos Óleos nas Peças de Salame .....	19
3.2.3 características Sensoriais.....	21
3.2.4 Análise Visual Discriminativa pelo Teste de Diferença do Controle .....	22
3.3 Tratamento Estatístico.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 ANÁLISES REALIZADAS <i>IN VITRO</i> .....	24

---

4.1.1 Isolamento e Identificação do Fungo Contaminante.....	24
4.1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS (OEs).....	25
4.1.3 Atividade Antifúngica dos Óleos Essenciais.....	27
4.2 ANÁLISES REALIZADAS NO SALAME TIPO ITALIANO .....	33
4.2.1 Análise Sensorial de Sabor .....	35
4.2.2 Análise visual .....	36
5. CONCLUSÕES .....	38
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas de produção de salame tipo italiano.....	4
Figura 2 – Estrutura do composto eugenol.....	10
Figura 3: Estrutura dos compostos timol e carvacrol.....	12
Figura 4: Estrutura dos compostos: Acetato de linalila, linalol, $\alpha$ -terpineol, p-cimeno, borneol, 1,8-cineol, cânfora.....	13
Figura 5 - Exemplo de microcultivo em câmara úmida após 5 dias de incubação à 25°C .....	16
Figura 6 - Placa com meio solidificado e as cavidades de 6mm de diâmetro, onde em duas das cavidades foi adicionada a diluição do óleo, em uma das cavidades Tween 80 e na cavidade restante o Fungicida.....	18
Figura 7 – Aspecto visual do salame tipo italiano com uma aspersão (0,14 mL) da concentração de óleo essencial. ....	20
Figura 8 – Aspecto visual do crescimento do fungo de coloração esverdeada na região do grampo (extremidade) do salame tipo italiano.....	21
Figura 9 - Ficha de avaliação sensorial distribuída aos julgadores. ....	22
Figura 10 - Modelo da Ficha de avaliação de análise visual. ....	23
Figura 11 – Aspecto do Fungo branco (a) e fungo verde (b), identificados como <i>Penicillium</i> sp. pela técnica de microcultivo (aumento de 1000 vezes). ....	24
Figura 12 - Crescimento do fungo estudado (verde) nas placas com óleo essencial de alecrim com 1000 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (a) e 750 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (b) de concentração.....	29
Figura 13 - Crescimento do fungo estudado (verde) nas placas com óleo essencial de sálvia com 1000 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (a), 750 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (b) e 500 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (c) de concentração. ....	30
Figura 14 - Crescimento do fungo estudado (verde) nas placas com óleo essencial de orégano com 750 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (a) e 26 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (b) de concentração. ....	31
Figura 15 - Crescimento do fungo estudado (verde) nas placas com óleo essencial de cravo com 500 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (a) e 6 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (b) de concentração. ....	31
Figura 16 - Aspecto visual do Salame tipo Italiano em diferentes estágios do processo de cura.....	34
Figura 17 - Região avaliada nas seis amostras apresentadas. ....	36

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Principais compostos voláteis (% de área) encontrados nos OEs de alecrim, cravo-da-índia, orégano, sálvia e cravo-da-índia/orégano 1:1.....	25
<b>Tabela 2</b> - Diâmetro médio (mm) dos halos de inibição do fungo <i>Penicillium</i> sp, para as diferentes concentrações dos óleos essenciais testados. ....	27
<b>Tabela 3</b> - Teste de comparação pareada para análise de sabor de salames com aplicação superficial de diferentes concentrações de óleos essenciais em relação ao padrão (sem óleo essencial). ....	35
<b>Tabela 4</b> - Teste de diferença do controle, análise visual do controle de fungos em salames através da aplicação superficial de diferentes concentrações de óleos essenciais em relação ao padrão (sem óleo essencial). ....	37

## 1. INTRODUÇÃO

Diversas plantas apresentam potencial aromático, condimentar e medicinal, sua utilização é importante desde as primeiras civilizações. Os povos do Egito, Israel e Grécia utilizavam habitualmente esses vegetais em vários procedimentos, tanto medicinais quanto culinários. No Brasil, as plantas aromáticas, condimentares e medicinais já eram utilizadas pelos índios desde antes da colonização, estes passaram seus conhecimentos para os colonizadores e assim as plantas tornaram-se amplamente empregadas na medicina caseira nas formas de chás e xaropes (FURLAN, 1998; MENDONÇA, 2004; SAGGIORATO, 2008).

Para a indústria alimentícia os condimentos sempre foram aliados na conservação dos alimentos, no entanto a preocupação que o uso excessivo de conservantes sintéticos possa causar nos consumidores, faz com que a indústria busque novas alternativas com o objetivo de reduzir o uso dos mesmos. Neste âmbito, a utilização de produtos naturais na conservação dos alimentos é uma alternativa promissora para continuar garantindo a qualidade sanitária dos alimentos, prolongar a vida de prateleira e atender as necessidades e expectativas dos consumidores (CASTRO et al., 2011).

As plantas aromáticas possuem aroma capaz de sensibilizar o olfato, destas são extraídos os óleos essenciais, os quais são provenientes do metabolismo secundário das plantas. Em sua composição apresentam uma mistura de compostos, tais como: monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides, alcoóis, aldeídos, ésteres, cetonas, fenóis e óxidos. Estes metabólitos conferem as características organolépticas do óleo que são largamente conhecidos pela sua ação terapêutica e farmacológica, também estão sendo estudados quanto ao potencial antimicrobiano, antifúngico, citotóxico, antiinflamatório e inseticida, diversas pesquisas apontam nos óleos essenciais a presença de substâncias com tais atividades (CASTELLANI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; UPNMOOR, 2003).

A utilização de produtos naturais na fabricação de alimentos tem ganhado espaço nas indústrias cárneas que apostam em formulações de produtos saudáveis e atrativos. O salame possui grande representatividade no mercado de produtos cárneos. No cenário nacional a região sul se destaca na produção e no consumo

deste produto (BACKES, 2011; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2007; MUGUERZA et al., 2004; TERRA et al., 2004).

O salame tipo italiano é o produto cárneo industrializado, elaborado de carnes suínas ou suínas e bovinas, toucinho, adicionado de ingredientes, moídos, embutido, curado, podendo ser defumado ou não, fermentado, maturado e dessecado por tempo indicado pelo processo de fabricação. Sendo que a presença de mofo característicos é consequência natural do seu processo tecnológico de fabricação (BRASIL, 2000).

O desenvolvimento de fungos filamentosos na superfície dos salames durante a maturação é considerado um fator de qualidade que deve complementar mudanças bioquímicas envolvidas na maturação do produto. Muitos destes fungos podem, no entanto, ocasionar alterações de cor e sabor e o ataque ao envoltório, como também representar um problema de saúde pública pelas toxinas que podem produzir (CASTRO et al., 2000). Estes fungos podem produzir metabólitos secundários tóxicos, podem produzir coloração verde, marrom ou pontos pretos que não são aceitos pela maioria dos consumidores, e também podem ter impacto negativo no sabor ou simplesmente retardar o tempo de cura (SAGGIORATO, 2008; SAMSON et al., 1995).

Saggiolato (2008) avaliou a atividade antifúngica e antioxidante do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) *in vitro* e na superfície de salames tipo Italiano, determinou a atividade antifúngica na superfície dos salames pela aspersão de diferentes concentrações de óleo essencial e realizou análise sensorial em relação ao sabor. Em seu estudo concluiu que as diferentes concentrações de óleo empregadas não influenciaram sobre as determinações físico-químicas. As atividades fungistática nos salames ocorreram a partir da concentração de 25 mg mL<sup>-1</sup>, sendo que a análise sensorial não determinou diferença em relação ao sabor nesta concentração. Os resultados entre as determinações das atividades antifúngicas em placas e nas superfícies dos salames foram concordantes, validando a metodologia em placas utilizada no trabalho.

Estudos relacionados a atividade antifúngica de óleos essenciais em alimentos são escassos na literatura, no entanto, este assunto tem despertado enorme interesse a nível industrial e comercial. Face à relevância de estudos

## Introdução

---

relacionados à obtenção de produtos alimentícios seguros e saudáveis, dando ênfase à utilização de conservantes e aditivos naturais, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação da ação antifúngica *in vitro* do óleo de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), sálvia (*Salvia officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*) e cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*). Estes dois últimos também foram testados sensorialmente, para o óleo de cravo foram utilizadas as diluições 125 e 250  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , para o óleo de orégano 250 e 500  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , também foi testada a ação dos dois óleos misturados (1:1 v/v) na concentração de 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$ .

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item constam informações sobre a produção de salame e a utilização de condimentos, plantas aromáticas e óleos essenciais.

### 2.1 PRODUÇÃO DE SALAME

Denomina-se salame tipo italiano o produto cárneo industrializado, elaborado de carnes suínas ou suínas e bovinas, toucinho, adicionado de ingredientes, moídos em granulometria média entre 6 e 9 mm, embutido, curado, podendo ser defumado ou não, fermentado, maturado e dessecado por tempo indicado pelo processo de fabricação. Este produto é classificado como um produto curado, fermentado, maturado e dessecado. Sendo que a presença de mofo característicos é consequência natural do seu processo tecnológico de fabricação (BRASIL, 2000).

A Figura 1 mostra as etapas de produção de salame tipo italiano.

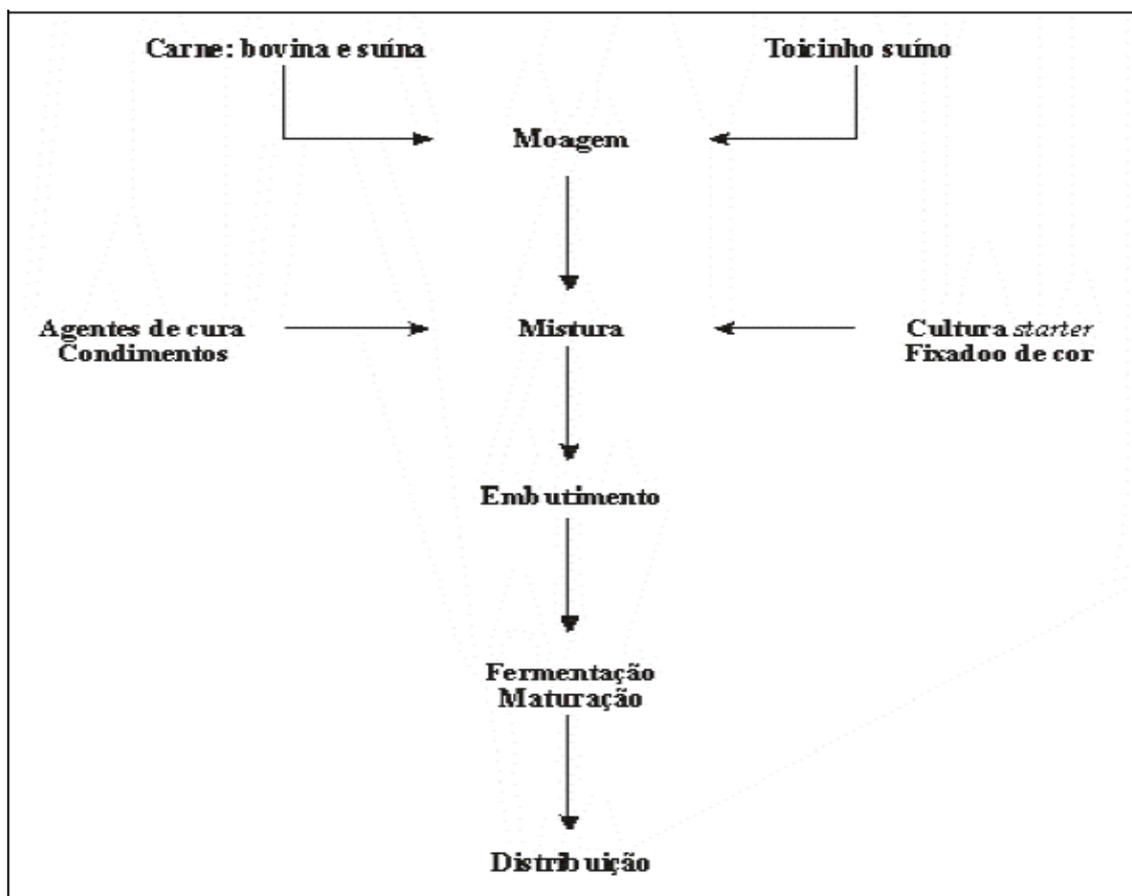


Figura 1 – Etapas de produção de salame tipo italiano.

