

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO



**POTENCIAL DO EFEITO ANTIBACTERIANO DO ÓLEO ESSENCIAL
DE HORTELÃ (*Mentha piperita* L) NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO
DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM SORO DE QUEIJO COALHO.**

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

**POTENCIAL DO EFEITO ANTIBACTERIANO DO ÓLEO ESSENCIAL
DE HORTELÃ (*Mentha piperita* L) NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO
DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM SORO DE QUEIJO COALHO.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Nutrição como requisito para conclusão do
Curso de Bacharel em Nutrição

Aluna: Raphaella Mendes Lima

Orientadora: Erilane de Castro Lima Machado

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO, 2010

[reservado para ficha catalográfica]

[reservado para folha de aprovação]

Dedicatória

À Deus, senhor da minha vida.
À minha Amada e Preciosa Avó,
Companhia fiel nas madrugadas de estudo.
Aos meus queridos Pai e Mãe,
Por quem tenho um amor incondicional.
Ao Meu Namorado, Amor da minha vida.

Agradecimentos

À Deus, senhor da minha vida, pela sabedoria a mim concedida na escolha da minha profissão. Por estar sempre ao meu lado e me cobrir com sua santa paz e bendito Amor. É tua senhor, a vitória alcançada em minha Vida;

Aos meus queridos Pais, Eliane Mendes Lima e Ivaldo Ribeiro Lima, pelo amor e apoio em cada etapa vencida desta minha trajetória, e imensuráveis esforços para que eu chegasse até aqui, pela educação que me deram, pela confiança no meu potencial, por estarem sempre presentes tantos nos momentos felizes e tristes, me ajudando a reerguer a cabeça e seguir em frente, pelas palavras que me acalmavam e me davam a certeza de que tudo iria dá certo...e deu! Estou aqui concluindo meu curso. Eu amo vocês, meus fies companheiros;

A minha adorável Vozinha, Aurelita Mendes Melo (Chujuscula e chuquinha minha), por todo amor e carinho depositados a mim, as palavras de incentivo, pelo melhor colo, pela companhia nas minhas madrugadas dedicadas aos estudos, por estar sempre presente, por ser a melhor vó do universo, por tudo Chuca...por tudo;

A minha amada irmã, Patrícia Mendes, pela compreensão, companhia nos meus momentos de tristeza e felicidade, pela bondade e por me presentear com o que mais me consola nos meus momentos de estresse, minha sobrinha;

Ao meu Dedicado Namorado, Luiz Audir de Barros Alves, pelas constantes demonstrações de amor, pelo companheirismo, por nunca medir esforços pra me “socorrer” nos momentos de aflição, por me fazer sorrir mesmo quando as dificuldades me faziam triste, pela compreensão e cumplicidade, por nossa identificação irreversível e perene, por me proporcionar felicidade eterna, por sempre acreditar em mim e nunca deixar desistir, definir o quanto você é importante pra mim é meramente impossível;

A minha Sobrinha e ao meu Afilhado, Nicole e Mateus (amorzinhos meus), que me proporcionaram momentos únicos de alegria. Nicole com seu sorriso contagiante e

carinho indescritível fazendo a Titia esquecer de todos os problemas e Mateus, mesmo distante, proporcionando a Madrinha felicidade extrema ao ouvir a sua voz, olhar as fotos e sorrir com seus vídeos. Por me fazerem descobrir um sentimento tão puro e único de ser Tia e Madrinha, e desta forma me tornar mais forte e com mais vontade de terminar o curso pra aproveitar os momentos com vocês, pois nada me deixa tão tranqüila e feliz do que as suas presenças;

As minhas Grandes e incomparáveis Amigas, Mércia Batista e Walkeane dos Santos verdadeiras irmãs, pessoas sempre presentes na minha vida há muitos anos, por todo carinho, amor, dedicação, compreensão, amizade, por suas palavras de apoio e toda ajuda prestada nos momentos em que mais precisei, pela fiel companhia e por me fazerem entender que a amizade não se explica ela simplesmente acontece;

As amadas e tão queridas amigas que ganhei ao entrar na Universidade, Enésia Eloyna, Maria Isabel, Mariana Costa e Isabella, minhas Amigas Infames! pelo sentimento formado de maneira concreta, por compartilhar emoções únicas, por cada momento vivido, por cada farras infame comemorada, pelas várias noites de sono perdidas por conseqüências dos trabalhos estressantes, das temidas provas e das maravilhosas comemorações bem do nosso estilo, e por me apresentarem o melhor brinde de todos: Até que a formatura nos separe, ou não!