Fonte: PEÑA, M. (2006).

### 2.1.1 ADIÇÃO DE CULTURA *STARTER*

A fermentação é um dos processos mais antigos utilizados como forma de conservação de alimentos, porém no passado ela era resultado natural da microflora presente na carne e no ambiente. No entanto hoje se sabe que a fermentação descontrolada pode produzir produtos com baixa qualidade e até mesmo inseguros para o consumo (CIROLINI et al., 2010; ESSID et al., 2007).

A utilização de culturas *starters* na fermentação de alimentos se iniciou em 1957, o que permitiu maior uniformidade entre os produtos, menor tempo de fermentação e alta conservação. Normalmente são utilizadas duas categorias de micro-organismo, as bactérias lácticas as quais promovem a segurança e estabilidade do produto e *Staphylococcus* coagulase negativa capaz de estabilizar a cor, prevenir a rancificação e realçar compostos aromáticos dos produtos cárneos (CIROLINI et al., 2010; DROSINOS et al, 2005; VURAL, 1998).

O objetivo é que as culturas adicionadas sejam dominantes frente à microbiota espontânea, para isso elas devem estar adaptadas ao meio, exibir tolerância ao sal comum e nitritos, além de serem capazes de crescer a temperaturas relativamente baixas. Entre as propriedades mais desejáveis está a atividade catalase, que possibilita desdobrar o peróxido de hidrogênio formado por certas bactérias lácticas, assim como pode evitar desvios de cor e sabor e devem ser inócuas para a saúde. Entre os derivados de carne, os embutidos fermentados são considerados pratos prontos, cuja segurança alimentar ocorre devido a diminuição da atividade de água que é necessária para o crescimento da maioria dos patógenos e pela redução do pH (MATOS, 2009).

As bactérias lácticas utilizadas como culturas na elaboração de produtos cárneos, formam a partir da glicose e outros açúcares o ácido láctico, que é responsável pela aceleração da maturação. A diminuição gradativa do pH favorece a coloração e a consistência. A acidificação também inibe o crescimento de micro-organismos indesejáveis. Já para o *Staphylococcus* a atividade nitrato redutase e catalase são consideradas as mais importantes para serem usados como culturas iniciadoras na produção de embutidos fermentados (CASABURI et al, 2005; LEROY et al, 2006; MATOS, 2009).

### 2.1.2 DEFUMAÇÃO, CURA E FERMENTAÇÃO

O propósito da defumação é aumentar a conservação e modificar a textura, o aspecto, o aroma e o sabor dos alimentos. A defumação possui ação conservante limitada, por este motivo ela deve ser combinada com outros procedimentos de conservação (cura, fermentação, secagem ou aquecimento). As substâncias que constituem a fumaça e possuem ação inibitória sobre os micro-organismos são fundamentalmente o formaldeído, a creosota (mescla de guaiacol, metilguaiacol, cresóis e xilenóis), os fenóis e alguns ácidos como o ácido fórmico e o ácido acético. A ação inibitória da fumaça é mais intensa no local onde se concentram estas substâncias, normalmente a superfície do alimento, assim se considera que a defumação é um método de conservação superficial (MATOS, 2009; PRÄNDL et al., 1994).

Durante a etapa de cura ocorre o desenvolvimento da cor e também a acidificação, o ideal é que esta etapa aconteça em câmaras climatizadas para ser possível o controle de temperatura e da umidade relativa. Os padrões praticados podem variar bastante dependendo das características do produto que se pretende obter, das condições de infra-estrutura disponíveis e da cultura local. Com temperaturas entre 16°C e 18°C, são fabricados produtos de melhor qualidade, sabor e aroma. Entre 24°C e 26°C todo o processo é acelerado, mas causa degradação de gorduras, o que é desfavorável ao sabor do produto. Nas primeiras 24 horas, a umidade relativa é de aproximadamente 95% e em seguida, cai gradativamente para cerca de 80%, para desenvolvimento da cor adequada e da acidificação (MATOS, 2009; YAMADA, 1995).

A fermentação é a fase mais longa no processo de fabricação de salames, é a etapa onde ocorre a maioria das transformações bioquímicas, físicas e microbiológicas, as quais são influenciadas pelas características da matéria-prima e do processo. Entre as etapas de cura e fermentação, as transformações físicas e bioquímicas causam a alteração na microbiota inicial, decréscimo no valor do pH, redução do nitrato a nitrito para a formação da mioglobina nitrosa, solubilização e gelificação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, proteólise, lipólise e fenômenos oxidativos, além da desidratação. Neste processo de transformação, a ação das enzimas é determinante, entre elas, a catepsina D é uma das proteinases endógenas que tem sido registrada como responsável pela proteólise durante o

estágio de fermentação enquanto as proteinases bacterianas contribuem para a proteólise durante o estágio de secagem (MATOS, 2009).

## 2.2 DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS

O crescimento de fungos ao longo da fermentação em salames ocorre pelas condições do ambiente e a disponibilidade de matéria orgânica. Os fungos preferem ambientes com alta umidade, mas submetidos a um ambiente desidratado esporulam e permanecem como forma de resistência (CIROLINI et al., 2010; MATOS, 2009).

De maneira geral, após os esporos se dispersarem, o desenvolvimento dos fungos depende de sua interação com o oxigênio, umidade, temperatura, pH e atividade de água. A maioria é aeróbia com temperatura ótima de crescimento entre 20°C e 30°C, umidade superior a 70%, capazes de se adaptar a baixos valores de atividade de água (MATOS, 2009).

Os produtos tais como o salame, que são curados por nitrato, necessitam de uma determinada microbiota redutora de nitrato. Os micro-organismos nitrato redutores mais importantes nos produtos cárneos são os *micrococcos*. Também exercem papel importante os *estreptococos* do grupo sorológico D, os *lactobacilos* e algumas estreptobactérias atípicas como *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Esses micro-organismos contribuem através da produção de ácidos a partir dos hidratos de carbono durante a cura, fundamentalmente o ácido láctico. Assim além do efeito bactericida do nitrito, também contribuem criando um meio mais inóspito para o desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes (MATOS, 2009).

Porém, se a umidade relativa não estiver controlada e atingir valores superiores a 80%, junto ao fungo de coloração branca (desejável), crescem culturas de diferentes cores como verde, azul, amarelo e preto (*Mucor*). Os dois primeiros são preocupantes, no entanto os amarelos e pretos são completamente indesejáveis, sendo que o de coloração preta causa o aparecimento de orifícios na tripa, já o fungo amarelo retarda o tempo de cura por formar uma película ao redor do embutido, dificultando a desidratação (MATOS, 2009; TERRA, 1998).

### 2.3 CONDIMENTOS, PLANTAS AROMATICAS E ÓLEOS ESSENCIAIS

Do ponto de vista nutricional, os condimentos possuem valor energético modesto, sua relevância está ao se comportarem como complemento ao alimento para que este se torne mais agradável ao olfato, visão e paladar, estimulando o apetite e a digestão (RODRIGUES et al., 2011). Além da função sensorial, os condimentos atuam na conservação dos alimentos aumentando sua vida útil através da atividade bacteriostática e bactericida (CARVALHO et al., 2005).

As plantas condimentares são utilizadas como tempero, realçando o sabor e o aspecto do alimento, podendo apresentar propriedades de conservação. As plantas aromáticas possuem aroma capaz de sensibilizar nosso olfato, destas são extraídos os óleos essenciais, largamente conhecidos pela sua ação terapêutica e farmacológica, também estão sendo estudados quanto ao potencial antimicrobiano, antifúngico, citotóxico, antiinflamatório e inseticida. Diversas pesquisas apontam nos óleos essenciais a presença de substâncias com tais atividades, prevenindo o início da deterioração e o crescimento de micro-organismos indesejáveis (CASTELLANI et al., 2011; CARVALHO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011; UPNMOOR, 2003).

Os óleos essenciais são provenientes do metabolismo secundário das plantas. Em sua composição apresentam uma mistura de compostos, tais como: monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides, alcoóis, aldeídos, ésteres, cetonas, fenóis e óxidos. Estes metabólitos conferem as características organolépticas do óleo. Flores, folhas, cascas, rizomas e frutos são matérias-primas para sua produção. Normalmente os óleos essenciais são extraídos de plantas através da técnica de arraste a vapor, para frutos cítricos a extração pode ocorrer também através da prensagem do pericarpo dos frutos. Sua aplicação ocorre em diversas áreas: perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos (BAJPAI et al., 2008; BIZZO, 2009; VALERIANO et al., 2012).

Biologicamente, as plantas respondem ao ataque de herbívoros e patógenos liberando compostos orgânicos voláteis, estas substâncias são sintetizadas com o objetivo de defesa da planta. Assim os óleos essenciais, substâncias biologicamente ativas, se tornaram alvo de pesquisas pela sua potencial ação contra bactérias, fungos e leveduras (CAMPOS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011).

O potencial antimicrobiano de óleos essenciais se deve a presença de grupos terpenóides e fenóis, esta característica está relacionada com a característica

lipolítica destes compostos, causando acúmulos e injúrias na membrana celular. A atividade antimicrobiana pode ser associada à composição e configuração estrutural do óleo, os seus grupos funcionais e a possibilidade de sinergismo entre seus compostos. A grande variabilidade que ocorre entre resultados obtidos a partir de óleos de uma mesma planta está relacionada com as variáveis da planta e condições de cultivo, variação geográfica, climática, genótipo e métodos para extrair o óleo, estes fatores podem interferir na composição química e proporção dos compostos individuais do óleo essencial (OUSSALAH et al., 2007).

Os óleos essenciais estão sendo alvo de pesquisas nas mais diversas áreas, na área de alimentos se destacam pela ação antimicrobiana e antioxidante. A aplicação de óleos essenciais como ingredientes em produtos alimentícios, cosméticos e sanitizantes, desperta grande interesse do setor industrial devido à grande preocupação dos consumidores com os danos à saúde causados por aditivos sintéticos, o que conseqüentemente desperta a grande aceitação dos produtos naturais (MARANGONI e MOURA, 2011; SCHERER et al., 2009).

Muitas vezes a aplicação de óleos essenciais e compostos naturais nos alimentos podem causar modificações sensoriais desagradáveis, porém atualmente diversos conservantes a base de plantas já estão disponíveis e sendo utilizados nos alimentos com sucesso, exemplo disso é o chá verde, muito pesquisado como antioxidante hoje aplicado em formulações alimentícias (BURT, 2004).

### 2.3.1 ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA (*EUGENIA CARYOPHYLLATA*)

Conforme Zago et al. (2009), o cravo-da-Índia pertence à família Myrtaceae, seu óleo essencial está presente na planta em grande quantidade, representa entre 15 e 25%, sendo o componente majoritário o eugenol, que é conhecido por apresentar atividade antibacteriana e antifúngica.

A Figura 2 mostra a estrutura química do eugenol.

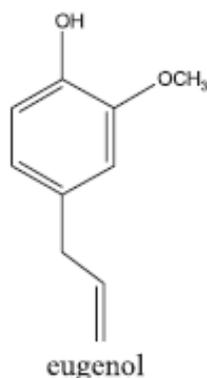


Figura 2 – Estrutura do composto eugenol.

Fonte: MORAIS et al. (2006).

Os compostos fenólicos apresentam uma grande capacidade de sequestrar radicais livres que causam o estresse oxidativo, além de apresentarem propriedades anti-inflamatória, anti-alérgica, antimicrobiana e atividade antineoplásica. O eugenol é um derivado fenólico que pode ser extraído não só do cravo-da-índia, mas também a partir de pimenta, louro, canela, noz-moscada, cânfora e alguns óleos naturais. O eugenol é um líquido oleoso amarelo com um odor característico que é solúvel em álcool e apresenta uma baixa solubilidade em água (HIDALGO et al., 2009).

Souza et al. (2004) avaliaram óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação, onde concluíram que na concentração de 250 µg/mL o óleo de cravo apresenta inibição ao desenvolvimento e da produção de toxina de *Aspergillus parasiticus*, apresentando, neste estudo, maior inibição que o óleo de orégano e elevado poder antimicrobiano.

### 2.3.2 ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM (*ROSMARINUS OFFICINALIS*)

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é uma planta que pertence à família Lamiaceae (Labiatae), originária do Sul da Europa e do Norte da África. Popularmente é chamada por alecrim-da-horta, alecrim-de jardim, alecrim-de-cheiro, alecrim-rosmarinho, rosmarin (alemão), é conhecida por apresentar propriedades estomacais, estimulantes, antiespasmódica e cicatrizantes. A planta é considerada um subarbusto ramificado, de coloração verde, com hastes lenhosas, folhas pequenas, sésseis, finas, opostas e lanceoladas, de sabor picante. A parte inferior

das folhas apresenta coloração verde-acinzentada, enquanto a superior é quase prateada. A planta exala aroma forte e é utilizada para fins culinários, medicinais e aromáticos, seu óleo essencial é utilizado nas indústrias cosméticas, de higiene e perfumaria na fabricação de sabonetes, shampoos, desodorantes, colônias e desinfetantes. Além disso, o extrato alcoólico dessa planta é utilizado como antioxidante na indústria alimentícia (MAY et al., 2010).

Em seus componentes, o óleo essencial de alecrim apresenta terpenos, que proporcionam ação antimicrobiana contra linhagens de bactérias e leveduras (MAY et al., 2010; ZAGO et al., 2009).

Genena et al. (2008) avaliaram a ação antioxidante e antibacteriana de extrato de alecrim, a atividade antioxidante foi determinada através do método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazina), a atividade antibacteriana foi determinada para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e a ação antifúngica para *Candida albicans*. Os autores confirmaram as atividades antioxidantes, antibacterianas e antifúngicas do extrato de alecrim.

### 2.3.3 ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*ORIGANUM VULGARE*)

O orégano é uma planta aromática da família Lamiaceae muito comum na região do mediterrâneo, é uma erva arbustiva, anual e perene, costuma crescer em encostas pedregosas e áreas de montanhas rochosas, o orégano é conhecido como uma planta muito versátil, com muitas propriedades terapêuticas (sudorese, carminativo, antiespasmódico, anti-séptico, tônico) sendo aplicado na medicina tradicional em muitos países, é rico em óleo essencial e muito usado como tempero na preparação de alimentos (MARQUES, FILHO, SANTOS, 2009; MITCHELL et al., 2010).

No óleo de orégano os principais componentes antimicrobianos são o carvacrol e o timol, com comprovada ação inibitória no controle *in vitro* da multiplicação de *Salmonella*. A atividade bactericida dos óleos essencial pode variar conforme os teores de timol e carvacrol presentes, sendo que estes dependem do tipo de solo, clima, práticas agrícolas, variedade do orégano e do processo de extração do óleo essencial. Os compostos fenólicos não possuem afinidade com a água, são hidrofóbicos, eles agem na membrana celular da célula do micro-

organismo. Esses compostos se acumulam na bicamada lipídica ocasionando desarranjo na função e na estrutura da membrana e transpõe a célula bacteriana, realizando ação inibitória no citoplasma celular, provocando lise e liberação do ATP intracelular, outra forma de ação é a perda de constituintes celulares causado pelo aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática (SANTURIO et al., 2011; SILVA et al., 2010).

A Figura 3 mostra a estrutura dos compostos timol e carvacrol.

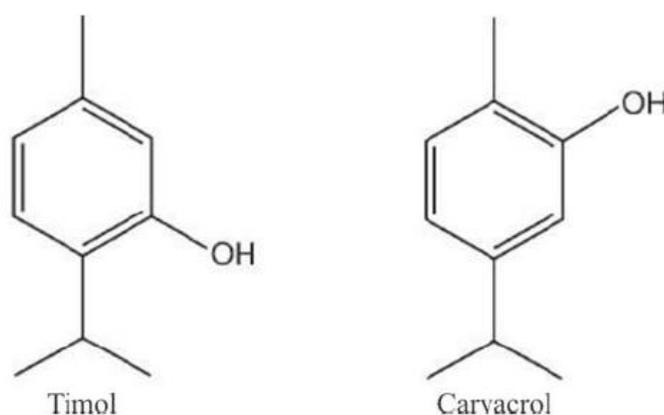


Figura 3: Estrutura dos compostos timol e carvacrol.

Fonte: BOTRE et al. (2010).

Medeiros et al. (2011) desenvolveram sachês incorporados com óleo essencial de orégano e avaliaram as propriedades microbiológica de mangas armazenadas em sacos de papel contendo estes sachês em seu interior. A atividade antimicrobiana foi testada para os seguintes fungos: *Colletotrichum gloeosporides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Xanthomonas campestris pv. mangiferae indica*, *Alternaria alternata*. Assim, verificaram que os sachês incorporados com óleo de orégano apresentaram controle no crescimento dos micro-organismos testados.

#### 2.3.4 ÓLEO ESSENCIAL DE SÁLVIA (*SALVIA OFFICINALIS*)

O gênero *Salvia* L. pertence à família Lamiaceae e possui em torno de de 900 espécies dispersas em todo o mundo, principalmente nas áreas do Mediterrâneo, África do Sul e América do Sul. Mesmo não sendo originalmente do Brasil, algumas espécies de sálvia têm sido bem adaptados, especialmente na região sul. Estas espécies são amplamente utilizados na medicina popular e diversas pesquisas farmacológicas têm procurado identificar os componentes responsáveis por seus

efeitos terapêuticos (MOSSI et al., 2011; PIEROZAN et al., 2009; DELAMARE et al., 2007; RADULESCU et al., 2004; EVANS, 2002).

Muitos estudos trazem a caracterização química e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais de espécies do gênero *Salvia*. A sua atividade anti-microbiana tem sido reconhecida a décadas e se atribui à presença de alguns compostos importantes que variam de acordo com a espécie, como o 1,8-cineol, cânfora, borneol, p-cimeno, linalol, acetato de linalila e  $\alpha$ -terpineol (MOSSI et al., 2011; KAMATOU et al., 2008, 2010; PIEROZAN et al., 2009).

A Figura 4 mostra a estrutura dos compostos: 1,8-cineol, cânfora, borneol, p-cimeno, linalol, acetato de linalila e  $\alpha$ -terpineol.

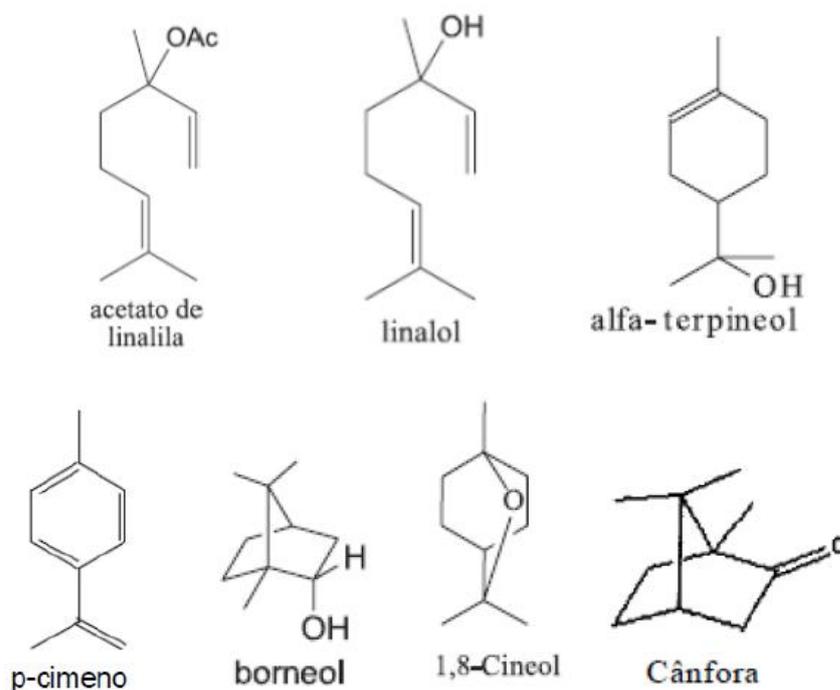


Figura 4: Estrutura dos compostos: Acetato de linalila, linalol,  $\alpha$ -terpineol, p-cimeno, borneol, 1,8-cineol, cânfora.

Fonte: SILVA et al. (2009); ANTUNES (2005); PAULA et al. (2010); ALVES e VICTOR (2010); MORAIS et al. (2006); MONTANARI e BOLZANI (2001).

Pozzatti et al. (2008) investigaram a atividade antifúngica do óleo essencial de sálvia, o óleo estudado apresentava a seguinte composição: cis-tujona (40,61%), trans-tujona (15,10%), cânfora (13,9%), 1-8 cineol (7,54%),  $\alpha$ -pinene (4,82%), canfene (2,51%), borneol (2,21%). Através deste estudo não foi possível evidenciar

Revisão Bibliográfica

---

a atividade antifúngica do óleo essencial da sálvia frente a diversas cepas de *Candida spp.*

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste item estão descritos o material e métodos utilizados nas análises *in vitro* e nas análises em salame tipo italiano que permitiram avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), sálvia (*Salvia officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*) e cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) adquiridos comercialmente. Para melhor compreensão, esta seção está subdividida em análises realizadas *in vitro* e em análises realizadas no salame tipo italiano. Para as análises sensoriais foi encaminhado projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa o qual foi aprovado com número CAAE 14416613.3.0000.5351.

#### 3.1 ANÁLISES REALIZADAS *IN VITRO*

##### 3.1.1 COLETA E ISOLAMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO CONTAMINANTE INDUSTRIAL

O fungo foi coletado em uma cooperativa produtora de salames da cidade de Erechim – RS, onde com o auxílio de uma alça de platina, os fungos foram retirados da peça de salame e imediatamente inoculados em uma placa com meio PDA (batata dextrose agar).

Em laboratório os fungos coletados foram incubados em estufa (Tecnal, modelo TE - 393/2) a temperatura de 30°C por 72 horas. Após, foram realizados repiques para isolar o fungo de interesse, feito em razão da cor do fungo estudado (verde). Este procedimento foi repetido até se obter apenas o fungo de coloração verde.

Após ser isolado o fungo de coloração verde, o mesmo foi inoculado em 200 mL de meio PD (batata dextrose) estéril, incubado em estufa (Tecnal, modelo TE - 393/2) por 7 dias a temperatura de 30°C, após 7 dias de incubação a suspensão foi utilizada nas análises conforme descrito nos próximos itens.

### 3.1.2 IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO CONTAMINANTE

Ocorrido o crescimento das colônias do fungo, realizou-se a técnica de microcultivo em lâmina, utilizando azul de lactofenol-algodão como corante. No microcultivo em lâmina, as estruturas permanecem íntegras além de ser utilizado um meio de cultura (ágar batata), que estimula à produção de macro e microconídeos, que na maioria das vezes permitem a identificação do fungo, assim como estimula também, à formação de pigmentos.

Nessa técnica semeou-se o fungo em um cubo de ágar sobre uma lâmina recoberta com uma lamínula esterilizada, e incubada dentro de uma placa de petri contendo 5 mL de água esterilizada para evitar a dessecação do meio de cultura, por cinco dias a 25°C, como representado na Figura 5.