Em especial a Mariana Costa, irmã que ganhei na fila das coincidências, companheira inseparável, pessoa essencial para finalização deste trabalho, sem você Mari tenho uma certeza: eu não teria conseguido! e a Maria Isabel, IrmãGêmula desde o primeiro período, por saber que “nossos destinos foram traçados na maternidade”, pelo carinho especial e uma atenção sem igual;

Aos pais das minhas amigas infames, por todas as acolhidas carinhosas, quando precisamos nos reunir em suas casas para a execução de trabalhos, ou simplesmente se reunir pra nossas farras, em especial a Tia Neta e Tio Bione (*in memoriam*), verdadeiros Pais adotivos, pois deles recebo amor, carinho e cuidados que nunca conseguirei agradecer devidamente, por me receber tão bem em todas as milhares de vezes que estive dentro deste amado lar, pela tapioca com queijo do

reino mais especial que eu já comi, por todas as tardes de almoço e lanches, por todas as dormidas, por tudo;

A minha orientadora, Profa.Dra. Eriane de Castro Lima Machado, pela parceria de 2 anos, pelo apoio e ensinamentos, pela orientação prestada de maneira especial, pela parceria em todas as etapas deste desafio, pela dedicação para finalização deste trabalho;

A aluna do Mestrado, Márcia, pelo auxílio nas realizações dos experimentos em laboratório, pelas conversas e desabafos e por suas valiosas caronas;

Aos funcionários da Universidade, em especial a Giane, Seu Zezinho e Cibele, cada um na sua função mas contribuindo de forma valiosa nos meus momentos de sufoco;

Aos técnicos do laboratório, Edilene, Rafael, Danúbia e Sílvio, pela valiosa ajuda, em especial a Edilene, criatura indispensável para execução e finalização deste trabalho, pelo carinho, dedicação, paciência, ensinamentos, conselhos de mãe, enfim por uma ajuda sem igual e sem limites, você foi muito importante pra que eu chegasse até aqui... Muito obrigada Dilene, muito Obrigada!

Resumo

Uma forma alternativa para a conservação de produtos alimentícios é o uso de óleos essenciais, que têm sido alvo das pesquisas frente ao seu reconhecido potencial antimicrobiano. Objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial do efeito antibacteriano *in vitro* e em matriz alimentar do óleo essencial de hortelã (*Mentha piperita* L.) na inibição do crescimento de bactérias patogênicas em soro de queijo coalho tipo A com composição centesimal conhecida e realizar estudo da vida de prateleira do soro lácteo com e sem o óleo essencial. Realizou-se inicialmente o screening da atividade antibacteriana dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), gengibre (*Zingiber officinale*), hortelã (*Mentha piperita* L.) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*) no crescimento de *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. O óleo essencial de Hortelã foi submetido a análise de suas propriedades antibacterianas *in vitro* sobre as bactérias em teste através dos testes CIM (concentração inibitória mínima) e CBM (concentração bactericida mínima), para tanto foram testadas para o CIM sete concentrações do óleo (0,12%, 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 4% e 6%) contra *S. aureus* e quatro concentrações do óleo (0,25%, 0,5%, 1% e 1,5%) contra *E. coli*, e para o CBM três concentrações do óleo (1%, 2% e 2,5%) contra ambas bactérias. A eficiência do óleo essencial na vida de prateleira foi realizada avaliando-se os soros com e sem óleo por 28 dias e determinando-se o índice de morte durante 7 dias consecutivos, mediante a inoculação do produto contendo óleo essencial com suspensões das bactérias de forma a atingir uma concentração final de 10^6 UFC/ml, e mantendo os produtos sob refrigeração a 4C°. No Screening verificou-se um halo de inibição dos óleos essenciais alecrim, canela, cravo, gengibre e hortelã no crescimento de *E.coli* e *S.aureus* de 10mm, 20mm, 21mm, 10mm, 20mm e 15mm, 22mm, 18mm, 10mm e 21mm, respectivamente. Nos testes do CIM, o óleo de hortelã inibiu o crescimento em todas as concentrações testadas, exceto nas 0,25% e 0,5% para *E. coli*. Na CBM o óleo de menta apresentou efeito inibidor em todas as concentrações testadas. Diante dos resultados, a concentração do óleo a 1% foi escolhida para a avaliação de vida de prateleira. Durante este período verificou-se uma redução de 6 ciclos logarítmicos em UFC/ml para *E.coli* em 24 horas, e um resultado ainda negativo após o 28º dia. Para o crescimento de *S. aureus* não se verificou negatividade em UFC/ml durante o período do estudo, mas houve uma redução de 4 ciclos logarítmicos em UFC/ml após o 28º dia. Estes resultados comprovam o papel antibacteriano do óleo essencial de hortelã controlando e inibindo o desenvolvimento de *S.aureus* e *E.coli*, confirmando a eficácia do óleo de hortelã como agente antimicrobiano.

Descritores: óleo essencial, atividade antibacteriana, vida de prateleira.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. HIPÓTESE.....	17
4. METODOLOGIA	18
4.1 Matéria-prima.....	18
4.2 Tratamento do soro lácteo.....	18
4.3 Processo de pasteurização.....	18
4.4 Obtenção do óleo Essencial de Hortelã (<i>Mentha piperita L</i>).....	19
4.5 Obtenção das Cepas Testes.....	19
4.6 Inóculo Microbiano e Inoculação do Soro lácteo.....	19
4.7 Análises Microbiológicas.....	19
4.8 Screening da Atividade Antibacteriana.....	19
4.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	21
4.9.1 Avaliação da Vida-de-prateleira.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
6. CONCLUSÕES	33
7. APOIO FINANCEIRO	34
8. REFERÊNCIAS	35

1. Introdução

Segundo dados da FAO (2008), diante da produção global de leite, a América do Sul foi a região com maior produção de leite em 2008, e o Brasil pode ser em breve o segundo maior exportador de leite, ou até mesmo o maior se tendências atuais continuarem durante os próximos anos. No período de outubro de 2007 a setembro de 2008, observou-se que a produção de leite no Brasil chegou a 38.538.779.000 litros. Na Região Nordeste do Brasil, o estado da Bahia é o líder na produção de leite (664.166.000 litros), sendo seguido pelo estado de Pernambuco (365.771.000 litros) (IBGE, 2009).

No Estado de Pernambuco, cerca de 74% da produção de leite é oriunda na sua maioria de pequenos produtores (<300 litros/dia), e concentra-se na região Agreste, sendo localizados basicamente nos municípios de Águas Belas, Bom Conselho, Canhotinho, Correntes, Garanhuns, Gravatá, Limoeiro, Pesqueira, Sanharó, São Bento do Una, São Caetano e Venturosa (FIGUEIROA, 2005).

O soro lácteo é a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação convencional de queijos, e que retém cerca de 55% dos nutrientes do leite, sendo considerado um subproduto de importância relevante, tendo em vista o volume produzido, uma vez que representa 85% a 95% do volume de leite, e sua composição nutricional, excepcionalmente no que se refere às proteínas e minerais (KOSIKOWSKI, 1979; DRAGONE et al., 2009; SGARBIERE, 2004).

A produção de queijos regionais como o queijo de coalho é uma atividade de importância econômica para o estado de Pernambuco, mas o excedente do soro é um dos maiores problemas enfrentados por boa parte das indústrias de laticínios, principalmente as de pequeno e médio porte, devido ao custo elevado do tratamento do soro como resíduo industrial, conforme exigências dos órgãos de inspeção e saúde pública. Diante disto, a maioria delas opta pelo descarte desse subproduto diretamente na rede pública, rios e lagos (NELSON & BROWN, 1969; FLORENTINO et al., 2005). Vale salientar que o soro de queijo apresenta potencial efeito poluidor, aproximadamente 100 vezes maior que o do esgoto doméstico (SIQUEIRA et al., 2005).

O soro integral, devido ao seu alto teor de cinzas, apresenta baixa aceitação sensorial se consumido in natura. Atualmente se reconhece a diversificação de produtos que podem ser elaborados a partir da aplicação do soro de queijo (SIQUEIRA et al., 2002). O uso do soro na formulação de alimentos é uma boa alternativa para a obtenção de produtos a serem introduzidos em programas de combate a desnutrição (MOHLER et al., 1981).