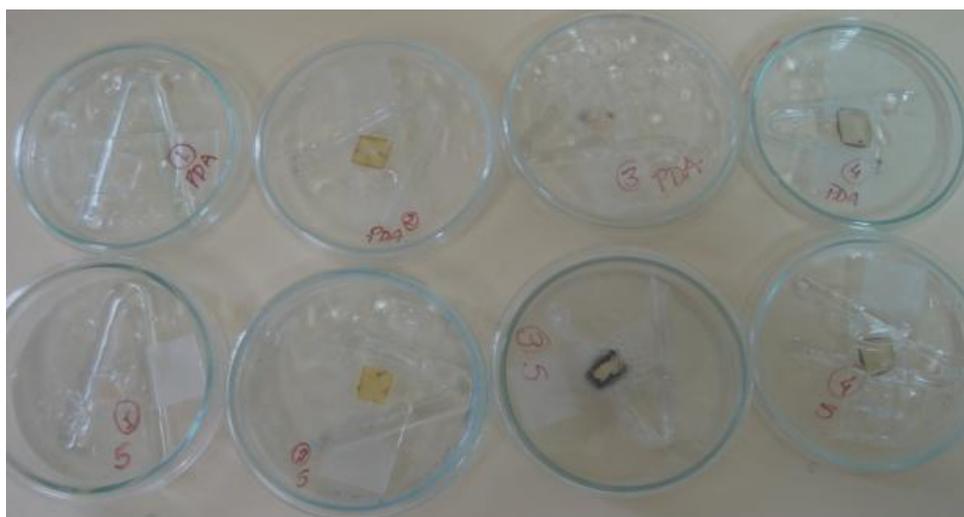


Figura 5 - Exemplo de microcultivo em câmara úmida após 5 dias de incubação à 25°C

Posteriormente, retirou-se a lamínula com auxílio de uma pinça, cuidadosamente, uma vez que nela estavam aderidas as hifas e esporos do fungo. Em seguida, adicionou-se uma gota de corante azul de lactofenol-algodão (Cotton Blue) e montou-se sobre uma lâmina. O cubo de ágar foi desprezado, e em seu lugar foi adicionada outra gota de corante azul e recoberto com uma lamínula para visualizar os esporos e hifas, também aderidas à lâmina, vedada pra conservar por mais tempo (RIBEIRO e SOARES, 1998).

A lâmina foi seca e visualizada em microscópio, onde foi submetida a uma avaliação para identificação do fungo, fundamentada na morfologia macroscópica das colônias e no estudo dos órgãos vegetativos e de frutificação do fungo cultivado pela técnica de microcultivo seguindo a chave de identificação de gêneros de Barnett et al. (1986).

### 3.1.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais comerciais de óleo de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), sálvia (*Salvia officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*) e cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), todos da marca Ferquima, foram caracterizados quanto a composição dos compostos voláteis através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (Shimadzu QP5050 A), usando uma coluna capilar DB-WAX (30m, 0,25mm, 0,25 $\mu$ m). A temperatura da coluna foi programada a 50 °C por 3 minutos, aumentando 5 °C/minutos a 130 °C e depois 15 °C/minutos a 210 °C por 5 minutos. Hélio foi usado como gás de arraste e as temperaturas do injetor e detector foram de 250 °C. 0,5  $\mu$ L foram injetadas no sistema GC/MS. Este dispositivo operou com uma taxa de fluxo de 1 mL/minuto com um impacto eletrônico de 70eV e no modo split (razão split 1:3). A identificação dos compostos foi realizada pela comparação do espectro de massas com aqueles da biblioteca Wiley e por comparação adicional dos tempos de retenção do GC de compostos padrões.

### 3.1.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA O CRESCIMENTO DO FUNGO CONTAMINANTE

As diluições dos óleos de óleo de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), sálvia (*Salvia officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*) e cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), foram preparadas com água destilada e 1% de Tween 80, sendo que os óleos foram testados nas concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 26, 10, e 6  $\mu$ L mL<sup>-1</sup> (100, 75, 50, 25, 10, 5, 3, 1 e 0,5%). A diluição foi agitada por 5 minutos com auxílio de agitador de tubos - Tipo Vortex (Fanem).

A metodologia utilizada foi de difusão em placas (LAUXEN, 2012). Em um erlenmayer com 400 mL de PDA estéril em estado líquido e levemente resfriado foi adicionado 20 mL da suspensão fúngica preparada conforme o item 3.1.1 (aproximadamente  $10^6$  UFC/mL), a mistura foi agitada e em seguida vertida nas placas de petry estéreis. Após solidificação do Agar nas placas de petry, foram feitas quatro cavidades com cânulas de vidro estéreis (6 mm de diâmetro). Em duas das cavidades foi adicionado 50  $\mu$ L da diluição do óleo, em outra cavidade 50  $\mu$ L de Tween 80 utilizado como controle negativo e na cavidade restante 50  $\mu$ L de antifúngico padrão Cetoconazol como controle positivo.

A Figura 6 apresenta placa com meio solidificado e as 4 cavidades de 6 mm.

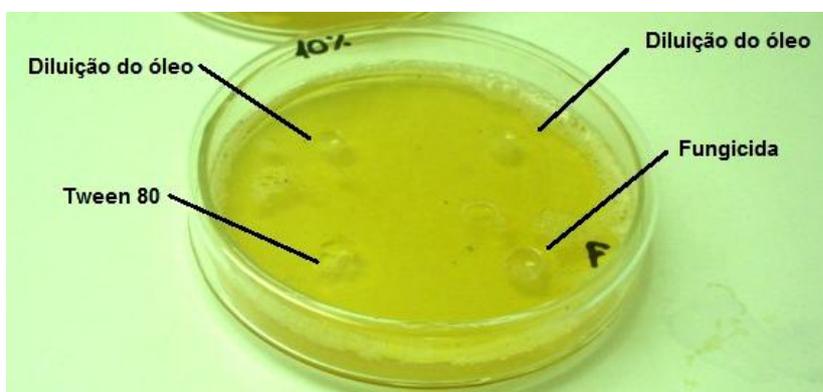


Figura 6 - Placa com meio solidificado e as cavidades de 6mm de diâmetro, onde em duas das cavidades foi adicionada a diluição do óleo, em uma das cavidades Tween 80 e na cavidade restante o Fungicida.

O sistema permaneceu incubado por 72 horas a 30°C e, após término do período de incubação, foi realizada a medida do diâmetro do halo em milímetros. Os experimentos foram conduzidos em seis réplicas.

## 3.2 ANÁLISES REALIZADAS NO SALAME TIPO ITALIANO

### 3.2.1 ELABORAÇÃO DO SALAME TIPO ITALIANO

Os salames foram elaborados conforme formulação padrão de uma cooperativa da cidade de Erechim-RS, a qual possui registro no Ministério de

Agricultura Pecuária e Abastecimento. As peças seguiram seu procedimento normal de fabricação até chegar na etapa de cura.

Foram separados 76 salames (20 para as análises com óleo de orégano, 20 para as análises com óleo de cravo e 10 para as análises com a mistura dos dois óleos. Um padrão para análise visual e 25 amostras padrão para análise sensorial de sabor). Assim que as peças entraram na sala de cura foram acompanhados Diariamente. Em torno de 15 dias após entrar na sala de cura os fungos esverdeados apareceram, foi realizada então a aplicação do óleo através de aspersão.

### 3.2.2 APLICAÇÃO DOS ÓLEOS NAS PEÇAS DE SALAME

Conhecidos os óleos e as suas concentrações que apresentaram melhor atividade antifúngica *in vitro*, realizou-se a aplicação dos óleos por aspersão nas peças de salame. Os óleos e as concentrações utilizadas foram: óleo de cravo nas concentrações de 125 e 250  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , óleo de orégano nas concentrações de 250 e 500  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e uma mistura (1:1 v/v) dos dois óleos com 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de concentração. As diluições foram preparadas com água destilada e Tween 80.

A Figura 7 mostra a peça de salame tipo italiano com uma aspersão da concentração de óleo (0,14 mL).



Figura 7 – Aspecto visual do salame tipo italiano com uma aspersão (0,14 mL) da concentração de óleo essencial.

Para as amostras destinadas à análise visual foram aplicadas as diluições apenas nas extremidades do salame ( 5 centímetros), região onde o fungo mais se desenvolve, foi escolhida essa região para aplicação com o objetivo de facilitar a identificação de crescimento ou ausência de crescimento após a adição do óleo.

A Figura 8 mostra a região do grampo (extremidade) de uma peça de salame tipo italiano com desenvolvimento do fungo de coloração esverdeada.



Figura 8 – Aspecto visual do crescimento do fungo de coloração esverdeada na região do grampo (extremidade) do salame tipo italiano.

Na análise sensorial de sabor, para que fosse possível se obter as amostras, o óleo foi aplicado em toda a peça. A diluição foi aplicada por aspersão, sendo que as aspersões foram aplicadas em toda a peça, porém sem se sobrepor, ou seja, cada parte do salame recebeu uma aspersão, sendo que cada uma lança 0,14 mL da diluição. Após a aplicação dos óleos as peças permaneceram mais 15 dias na sala de cura e após este período foram coletadas para a realização das análises visual e de sabor.

### 3.2.3 CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS

A análise sensorial de sabor foi realizada com o objetivo de verificar se existia diferença perceptível entre a amostra padrão (sem óleo) e as amostras com os óleos essenciais nas concentrações citadas no item anterior.

Foi utilizada uma avaliação pelo teste de comparação pareada, onde foram selecionados 40 julgadores não treinados, com idade entre 22 e 50 anos, todos consumidores do produto e conhecedores do seu processo de fabricação. Os julgadores receberam uma amostra identificada como padrão e cinco amostras codificadas onde uma era teste e as demais iguais ao padrão, as amostras foram

## Material e Métodos

---

servidas em temperatura ambiente e foi fornecida água para limpeza do palato. Através de uma ficha de avaliação (Figura 9) foi solicitado aos julgadores para que identificassem qual das amostras codificadas possuía sabor diferente da amostra padrão.

Você está recebendo 6 amostras de salame, 1 padrão e 5 codificadas, identifique qual das amostras codificadas possui SABOR DIFERENTE da amostra padrão.

-----

Figura 9 - Ficha de avaliação sensorial distribuída aos julgadores.

### 3.2.4 ANÁLISE VISUAL DISCRIMINATIVA PELO TESTE DE DIFERENÇA DO CONTROLE

A análise visual foi realizada pelo teste de diferença do controle (Dunnett) (QUEIROZ, TREPTOW, 2006). A característica avaliada foi a presença de fungos na região do grampo (ponta) do salame tipo Italiano com adição das mesmas concentrações do teste de sabor.

Participaram da avaliação visual 30 julgadores não treinados, todos consumidores deste produto e conhecedores do seu processo de fabricação, com idade variando entre 22 e 50 anos, de ambos os sexos.

Os testes foram realizados individualmente, com luz branca, por meio da comparação da região do grampo dos salames (ponta), apresentado uma amostra padrão especificada com a letra P e cinco amostras codificadas com 3 dígitos de números aleatórios (uma amostra de cada diluição descrita no item “Aplicação dos Óleos nas Peças de Salame”). Os julgadores foram solicitados a observar atentamente a região do grampo das amostras, comparando-as com a padrão (P), sem controle dos fungos, e avaliando o grau de diferença entre o padrão e as amostras codificadas, usando uma escala mista estruturada de 8 pontos, variando de nenhum crescimento (nota 0) a igual ao padrão (nota 8) em relação a presença visual de fungo.

## Material e Métodos

---

A Figura 10 mostra a ficha de avaliação distribuídas aos julgadores.

Você está recebendo 6 amostras de salame, 5 são codificadas e 1 padrão, compare a extremidade (região do grampo) das amostras codificadas com a amostra padrão **com relação a presença de fungo**. Escreva o código da amostra e marque com "x" o quadro que melhor descreve sua percepção.

Código da amostra					
8 Igual ao padrão					
7					
6 Pequena redução do padrão					
5					
4 Moderada redução do padrão					
3					
2 Grande redução do padrão					
1					
0 Sem crescimento					

Figura 10 - Modelo da Ficha de avaliação de análise visual.

### 3.3 Tratamento Estatístico

A análise estatística de comparação de médias para avaliar o efeito antifúngico dos dados das análises *in vitro*, realizou-se através do Teste de Tukey com 95% de confiança, usando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

Os resultados da análise sensorial visual foram avaliados através do teste de diferença do controle (Dunnnett com 95% de confiança), comparando-se a amostra padrão (P) com os demais tratamentos (QUEIROZ, TREPTOW, 2006).