Vale salientar que o soro lácteo é um produto altamente perecível, pois conserva aproximadamente 100% da lactose do leite, o que favorece a multiplicação bacteriana (SMITHERS et al., 1996). Isto é mais significativo para o soro lácteo doce oriundo da produção de queijos com leite não pasteurizado, quando é difícil o controle da microbiota contaminante. A pasteurização alta, como tratamento do soro de queijo coalho tipo A, obtido a partir de leite pasteurizado, foi avaliada por Soares (2008), que verificou a eficiência deste tratamento térmico na redução da carga microbiana inicial.

A segurança microbiológica de alimentos por muitos anos foi obtida pelo uso de vários processos químicos e/ou físicos (MARINO et al., 2001). Porém, alguns conservantes químicos são suspeitos ou são tóxicos aos consumidores, bem como, por sua vez, o uso de processos físicos (resfriamento, congelamento, uso de altas temperaturas, etc) podem ocasionar perdas nutricionais e/ou reações indesejáveis (reação de Maillard, oxidação lipídica, etc) que alteram as características organolépticas dos alimentos. Esta realidade tem causado um aumento da pressão sobre a indústria alimentícia para adoção de alternativas mais naturais para a obtenção dos seus propósitos (TASSOU et al., 1995; SOUZA, et al., 2005).

As especiarias e seus derivados assumiram relevante importância para serem usados como potenciais agentes inibitórios de micro-organismos. Esses elementos que destacavam, principalmente, como agentes para conferir aromas e gostos característicos aos alimentos revelaram nova perspectiva para seu emprego na indústria de alimentos (FERNANDES; GRACIA-CRUZ, 2007).

Os óleos essenciais, entre os variados compostos estudados com vistas a um potencial uso na conservação de alimento, têm mostrado resultados destacáveis na inibição do crescimento e sobrevivência de diferentes espécies de micro-organismos de importância nas variadas áreas da microbiologia (VELLUTI et al., 2003; LANCIOTTI et al., 2004). São originados do metabolismo secundário da plantas e

possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides (GONÇALVES et al., 2003; SILVA et al., 2003).

Estes óleos, constituídos principalmente de onoterpenos, sequiterpenos, fenilpropanóides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular, normalmente são usados “in natura”, isto é, como misturas, pois as propriedades organolépticas estão associadas a vários componentes que formam óleos e extratos de plantas há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular, entre elas, a produção de anti-sépticos tópicos. Tal realidade serviu de base para diversas investigações científicas, com vistas na confirmação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (ALMEIDA et al., 2006; ARRUDA et al., 2006; NUNES et al 2006).

Os elementos vegetais que apresentam potencialidade antimicrobiana têm recebido uma considerável ênfase quanto ao seu emprego em sistemas de conservação dos alimentos. Estes produtos vegetais poderiam agir como elementos potencializadores da ação de outros agentes antimicrobianos ou poderiam agir como principal agente antimicrobiano em sistemas de conservação de alimentos (GOULD, 1996).

A atual tendência adotada pelos órgãos legisladores da produção de alimentos e pelos consumidores tem exigido uma progressiva retirada de aditivos químicos na produção de alimentos. A perda de alimentos causada por uma variedade de micro-organismos tem sido reconhecida como inconveniente e uma das maiores preocupações das indústrias de alimentos (SAHIN, 2004), principalmente pelo impacto econômico de alimentos estragados. Esta tendência tem conduzido a indústria de alimentos a buscar compostos alternativos para alcançar suas metas relacionadas à estabilidade microbiana dos seus produtos finais (SOUZA et al., 2005).

Considerando esta perspectiva, variadas pesquisas em todo o mundo têm sido realizadas com vistas a buscar compostos alternativos para a aplicação na conservação de alimentos (RISTORI et al., 2002; BENKEBLIA, 2004; SÀNCHEZ et al., 2005; RASOOLI, et al., 2006; SOUZA et al., 2006; SAMAPUNDO et al., 2007). A indústria alimentícia visa a produção de alimentos que apresentem vida de prateleira longa e inocuidade com relação à presença de micro-organismos patogênicos e suas toxinas. Porém, a nova tendência do consumidor e da legislação de alimentos têm tornado essa busca cada vez mais premente e necessária. Os consumidores

procuram alimentos de boa qualidade (fresco, com pouca quantidade de sal, açúcar, gordura e ácidos, entre outros), livres de preservativos e minimamente processados, porém com vida-útil longa (GOULD, 1995). Ainda, a legislação de alimentos tem progressivamente restringindo e/ou limitado o uso de alguns conservantes químicos utilizados atualmente em diferentes alimentos (LEUSCHNER; ZAMPARINI, 2002).