Os Resultados da análise sensorial de sabor foram avaliados pelo teste de comparação pareada, analisando-se a significância do número de acertos (diferente do padrão) em relação ao número de erros (QUEIROZ, TREPTOW, 2006).

---

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nestes itens estão descritos os resultados obtidos através das análises realizadas, bem como a discussão dos mesmos através da comparação com outras pesquisas.

### 4.1 ANÁLISES REALIZADAS *IN VITRO*

Neste item estão relatados os resultados e as discussões referentes à identificação do fungo industrial e a determinação da concentração inibitória mínima *in vitro*.

#### 4.1.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO CONTAMINANTE

Os fungos coletados na sala de cura de uma cooperativa produtora de salames foram isolados pela cor dividindo-se em: branco e verde. O fungo branco foi identificado como *Penicillium* sp. (Figura 11a), provavelmente sendo o *Penicillium nalgiovense*, pois este fungo é o inoculado no produto das indústrias onde foram realizadas as coletas.

O fungo verde identificado como *Penicillium* sp. (Figura 11b), pela técnica de microcultivo. Segundo Andersen (1995) e Bremmelgaard (1998), fungos verdes podem produzir manchas pretas ou marrons que não são aceitas pelos consumidores, promovendo impacto negativo no sabor e no flavor, além de estarem associados à produção de penicilina que podem promover alergias se estiverem em grande quantidade.

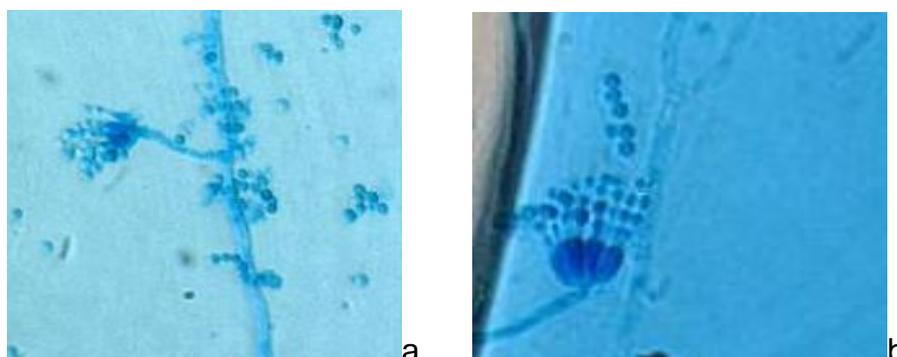


Figura 11 – Aspecto do Fungo branco (a) e fungo verde (b), identificados como *Penicillium* sp. pela técnica de microcultivo (aumento de 1000 vezes).

## 4.1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS (OES)

Os teores dos principais componentes encontrados nos óleos essenciais (OEs) avaliados, determinados através da análise por CG-EM, estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Principais compostos voláteis (% de área) encontrados nos OEs de alecrim, cravo-da-índia, orégano, sálvia e cravo-da-índia/orégano 1:1.

Composto	Área do pico (%)				
	Alecrim	Cravo-da-índia	Orégano	Sálvia	Orégano / Cravo-da-índia 1:1
1,8 Cineol	22,53	*	*	*	*
<i>p</i> -cimeno	*	*	10,06	*	6,82
$\gamma$ -terpineno	*	*	6,73	*	4,46
Linalol	*	*	3,57	23,08	1,66
Cânfora	16,72	*	0,94	*	1,06
$\alpha$ -terpineol	7,21	1,12	0,54	2,68	1,03
Acetato de linalila	*	7,75	*	64,53	0,84
Acetato de bornila	39,64	*	*	*	*
Timol	*	*	4,50	*	2,50
Carvacrol	*	*	60,71	*	42,72
Eugenol	*	89,58	*	*	29,92
Acetato de geraniol	*	*	*	1,65	*
Trans-cariofileno	*	*	4,35	1,67	3,80

\* Compostos não detectados

A composição química dos OEs é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários. Dentre estes fatores, podem-se ressaltar as interações planta-micro-organismos, planta-insetos e planta-planta; idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós-colheita (MORAIS, 2009).

Várias publicações têm apresentado dados sobre a composição química de diferentes OEs, constituídos por compostos majoritários até elementos traço, muitas vezes com efeito sinérgico entre os diferentes componentes nas atividades biológicas (BURT, 2004; BAUER et al., 2001).

No óleo essencial de alecrim, foi identificado como composto majoritário o acetato de bornila (39,64 %), seguido de 1,8-cineol e cânfora (Tabela 1). O OE de cravo-da-índia apresentou o eugenol como composto volátil majoritário (89,58 %) (Tabela 1), sendo que resultado semelhante foi obtido por Silvestri et al. (2010), com o eugenol representando 90,3 % dos compostos voláteis. Arenas et al. (2011) analisaram OE de cravo-da-índia, o qual teve o eugenol como principal componente, mas em percentagens menores (60,5 %).

O monoterpeno fenólico carvacrol foi o componente majoritário encontrado no OE de orégano (60,71 %) (Tabela 1), o qual apresenta conhecida atividade antimicrobiana (BURT, 2004). Silva et al. (2010) avaliaram OEs de orégano de cinco marcas comerciais distintas, tendo como composto majoritário o carvacrol, em percentagens que variaram entre 61,7 e 93,4 % do total de voláteis detectados em cada óleo. Percentuais bem inferiores de carvacrol (11,67 %) foram encontrados por Busatta et al. (2007) avaliando OE de orégano obtido a partir de folhas oriundas do Chile.

O OE de sálvia teve como composto volátil principal o éster acetato de linalila (64,53 %) (Tabela 1). No entanto, a pesquisa realizada por Pierozan et al. (2009) apontou como composto volátil majoritário na *Salvia officinalis* a  $\alpha$ -tujona (40,37 %). Conforme citado anteriormente, a diferença na composição dos óleos essenciais está relacionada a vários fatores, entre eles: a região de cultivo, variação geográfica, climática, genótipo e métodos para extrair o óleo. Estas variáveis podem interferir na composição química e na proporção dos compostos individuais do óleo essencial (OUSSALAH et al., 2007).

A mistura 1:1 de orégano e cravo-da-índia apresentou como majoritários o carvacrol (42,72 %) e o eugenol (29,92 %).

## 4.1.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os resultados da atividade antifúngica dos óleos essenciais testados sobre o fungo isolado de coloração verde (*Penicillium* sp.) encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2** - Diâmetro médio (mm) dos halos de inibição do fungo *Penicillium* sp, para as diferentes concentrações dos óleos essenciais testados.

Concentrações ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )	Diâmetro (mm) dos halos de inibição			
	Alecrim	Cravo	Orégano	Sálvia
1000	9,6 <sup>a</sup> ± 0,21	36,7 <sup>a</sup> ± 0,21	46,5 <sup>a</sup> ± 1,18	12,2 <sup>a</sup> ± 0,31
750	0 <sup>b</sup> ± 0	36,2 <sup>a</sup> ± 0,40	46,2 <sup>a</sup> ± 0,95	11,2 <sup>b</sup> ± 0,31
500	0 <sup>b</sup> ± 0	36,0 <sup>a</sup> ± 0,26	39,7 <sup>b</sup> ± 0,56	10,5 <sup>b</sup> ± 0,22
250	0 <sup>b</sup> ± 0	30,7 <sup>b</sup> ± 0,33	27,3 <sup>c</sup> ± 0,88	0 <sup>c</sup> ± 0
100	0 <sup>b</sup> ± 0	18,8 <sup>c</sup> ± 0,31	24,5 <sup>c</sup> ± 0,72	0 <sup>c</sup> ± 0
50	0 <sup>b</sup> ± 0	16,0 <sup>d</sup> ± 0,26	19,3 <sup>d</sup> ± 0,71	0 <sup>c</sup> ± 0
26	0 <sup>b</sup> ± 0	15,8 <sup>d</sup> ± 0,31	16,0 <sup>d</sup> ± 1,52	0 <sup>c</sup> ± 0
10	0 <sup>b</sup> ± 0	13,8 <sup>e</sup> ± 0,31	5,0 <sup>e</sup> ± 0,26	0 <sup>c</sup> ± 0
6	0 <sup>b</sup> ± 0	10,3 <sup>f</sup> ± 0,33	0 <sup>f</sup> ± 0	0 <sup>c</sup> ± 0

\* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O óleo de alecrim apresentou halo de inibição apenas em 1000  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de concentração, onde se verificou um halo de 9,6mm ( Tabela 2).

Genena et al. (2008) avaliaram a ação antioxidante e antimicrobiana de extrato de alecrim. A atividade antibacteriana foi determinada para *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* e a ação antifúngica para *C. albicans*. Os autores confirmaram as atividades antioxidantes, antibacterianas e antifúngicas do extrato de alecrim.

Benjlali et al. (1984) testaram o efeito de 6 óleos essenciais em 39 espécies de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e outros, sendo que o óleo de tomilho

foi o mais eficiente, seguido dos óleos de estragão (*Artemisia dracunculus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labil).

Hillen et al. (2012) estudaram o efeito dos óleos essenciais extraídos de *Eremanthus erythropappus* (candeia), *Cymbopogon martinii* (palmarosa) e de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) no crescimento micelial de fungos (*Alternaria carthami*, *Alternaria* sp. e *Rhizoctonia solani*) e no tratamento de sementes de milho, soja e feijão. No teste *in vitro*, utilizaram alíquotas de 20, 40, 60, 100, 200, 500 e 1000  $\mu\text{L}$  de cada um dos óleos essenciais, onde verificaram que o óleo de palmarosa inibiu completamente todos os patógenos fúngicos, independente da concentração. No entanto os óleos de candeia e alecrim foram melhores quando foram adicionadas alíquotas superiores a 200 $\mu\text{L}$ .

Daferera et al. (2003) pesquisaram o efeito de óleos essenciais de plantas no crescimento *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* var. *coeruleum* e *Clavibacter michiganensis*, os resultados encontrados mostraram que *in vitro* o óleo essencial de alecrim não foi eficiente no controle de *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* var. *coeruleum* e *Clavibacter michiganensis* nas concentrações estudadas, pois apenas a partir de 606 e 668 mg/mL foi possível constatar redução de 50% do crescimento micelial de *B. cinerea* e *Fusarium*, respectivamente.

Pereira et al. (2006) avaliaram o efeito *in vitro*, de óleos essenciais dos condimentos, alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), cebola (*Allium cepa* L.), manjerição (*Ocimum basilicum* L.), menta (*Mentha piperita* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.), sobre o desenvolvimento micelial dos fungos *A. niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium* sp. Referente ao óleo de alecrim concluíram que em relação ao fungo *A. ochraceus* o índice de inibição do desenvolvimento micelial é proporcional ao aumento das concentrações testadas, os fungos *Fusarium* sp. e *A. flavus* tiveram o seu desenvolvimento micelial afetado a partir das concentrações de 1500 e 2000 mg/mL, respectivamente. Já o fungo *A. niger* não teve o seu desenvolvimento micelial afetado nas concentrações testadas. Resultados estes que vem ao encontro aos resultados encontrados onde o óleo de alecrim apresentou halo de inibição apenas com 1000  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de concentração.

A grande variabilidade que ocorre entre resultados obtidos a partir de óleos de uma mesma planta está relacionada com as variáveis da planta e condições de

## Resultados e Discussão

cultivo, variação geográfica, climática, genótipo e métodos para extrair o óleo, estes fatores podem interferir na composição química e proporção dos compostos individuais do óleo essencial (OUSSALAH et al., 2007).

A Figura 12 mostra o crescimento do fungo estudado nas placas com óleo essencial de alecrim com  $1000 \mu\text{L mL}^{-1}$  de concentração (a), onde houve formação de um pequeno halo de inibição (9,6 mm) e com  $750 \mu\text{L mL}^{-1}$  de concentração (b), onde é possível verificar que não houve formação de halo de inibição.

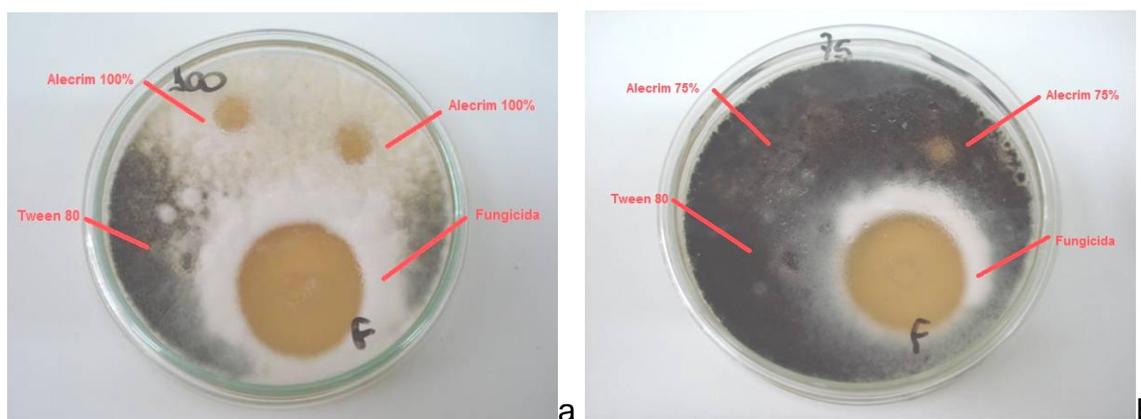


Figura 12 - Crescimento do fungo estudado (verde) nas placas com óleo essencial de alecrim com  $1000 \mu\text{L mL}^{-1}$  (a) e  $750 \mu\text{L mL}^{-1}$  (b) de concentração.

Ainda observando a Tabela 2, pode-se verificar que o óleo de sálvia apresentou halo de inibição para as concentrações de 500, 750 e  $1000 \mu\text{L mL}^{-1}$ , com formação de halo de inibição de 10,5, 11,2 e 12,2 mm, respectivamente. Santurio (2011) cita em seu estudo a pesquisa realizada por Pozzatti et al. (2008) que ao investigarem a atividade antifúngica do óleo essencial de sálvia, também não conseguiram evidenciar a atividade antifúngica deste óleo frente as diversas cepas de *Candida* spp.

Pinto et al. (2007) estudaram a composição e a atividade antifúngica do óleo de *Salvia officinalis*, foram testadas três amostras do óleo essencial obtido por hidrodestilação (A, B e C) e uma amostra comercial (D). A atividade antifúngica dos óleos foi avaliada pela concentração inibitória mínima (CIM) contra vários fungos entre eles *Penicillium*, contra este micro-organismo o óleo apresentou CIM de 0,63  $\mu\text{L/mL}$  para a amostra de óleo A; 2,5  $\mu\text{L/mL}$  para a amostra B e 2,5-5  $\mu\text{L/mL}$  para as

## Resultados e Discussão

amostras C e D, o que demonstra o quanto os resultados podem ser variáveis mesmo com amostras obtidas da mesma planta.

A Figura 13 mostra o crescimento do fungo estudado nas placas com óleo essencial de sálvia com  $1000 \mu\text{L mL}^{-1}$  (a),  $750 \mu\text{L mL}^{-1}$  (b) e  $500 \mu\text{L mL}^{-1}$  (c) de concentração.

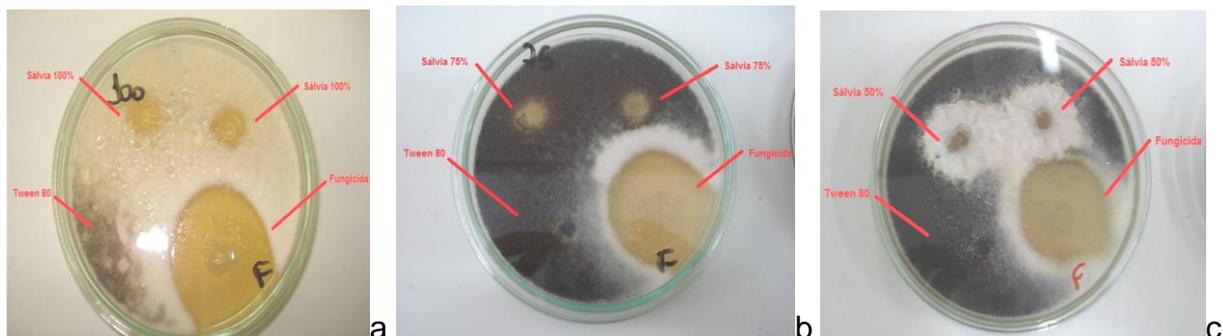
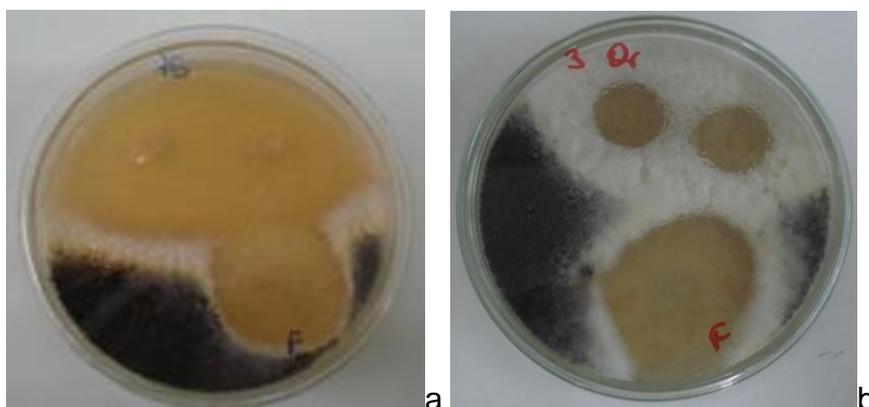


Figura 13 - Crescimento do fungo estudado (verde) nas placas com óleo essencial de sálvia com  $1000 \mu\text{L mL}^{-1}$  (a),  $750 \mu\text{L mL}^{-1}$  (b) e  $500 \mu\text{L mL}^{-1}$  (c) de concentração.

Os óleos de cravo e orégano foram os que apresentaram melhores resultados, proporcionando halos de inibição mesmo nas concentrações mais baixas, demonstrando assim, potencial fungicida (Tabela 2). Observa-se também um aumento progressivo no diâmetro dos halos com o aumento da concentração até  $750 \mu\text{L mL}^{-1}$  para orégano e até  $500 \mu\text{L mL}^{-1}$  para cravo.

As Figuras 14 e 15 mostram o crescimento do fungo estudado nas placas com óleo essencial de orégano e cravo com  $750 \mu\text{L mL}^{-1}$  (a) e  $26 \mu\text{L mL}^{-1}$  (b) e  $500 \mu\text{L mL}^{-1}$  (a) e  $6 \mu\text{L mL}^{-1}$  (b) de concentração, respectivamente.



## Resultados e Discussão

Figura 14 - Crescimento do fungo estudado (verde) nas placas com óleo essencial de orégano com 750  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (a) e 26  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (b) de concentração.

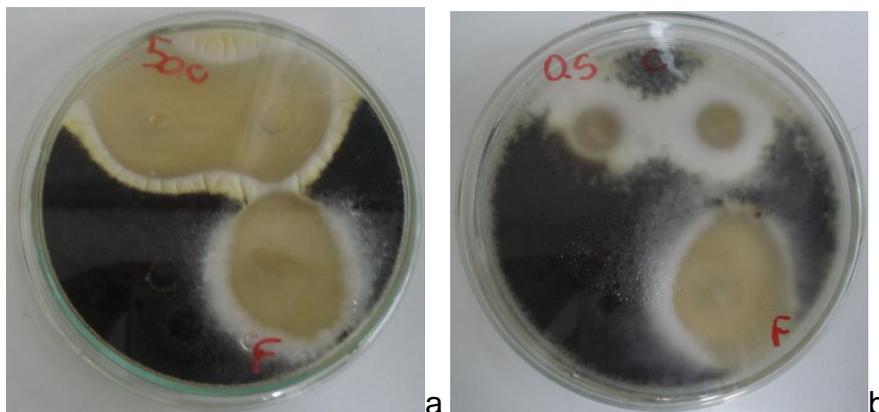


Figura 15 - Crescimento do fungo estudado (verde) nas placas com óleo essencial de cravo com 500  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (a) e 6  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (b) de concentração.

Souza et al. (2004) encontraram ótimos resultados do óleo de cravo contra o desenvolvimento micelial de fungos, onde concluíram que na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$ , o óleo de cravo apresenta inibição ao desenvolvimento e a produção de toxinas de *Aspergillus parasiticus*, apresentando assim, maior inibição que o óleo de orégano e elevado poder antimicrobiano.

Omidbeygi et al. (2007) testaram a atividade antifúngica de óleos essenciais de tomilho e cravo contra o desenvolvimento de *Aspergillus*, os óleos essenciais foram adicionados nas concentrações de 0, 50, 200, 350 e 500 ppm. Os resultados mostraram que ambos os óleos essenciais podem inibir o crescimento do micro-organismo.

Gupta et al. (2011) avaliaram a ação dos óleos essenciais de menta, erva cidreira, cravo e eucalípto contra o crescimento de *Fusarium oxysporum* (fungo patogênico em plantas). Foi utilizado o método de difusão em disco para testar a atividade antifúngica dos óleos essenciais e verificou-se que o óleo de cravo foi o que apresentou a maior inibição em termos do diâmetro médio da zona de inibição, apresentando halo de inibição de  $5,3 \pm 0,2$  cm para a concentração de 10% de óleo e  $6,6 \pm 0,9$  cm com 20% de concentração de óleo.

Núñez et al. (2001) estudaram as propriedades antifúngicas do óleo de cravo em solução de açúcar, os micro-organismos testados foram *Candida albicans*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger* e *Trichophyton mentagrophytes*. Os resultados

mostraram que o efeito fungicida aumentou a 37°C; a esta temperatura e em um tempo de contacto curto (cerca de 1 minuto) foi possível eliminar um inóculo microbiano de 10<sup>6</sup> ufc/mL de *C. albicans*. Apesar do óleo essencial de cravo causar efeito letal importante, *P. citrinum*, *A. niger* foram mais resistentes. Após 60 minutos o óleo essencial de cravo (0,4% v/v) em solução concentrada de açúcar apresentou uma redução de 99,6% da população inicial (10<sup>6</sup> UFC/mL) de *Trichophyton mentagrophytes*. A atividade fungicida do óleos de cravo em *C. albicans*, após 2 minutos de contato, foi semelhante ao de desinfetantes comumente usados em hospitais, tais como povidona-iodo e cloroxilenol.

Pereira et al. (2006) avaliaram o efeito *in vitro*, de óleos essenciais condimentares, entre eles o óleo de orégano (*Origanum vulgare* L.), sobre o desenvolvimento micelial dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium* sp. Onde constataram que a partir de 500 mg/mL todos os fungos estudados tiveram o desenvolvimento significativamente inibido, com exceção do fungo *Aspergillus niger*, que apresentou redução a partir da concentração de 1000 mg/mL, evidenciando o poder antimicrobiano do orégano.

Mitchell et al. (2010) testaram a efetividade do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L., *Lamiaceae*) como inibidor do crescimento de espécies de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* e *A. ochraceus*). O óleo essencial apresentou um significativo efeito inibitório, a CIM foi de 0,6 µL.mL<sup>-1</sup>, para todos os fungos ensaiados. Relatam ainda que as principais alterações morfológicas provocadas pelo óleo essencial em *A. parasiticus*, observadas sob microscopia óptica, foram ausência de conidiação, perda de citoplasma, perda de pigmentação e ruptura de estrutura celular.