O controle do crescimento microbiano em alimentos objetiva uma eliminação total ou parcial de micro-organismos que venham a alterar suas características organolépticas e/ou que atuem como causadores de doenças. A maioria das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) de origem microbiana possui sua etiologia bem estabelecida, de modo que a bactéria *Staphylococcus aureus* é reconhecida com um dos agentes patogênicos mais comuns, sendo responsável por surtos associados à ingestão de alimentos *in natura* e processados em todo o mundo (BRAGA et al., 2005).

Os óleos essenciais apresentam duas principais características como agentes antimicrobianos: i) sua origem natural, o que significa mais segurança para os consumidores e para o meio ambiente; e ii) são considerados como possuidores de baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana. A segunda característica citada toma como base o fato de que óleos essenciais são compostos por uma grande variedade de constituintes, os quais, aparentemente, apresentam diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana, tornando, desta forma, mais difícil uma possível adaptação dos micro-organismos frente a sua ação (DAFERERA et al., 2003).

A utilização de substâncias naturais, de origem vegetal, torna o alimento mais atrativo ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico, mesmo quando empregadas em concentrações relativamente elevadas. Além dos benefícios proporcionados à saúde, diversos estudos têm demonstrado o efeito inibidor de condimentos no desenvolvimento de microrganismos deterioradores e patogênicos veiculados por alimentos. Existe também a perspectiva de substituir os aditivos sintéticos por conservantes naturais presentes nos condimentos (BARA, 1992). Deans & Ritchie (1987) afirmam que a substituição de aditivos sintéticos por naturais, dependerá fundamentalmente da determinação de uma concentração ideal.

Entretanto, a atividade antimicrobiana de especiarias somente poderá ser prontamente reconhecida como fator suficiente para subsidiar sua inclusão em sistemas de conservação de alimentos quando medidas pertinentes forem tomadas

para assegurar a sua qualidade sanitária. Estas medidas devem incluir ações para controle de umidade, de promoção de satisfatórias condições sanitárias no processamento, treinamento dos manipuladores, monitoramento a qualidade microbiológica, ou seja, ações de marca sanitária aplicadas desde a colheita até a sua inserção nos alimentos. (SOUZA, 2006). Estudos mostram que uma maior ou menor efetividade antimicrobiana das especiarias se apresentam dependente do tipo de especiaria, da sua concentração, do tipo e concentração do micro-organismo alvo e da composição d substrato (MARINO et al., 2001; OZCAN, 2001).

Assim, torna-se fascinante para a ciência de alimentos a possibilidade da descoberta de antimicrobianos naturais e sua possível aplicação pratica na conservação de alimentos, de modo que muitos pesquisadores têm se aprofundado nesta possibilidade tomando como base promissores resultados observados *in vitro* (PRASAD; SEENAYYA, 2000; JUGLAL et al., 2002; LEMAY et al., 2001). Frente ao reconhecimento potencial antimicrobiano dos óleos essenciais, bem como considerando a pressão dos órgãos legisladores e do consumidor sobre a indústria de alimentos exigindo a adoção de alternativas mais naturais para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, com conseqüente eliminação parcial ou total da adição de conservantes sintéticos em seus produtos, justifica-se a execução de um estudo com ênfase a avaliar o potencial do efeito antibacteriano *in vivo* do óleo essencial de hortelã (*mentha piperita l*) na inibição do crescimento de bactérias patogênicas em soro de queijo coalho.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial do efeito antibacteriano do óleo essencial de Hortelã (*mentha piperita l*) na inibição do crescimento de bactérias patogênicas em soro de queijo coalho.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial do efeito antibacteriano *in vitro* de óleo essencial de Hortelã (*Mentha piperita L.*) na inibição do crescimento das bactérias patogênicas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (*CIM*) e concentração Bactericida Mínima (*CBM*) do óleo essencial de Hortelã sobre as cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*;
- Realizar estudo da vida de prateleira do soro de queijo coalho tipo A com e sem óleo essencial de Hortelã.

3. Hipótese

Os óleos essenciais têm se destacado como possível antimicrobiano natural. Assim se pressupõem que óleo essencial de Hortelã (*Mentha piperita L*) pode apresentar propriedade antibacteriana, vindo desta forma a torna-se emergente alternativa para o controle de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em alimentos.

4. Metodologia

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Bromatologia e Microbiologia dos Alimentos do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco.

4.1 Matéria-prima

Para este experimento foi usado o soro de queijo coalho tipo A oriundo de laticínios da região do agreste. As amostras foram coletadas diretamente do tanque de produção, logo após o corte da massa, em recipientes de plástico, acondicionadas com gelo e transportadas em caixas isotérmicas.

4.2 Tratamento do soro lácteo

No soro lácteo (Figura 1) foi utilizado o óleo essencial de hortelã próprio para consumo.



Figura 1. Fluxograma do tratamento do soro de queijo coalho tipo A com óleo essencial de hortelã.

4.3 Processo de pasteurização

Para a pasteurização do soro lácteo foi empregado um tratamento térmico de 90°C por 5 minutos (SOUZA, 2005).

4.4 Obtenção do óleo Essencial de Hortelã (*Mentha piperita L*)

O óleo essencial de hortelã foi adquirido da Ferquima Indústria e Comércio Ltda (vargem grande Paulista, São Paulo, Brasil).

4.5 Obtenção das Cepas Testes

As cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* utilizadas como micro-organismos testes foram obtidas da coleção de micro-organismos do laboratório de Microbiologia dos alimentos, Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco.

As cepas estoques de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* utilizadas como micro-organismos testes foram mantidas em tubos de ensaio contendo ágar Nutriente e Agar BHI inclinados, respectivamente, sob uma temperatura de 8°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Para os ensaios de atividade antibacteriana foram utilizados repiques da cultura estoque em tubos de ensaio contendo ágar nutriente incubados a 35-37°C durante 24 horas.

4.6 Inóculo Microbiano e Inoculação do Soro lácteo

Os inóculos que foram utilizadas nos ensaios antimicrobianos foram obtidos através da preparação de suspensões de tais cêpas em solução salina (NaCl a 0.85% p/v) estéril a partir de culturas *overnight* cultivadas em ágar nutriente inclinado a 37°C. Tais suspensões tiveram sua turbidez padronizadas de acordo com a turbidez do tubo 0.5 da escala McFarland correspondendo à concentração de aproximadamente 10^6 Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL). As cêpas foram inoculadas em soro lácteo isento das bactérias em teste.

4.7 Análises Microbiológicas

Foram realizadas análises para contagem das bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, no soro lácteo, através do crescimento do micro-organismo em ágar nutriente e em Agar Baird Parker, respectivamente, de acordo com o procedimento descrito por Vanderzant e Spplittstoesser (1992).

4.8 Screening da Atividade Antibacteriana

O Screening da Atividade Antibacteriana foi realizado através da Técnica de difusão em meio sólido (ágar) utilizando-se disco de papel filtro (HADACEK; GREGER, 2000).

O procedimento de plaqueamento em profundidade ocorreu da seguinte forma: Em placas de petri (90 x 15 mm) estéreis foi inoculado 1 mL da suspensão de cada bactéria, em seguida foram adicionados 21mL de Ágar Nutriente fundido a 50°, seguido por homogeneização do meio de cultura através de movimentos circulares em oito com a suspensão das cepas teste. Após a solidificação do meio foram depositados discos de papel de filtro embebidos com 20µL de cada óleo essencial em análise no centro da placa de petri (NAIR et al., 2005). O sistema foi incubado a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, foi considerado como possuidor de atividade antimicrobiana aquele produto que apresentou a formação de um halo de inibição igual ou superior a 10 mm de diâmetro (SOUZA et al., 2005; SOUZA et al., 2007).

O plaqueamento em superfície foi realizado da seguinte forma: verter o ágar nutriente nas placas, esperar a solidificação e a seguir, pipetar 1 mL da amostra espalhando o inóculo com alça de Drigalsky, e posteriormente colocar o disco de papel filtro com 20 µL (NAIR et al., 2005).

O screening da atividade antibacteriana foi realizada para avaliar a atividade antibacteriana de 5 óleos essenciais: Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), Hortelã (*Mentha piperita* L.), Gengibre (*Zingiber officinalis*), Cravo (*Syzygium aromaticum*), Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) contra o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Na leitura de ambos métodos, observou-se o diâmetro do halo formado ao redor do disco de papel filtro, para comprovar a atividade antibacteriana quando maior que 10mm,.