Souza et al. (2008) estudaram a interferência do aquecimento sobre a atividade antimicrobiana e a composição química do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*), onde concluíram que o óleo essencial apresentou intensa atividade antimicrobiana sobre todas as amostras microbianas ensaiadas (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* e *Serratia marcescens*), mostrando amplos halos de inibição do crescimento microbiano (30 a 42 mm), sendo

que o aquecimento do óleo essencial de *O. vulgare* não mostrou interferência sobre sua propriedade antimicrobiana.

Carmo et al. (2008) avaliaram o potencial do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) em inibir o crescimento de algumas cepas de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. terreus* and *A. fumigatus*), neste estudo o óleo essencial revelou grande atividade provocando a inibição de todas as cepas fúngicas ensaiadas. Os valores da CIM estiveram entre 80 e 20  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , nas concentrações de 80 e 40  $\mu\text{L}/\text{mL}$  o óleo essencial causou efeito fungicida sobre *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger* notado por apresentar total inibição do crescimento micelial radial ao longo de 14 dias de interação, também foi capaz de inibir a germinação de esporos destas cepas fúngicas.

Diversos estudos trazem resultados que mostram a capacidade dos óleos essenciais contra o crescimento de fungos, no entanto são raros os que explicam os mecanismos pelos quais os óleos agem impedindo o crescimento destes microorganismos. Alguns autores afirmam que a ação antifúngica dos óleos está ligada a perturbação na membrana citoplasmática, às modificações causadas nas proteínas da membrana, à inibição da força motriz de prótons, do fluxo de elétron, do transporte ativo e da coagulação dos conteúdos celulares. Outros explicam ainda que a atividade antifúngica esteja relacionada às características hidrofóbicas, as quais permitem quebrar os lipídeos da membrana celular e da mitocôndria, causando modificações na estrutura e aumentando a permeabilidade, o que causa vazamento de componentes celulares tais como os íons (SAGGIORATO, 2008; BURT, 2004; CARSON et al., 2002; ULTEE e SMID, 2001; ULTEE et al., 2000, 2002; ULTEE et al., 1999; OOSTERHAVEN et al., 1995; JUVEN et al., 1994; SIKKEMA et al., 1994; KNOBLOCH et al., 1989).

#### **4.2 ANÁLISES REALIZADAS NO SALAME TIPO ITALIANO**

Através resultados obtidos foram escolhidos os óleos de cravo e orégano para serem aplicados na superfície do salame, as concentrações aplicadas para ambos os óleos foram escolhidas por serem as primeiras a apresentar diferença significativa, 500  $\mu\text{L mL}^{-1}$  para óleo de orégano e 250  $\mu\text{L mL}^{-1}$  para óleo de cravo,

## Resultados e Discussão

também foi testada a metade de cada uma destas concentrações e uma mistura dos dois óleos (1:1 v/v) com  $100 \mu\text{L mL}^{-1}$  de concentração.

A Figura 16 mostra os salames em diferentes estágios do processo de cura. Observou-se que a partir de 15 dias, já ocorre o crescimento dos fungos contaminantes (*Penicillium* sp.).



Figura 16 - Aspecto visual do Salame tipo Italiano em diferentes estágios do processo de cura.

(a) Logo após o processo de defumação (1 dia); (b) início do desenvolvimento da cultura starter *Penicillium nalgiovense* (8 dias); (c) durante o processo de fermentação com cultura starter já desenvolvida e início do crescimento dos fungos verdes (15 dias); (d) crescimento do fungo de coloração verde em uma peça de salame tipo Italiano.

#### 4.2.1 ANÁLISE SENSORIAL DE SABOR

Embora os óleos essenciais sejam bastante estudados, o seu uso em alimentos como substâncias antimicrobianas são bastante limitadas devido à alteração dos sabores, pois doses eficazes contra micro-organismos podem mudar a aceitabilidade do produto. Como consequência, há uma demanda crescente para determinar as concentrações dos óleos essenciais que permitam atingir um balanço entre a eficácia como agente antimicrobiano e a aceitabilidade sensorial (KOUTSOUMANIS et al., 1998).

Neste sentido, foram feitas análises sensoriais (sabor) da aplicação de diferentes concentrações dos óleos essenciais de cravo e orégano, sobre a superfície de salame tipo italiano, a fim de determinar as concentrações possíveis de serem utilizadas no produto sem que venham a promover alterações sensoriais significativas. Os resultados da análise sensorial referentes ao sabor estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Teste de comparação pareada para análise de sabor de salames com aplicação superficial de diferentes concentrações de óleos essenciais em relação ao padrão (sem óleo essencial).

	Cravo 250 $\mu\text{L mL}^{-1}$	Cravo 125 $\mu\text{L mL}^{-1}$	Orégano 500 $\mu\text{L mL}^{-1}$	Orégano 250 $\mu\text{L mL}^{-1}$	Cravo/Orégano 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$
Nº acertos	35	19	37	30	21
Nº erros	5	21	3	10	19
Significância	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$

A análise sensorial revelou que as amostras com 125  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de óleo de cravo e com a mistura de óleo de cravo e orégano (1:1) com 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de concentração não apresentaram diferença significativa quando comparadas com a amostra padrão em relação ao sabor ( $p > 0,05$ ), ou seja, os julgadores não perceberam diferença de sabor entre as amostras acima citadas e a amostra padrão (sem adição de óleo), o que possibilita a utilização do óleo sem a alteração no sabor

padrão do produto nestas concentrações. Concentrações de  $250 \mu\text{L mL}^{-1}$  foram percebidas pelos provadores, alterando as características do produto, ainda com comentários de aceitação, principalmente do óleo de cravo.

#### 4.2.2 ANÁLISE VISUAL

Visando avaliar a eficácia dos óleos essenciais de cravo, orégano e da mistura de ambos, foram feitas aplicações destes na região do grampo (extremidade) do salame tipo Italiano (onde ocorre a maior incidência dos fungos contaminantes), com adição das mesmas concentrações do teste de sabor.

A Figura 17 mostra a região avaliada das seis amostras apresentadas e os resultados referentes à análise visual estão apresentados na Tabela 4.



Figura 17 - Região avaliada nas seis amostras apresentadas.

P = Padrão; A= Óleo de cravo em  $250 \mu\text{L mL}^{-1}$  de concentração; B= Óleo de cravo em  $125 \mu\text{L mL}^{-1}$  de concentração; C= Óleo de orégano em  $500 \mu\text{L mL}^{-1}$  de concentração; D= Óleo de orégano em  $250 \mu\text{L mL}^{-1}$  de concentração; E= Mistura (1:1) dos óleos de cravo e orégano em  $100 \mu\text{L mL}^{-1}$  de concentração.

## Resultados e Discussão

**Tabela 4** - Teste de diferença do controle, análise visual do controle de fungos em salames através da aplicação superficial de diferentes concentrações de óleos essenciais em relação ao padrão (sem óleo essencial).

	Cravo 250 $\mu\text{L mL}^{-1}$	Cravo 125 $\mu\text{L mL}^{-1}$	Orégano 500 $\mu\text{L mL}^{-1}$	Orégano 250 $\mu\text{L mL}^{-1}$	Cravo/Orégano 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$	Padrão (sem óleo)
Média	1,07 <sup>b</sup>	1,60 <sup>b</sup>	0,77 <sup>b</sup>	0,73 <sup>b</sup>	0,73 <sup>b</sup>	7,63 <sup>a</sup>

Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente da amostra padrão com 95% de confiança (Dunnett).

A análise visual revelou que todas as amostras apresentaram diferença significativa quando comparadas com a amostra padrão com relação à presença de fungos na região do salame onde foi aplicado o óleo, ou seja, os julgadores perceberam que as amostras que receberam óleo essencial apresentaram redução na quantidade de fungos quando comparadas com a amostra padrão. Entre as amostras que receberam óleo não houve diferença significativa, ou seja, todas as concentrações testadas dos óleos essenciais de cravo, orégano e mistura (1:1) destes, inibiram o crescimento do fungo.

Considerando-se a eficácia de todos os tratamentos na análise visual e do sabor, conclui-se que as concentrações de 125  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de óleo de cravo e a mistura de óleo de cravo e orégano (1:1) com 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$  podem ser recomendadas como tratamento curativo, ou seja, capaz de controlar o crescimento de fungos indesejáveis em superfícies de salame durante o processo industrial de cura, sem alterar as características do sabor original do produto. Estes resultados indicam ainda, que o composto majoritário carvacrol presente no óleo essencial de orégano é o principal responsável pela alta atividade antifúngica observada, embora possivelmente com efeito sinérgico do eugenol no tratamento com a mistura de cravo e orégano.

## 5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados das análises *in vitro*, foi possível verificar que contra o fungo estudado os óleos de alecrim e sálvia não apresentaram bons resultados, já os óleos de cravo e orégano apresentaram halos de inibição mesmo nas menores concentrações testadas.

O óleo de cravo apresentou halo de inibição entre 36,7mm e 10,3mm para as concentrações de 1000  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e 6  $\mu\text{L mL}^{-1}$  respectivamente, apresentando a primeira diferença significativa na concentração de 250  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (30,7 mm de halo).

O óleo de orégano apresentou halo de inibição entre 46,5mm e 5mm para as concentrações de 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$  respectivamente, apresentando a primeira diferença significativa na concentração de 500  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (39,7mm de halo).

Os resultados da análise sensorial de sabor mostraram que a adição dos 250  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de óleo de cravo e 500  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e 250  $\mu\text{L mL}^{-1}$  do orégano causam diferença perceptível no sabor do salame em comparação com o sabor do salame sem adição de óleo. Porém isso não indica que o sabor causado pela adição do óleo não seja aceitável, apenas que existe diferença e que a mesma é perceptível. Já as amostras com 125  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de óleo de cravo e com 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da mistura de óleo de cravo e orégano (1:1) não apresentaram alteração significativa no sabor quando comparadas com a amostra sem adição de óleo.

Os resultados da análise visual comprovam que a aspersão do óleo inibe o crescimento do fungo estudado, e que quando comparadas as amostras com adição de óleo e a amostra sem adição de óleo é possível perceber visualmente a inibição do crescimento do fungo.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nas conclusões obtidas através deste estudo, bem como dos conhecimentos adquiridos, seriam bem vindos estudos que avaliassem a ação antifúngica dos componentes isolados dos óleos essenciais, possibilitando definir quais são os compostos com maior ação antifúngica, evitando assim a adição de compostos que prejudicam a aceitação sensorial quando aplicado em produtos alimentício.

Outra possibilidade é avaliar a mistura dos óleos de cravo e orégano *in vitro*, para verificar os halos de inibição com a possível ação sinérgica do eugenol e do carvacrol.

Também é viável realizar análise sensorial com o objetivo de verificar a aceitação dos salames aspergidos com óleos essenciais, tendo em vista que neste trabalho o objetivo foi apenas identificar se havia diferença significativa.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, P. B.; VICTOR, M. M. Reação da cânfora com boroidreto de sódio: uma estratégia para o estudo da estereoquímica da reação de redução. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2274-2278, 2010.

ANDERSEN, S. J. Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 426-429, 1995.

ANTUNES, O. A. C. Interfaces com a indústria. **Química Nova**, v. 28, suplemento, p. s64-s75, 2005.

ARENAS, D. R. M.; AZEVEDO, A.M.; MÉNDEZ, L. Y. V.; KOUZNETSOV, V. V. Scavenger activity evaluation of the clove bud essential oil (*Eugenia caryophyllus*) and eugenol derivatives employing ABTS+• decolorization. **Scientia Pharmaceutica**, v. 79, n. 4, p. 779–791, 2011.

BACKES, A. M. **Desenvolvimento de produto cárneo fermentado adicionado de óleo de canola**. 2011. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; SUN C. K. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, n.2, p.117-22, 2008.

BARNETT, H. L.; BARRY, B.; HUNTER B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. TITLE. 1986.

BAUER, K., GARBE, D., SURBURG, H. **Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses**. Wiley-VCH, Weinheim, p. 293. 2001.

BENJILALI, B.; TANTAQUI-ELARAKI, A.; AYADI, A.; IHLAL, M. Method to study antimicrobial e effects of essential oils: application to the antifungal activity of six moroccan essences. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 47, n. 10, p. 748-752, 1984.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOTRE, D. A.; SOARES, N. F. F.; ESPITIA, P. J. P.; SOUSA, S.; RENHE, I. R. T. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Revista Ceres**, v.57, n. 3, p. 283-291, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria da defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº. 22, de 31 de julho de 2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Salame Tipo Italiano**. Publicado no Diário Oficial da União de 03/08/00.

BREMMEGAARD, A. Truslen fra multiresistente mikroorganismer. **Ugeskrift for Laeger**, v. 160, p.6329–6344, 1998.

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, Aug. 2004.

BUSATTA, C.; MOSSI, A.J.; RODRIGUES, A.R.M.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, J.V. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 610-616, 2007.

CAMPOS, W. G.; FARIA, A. P.; OLIVEIRA, M. G. A.; SANTOS, H. L. Induced response against herbivory by chemical information transfer between plants. **Brazilian Society of Plant Physiology**, v. 20, n. 4, p. 257-266, 2008.

CARMO, E. S.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L. S. The potential of *oreganum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 362-367, 2008.

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

CARVALHO, H. H. C.; CRUZ, F.T.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 3, p. 25-32, 2005.

CASABURI, A.; BLAIOTTA, G.; MAURIELLO, G.; PEPE, O.; VILLANI, F. Technological Activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* Strains Isolated from Fermented Sausages. **Meat Science**, v.71, p. 643-650, 2005.

CASTELLANI, D. C.; DOMENICO, C. I.; RONCOLETTA, L. M. A.; SILVA, A. C.; TOZAKI, R. M.; OLIVEIRA, D. H. Coeficientes técnicos de produção de pripioca (*Cyperus articulatus* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, especial, p. 606-611, 2011.

CASTRO, C. E.; RIBEIRO, J. M.; DINIZ, T. T.; ALMEIDA, A. C.; FERREIRA, L. C.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R. Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 293-297, 2011.

CASTRO, L. C.; LUCHESE, R. H.; MARTINS, J. F. P. *Effect of Penicillium nalgiovense* starter culture on salami quality. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n. 1, 2000.

CIROLINI, A.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N.; MILANI, L. I. G.; URNAU, D. Salame tipo italiano elaborado com culturas *starters* nativas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 771-779, 2010.

Referências Bibliográficas

---

DAFERERA, D. J.; ZIOGASB, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v.22, n.1, p.39-44, 2003.

DELAMARE, A. P. L.; MOSCHEN-PISTORELLO, I. T.; ARTICO, L.; ATTI-SERAFINI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia tribola* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v.100 p. 603-608, 2007.

DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; XIRAPHI, N.; MOSCHONAS, G.; GAITIS, F.; METAXOPOULUS, J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v. 69, n. 2, p. 307-317, 2005.

ESSID, I.; ISMAIL, H.B.; AHMED, S.B.H.; GHEDAMSI, R.; HASSOUNA, M. Characterization and technological properties of *Staphylococcus xylosus* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. **Meat Science**, v. 77, n. 2, p. 204-212, 2007.

EVANS, W.C. **Pharmacognosy**. 15th ed. Toronto: W. B. Saunders, 2002.

FURLAN, M. R. **Ervas e temperos: cultivo e comercialização**. Cuiabá: SEBRAE, MT, 1998. 128 p.

GENENA, A. K.; HAIKO, H.; SMÂNIA, A. J.; SOUZA, S. M. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 463-469, 2008.

GUPTA, A.; SHARMA, S.; NAIK, S. N. Biopesticidal value of selected essential oils against pathogenic fungus, termites, and nematodes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 703e707, 2011.

HIDALGO, M. E.; DE LA ROSA, C.; CARRASCO, H.; CARDONA, W.; GALLARDO, C.; ESPINOZA, L. Antioxidant capacity of eugenol derivatives. **Química Nova**, v. 32, n. 6, 1467-1470, 2009.

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MESQUINI, R. M.; CRUZ, M. E. S.; STANGARLIN, J. R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.3, p.439-445, 2012.

JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. **Trend in Food Science & Technology**. v. 18, n. 1, p. 567-578, 2007.

JUVEN, B.J., KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 626–631, 1994.

Referências Bibliográficas

---

KAMATOU, G. P. P.; MAKUNGA, N. P.; RAMOGOLA, W. P. N.; VILJOEN, A. M. South African *Salvia* species: a review of biological activities and phytochemistry. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 664-672, 2008.

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M.; STEENKAMP, P. Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 684-688, 2010.

KNOBLOCH, K.; IBERL, A. P. B.; WEIGAND, H.; WEIS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, p. 119– 128, 1989.

KOUTSOUMANIS, K.; TASSOU, C. C.; TAOUKIS, P. S.; NYCHAS, G. J. E. Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 981-987, 1998.

LAUXEN, F. R. **Estudo do efeito repelente, inseticida e antifúngico do óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. no controle de insetos e fungos em grãos armazenados.** 2012. 64p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim-RS.

LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; DE VUYST, L. Functional Meat Starter Cultures for Improved Sausage Fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 270-285, 2006.

MARANGONI, C.; MOURA, N. F. Antioxidant activity of essential oil from *Coriandrum Sativum* L. in Italian salami. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 124-128, 2011.

MARQUES, P. A. A.; FILHO, L. B.; SANTOS, A. C. P. Crescimento, produção de óleo essencial e trocas gasosas em orégano influenciados por diferentes lâminas de irrigação. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1888-1892, 2009.

MATOS, C. R. **Parahidroxifenilsalicilamida e natamicina no controle de fungos na superfície de salames tipo Milano**, 2009. 71p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

MAY, A.; SUGUINO, E.; MARTINS, A. N.; BARATA, L. E. S.; PINHEIRO, M. Q. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.12 n.2, p. 195-200, 2010.

MEDEIROS, E. A. A.; SOARES, N. F. F.; POLITO, T. O. S.; SOUSA, M. M.; SILVA, D. F. P. Sachês antimicrobianos em pós-colheita de manga. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. Especial p. 363-370, 2011.

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**, 2004. 72p. Dissertação (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MITCHELL, T. C.; STAMFORD, T. L. M.; SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; CARMO, E. S. *Origanum vulgare* L. essential oil as inhibitor of potentially toxigenic *Aspergilli*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 755-760, 2010.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MORAIS, L.A.S. de. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v.27, n. 2, s4050-4063 (Suplemento - CD Rom), 2009.

MORAIS, S. M.; JUNIOR, F. E. A. C.; SILVA, A. R. A.; NETO, J. S. M. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L.; PAROUL, N.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, J. V.; PIEROZAN, M. K.; PAULETTI, G.; ROTA, L.; SANTOS, A. C. A.; SERAFINI, L. A. Morphological characterisation and agronomical parameters of different species of *Salvia* sp. (Lamiaceae). **Brazilian journal of Biology**, v. 71, n. 1, 2011.

MUGUERZA, E.; GIMENO, O.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. New formulations for healthier dry fermented sausages: a review. **Trend in Food Science and Technonology**, v.4, n.1, p. 452 – 457, 2004.

NÚÑEZ, L.; D'AQUINO, M.; CHIRIFE, J. Antifungal properties of clove oil (*Eugenia caryophyllata*) in sugar solution. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p. 123-126, 2001.

OLIVEIRA, L. M.; NEPOMUCENO, C. F.; FREITAS, N. P.; PEREIRA, D. M. S.; SILVA, G. C.; LUCCHESI, A. M. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. Ex Benth. e *Hyptis platanifolia* Mart ex Benth. (Laminaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 13, n. 1, p. 73-78, 2011.

OMIDBEYGI, M.; BARZEGAR M.; HAMIDI Z.; NAGHDIBADI H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus Xavus* in liquid medium and tomato paste. **Food Control**, v.18, p.1518–1523, 2007.

OOSTERHAVEN, K.; POOLMAN, B.; SMID, E.J., S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. **Industrial Crops and Products**, v. 4, p. 23–31, 1995.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Spaphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 414-420, 2007.

Referências Bibliográficas

---

PAULA, J.A.M.; REIS, J.B.; FERREIRA, L.H.M.; MENEZES, A.C.S.; PAULA, J.R. Gênero *Pimenta*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.3, p.363-379, 2010.

PEÑA, M. **Histamina e tiramina em embutidos cárneos**. 2006. 84p. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS.

PEREIRA M. C.; VILELA, G. R.; COSTAS, L. M. A. S.; COSTAS, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciências Agrotécnicas**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PIEROZAN, M.K.; PAULETTI, G.F.; ROTA, L.; SANTOS, A.C.A.; LERIN, L., DI LUCCIO, M.; MOSSI, A.J.; ATTI-SERAFINI, L.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 764-770, 2009.

PINTO, E.; SALGUEIRO, L. R.; CAVALEIRO, C.; PALMEIRA, A.; GONÇALVES, M. J. *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. **Industrial Crops and Products** , v. 26, p. 135–141, 2007.

POZZATTI, P., SCHEID, L. A.; SPADER, T. B.; ATAYDE, M. L.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida spp.* **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 950-956, 2008.

PRÄNDL, O.; FISCHER, A.; SCHIMIDNOFER, T. & SMELL, H.J. **Tecnologia e Higiene de la Carne**, Zaragoza: Acribia, 1994, 854 p.

QUEIROZ, M. I.; TREPTOW, R. O. **Análise sensorial para a avaliação da qualidade de alimentos**. Rio Grande, RS, Editora da FURG, 2006. 266p.

RADULESCU, V.; CHILIMENT, S.; OPREA, E. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*. **Journal of Chromatography**, v. 1027, n. 1-2, p. 121-126, 2004.

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M. **Microbiologia Prática: Roteiro e manual. Bactérias e Fungos**. São Paulo: Atheneu, 1998.

RODRIGUES, F.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Diferentes condimentos vegetais: avaliação sensorial e de atividade antimicrobiana em preparação alimentar com frango cozido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 342-348, 2011.

SAGGIRATO, A. M. **Atividade antifúngica e antioxidante *in vitro* e na superfície de salame tipo italiano do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L)**,

Referências Bibliográficas

---

2008. 154p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. Introduction to food-borne fungi. **Centraalbureau voor Schimmelcultures barn delft**, fourth edition. 322p 1995.

SANTURIO, D. F.; COSTA, M. M.; MABONI, G.; CAVALHEIRO, C. P.; DE SÁ, M. F.; DAL POZZO, M.; ALVES, H. S.; FRIES, L. L. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, v.41, n.6, p.1051-1056, 2011.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B., Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, n. 11, p. 8022–8028, 1994.

SILVA, J. P. L. DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PEREZ, D. V.; FRANCO, B. D. G. M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis* **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.30, n.1, p. 136-141, 2010.

SILVA, R. S.; RIBEIRO, C. M. R.; BORGES, M. N.; BLOIS, G. S. O. Óleo essencial de limão no ensino da cromatografia em camada delgada. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2234-2237, 2009.

SILVESTRI, J. D. F., PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. 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, 2010.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M; LIMA, E. O.; BARBOSA, J. M. F.; MARQUES, M. O. M. Interference of heating on the antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 418-422, 2008.

SOUZA, S. M. C.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciências Agrotecnicas**, v. 28, n. 3, p. 685-690, 2004.

TERRA, A. B. M.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. **Particularidades na fabricação de salame**. São Paulo: Livraria Varela, 2004. 152 p.

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**, São Leopoldo: Editora Unisinos, 1998. 216p.

ULTEE, A.; BENNINK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561–1568, 2002.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F. A.; SMID, E. J. I. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**, v. 174, n. 4, p. 233–238, 2000.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4606–4610, 1999.

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

UPNMOOR, I. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Guaíba: Agropecuária, 2003. 56p.

VALERIANO, C.; PICCOLI, R.H.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.

VURAL, H. The use of commercial starter cultures in the production of turkish semi-dry fermented sausages. **Zeitschrift Lebensm Unters Forsch A**, v. 207, n. 5, p. 410-412, 1998.

YAMADA, E. A. A Produção de Salames. **Revista Nacional da Carne**, n. 220, P. 72-75, 1995.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; FERNANDES, A. J. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 828-833, 2009.