Após os resultados do Screening, os óleos de Hortelã, Cravo e Canela foram escolhidos para serem examinados quanto as suas propriedades antibacterianas sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* através do teste CIM (concentração inibitória mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima). Todas as análises foram realizadas em triplicata e com as concentrações de cada óleo essencial e micro-organismos testados conforme expressos no quadro abaixo.

Quadro 1. Concentrações de cada óleo essencial e micro-organismos testados na CIM e CBM.

Micro-organismo	Hortelã		Cravo		Canela	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
E.coli	0,25% 0,5% 1% 1,5%	1% 2% 2,5%	0,5% 1% 1,5% 2%	1% 1,5% 2%	0,12% 0,25% 0,5% 1% 2%	1% 2% 2,5%
S.aureus	0,12% 0,25% 0,5% 1% 2% 4% 6%	1% 2% 2,5%	0,5% 1% 1,5% 2%	1% 1,5% 2%	0,25% 0,5% 1% 2%	1% 2% 2,5%

4.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram determinadas através da técnica de macrodiluição em caldo (GAYOSO et al., 2005), onde foram preparados tubos de ensaio contendo 1ml de caldo nutriente acrescidos de 0,15% de Agar bacteriológico, suplementados com concentrações crescentes do óleo essencial, sendo posteriormente adicionado 0,1mL do inóculo das cepas teste. O sistema foi incubado a 35-37°C por 24 horas. Ao término do período de incubação, a mais baixa concentração (mais alta diluição) do óleo essencial que não apresentou crescimento microbiano visível (turvação) foi considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Após esta observação, alíquotas de 0,1mL dos tubos com concentrações do óleo definidas na tabela supracitada para o teste CBM, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo Ágar Nutriente inclinado, durante 24-48 horas a 37°C. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi considerada como a menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento das cepas após este período de incubação.

Após os testes CIM e CBM, decidiu-se pela avaliação do óleo essencial de hortelã quanto a sua atividade antibacteriana na matriz alimentar durante vida de prateleira do soro lácteo.

4.9.1 Avaliação da Vida-de-prateleira

Os soros lácteos com e sem óleo essencial foram avaliados diariamente até 7 dias quanto às análises microbiológicas, visando determinar o “tempo de morte”, e em seguida após, 14, 21 e 28 dias de produzido, que foi realizado com os valores do CIM encontrados anteriormente. Para isso foi usado o método de contagem de células viáveis. Em 8,9 mL do soro foi inoculado 1 mL da suspensão bacteriana (aproximadamente 10^6 UFC/mL). Em seqüência 100 μ L do óleo essencial, valor este que fornece uma concentração final do óleo conforme previamente determinado por teste da CIM contra *E. coli*, foi adicionado ao sistema. O sistema, preparado em um frasco de vidro estéril para cada dia de análises, foi armazenado sob refrigeração 4°C. Em intervalos de tempos diferentes (0, 24, 48, 96, 120 horas e em seguida após, 14, 21 e 28 dias) da exposição, 1mL do sistema foi diluído em série (10^{-1} a 10^{-5}) em água peptonada (0,1g/100mL) e inoculados em placas de petri com Agar Baird Parker, para *S.aureus* e em Agar Nutriente, para *E.coli*, por 24horas a 37°C (VILJOEN et al.,2003). O número de colônia foi contado e comparado com aquele encontrado no ensaio controle no qual o óleo essencial foi substituído por água destilada estéril. Os resultados foram expressos em log de UFC/mL.

5. Resultados e Discussão

Os resultados do screening pelo método de profundidade da atividade antibacteriana dos óleos essenciais de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), Hortelã (*Mentha piperita* L.), Gengibre (*Zingiber officinalis*), Cravo (*Syzygium aromaticum*), Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) contra o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* estão apresentados na Figura 2 e Figura 3, respectivamente.

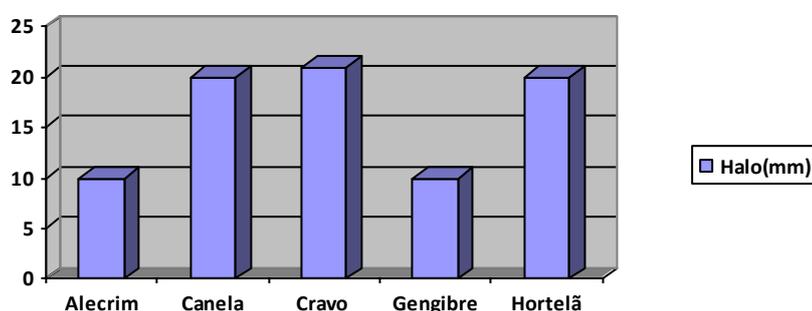


Figura 2. Resultados do Screening da atividade antibacteriana dos óleos essenciais no crescimento de *Escherichia coli* (Resultados expressos em diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano)

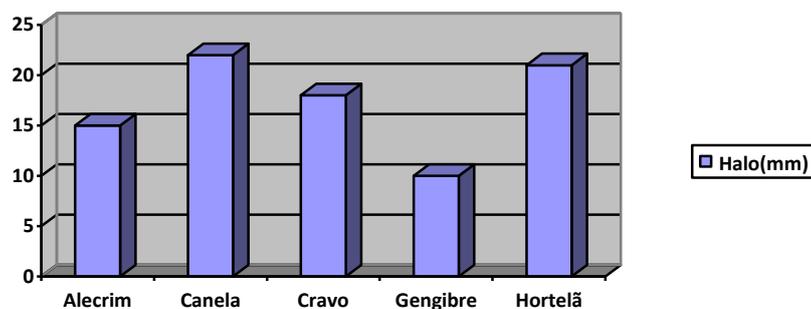


Figura 3. Resultados do Screening da atividade antibacteriana dos óleos essenciais no crescimento de *Staphylococcus aureus* (Resultados expressos em diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano)

Os resultados do screening pelo método de superfície da atividade antibacteriana dos óleos essenciais de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), Hortelã (*Mentha piperita* L.), Gengibre (*Zingiber officinalis*), Cravo (*Syzygium aromaticum*), Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) contra o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* são mostrados na Figura 4 e Figura 5, respectivamente.

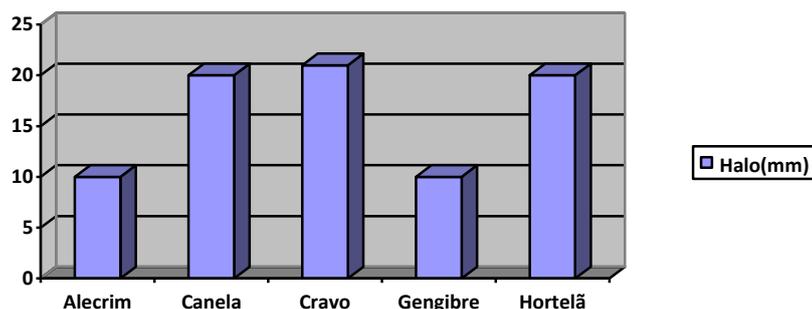


Figura 4. Resultados do Screening da atividade antibacteriana dos óleos essenciais no crescimento de *Escherichia coli* (Resultados expressos em diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano)

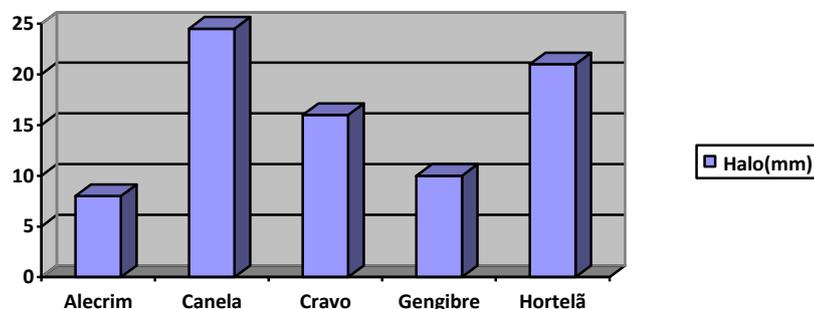


Figura 5. Resultados do Screening da atividade antibacteriana dos óleos essenciais no crescimento de *Staphylococcus aureus* (Resultados expressos em diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano)

Observa-se que o óleo essencial de alecrim expressou os menores valores, tanto para *Escherichia coli* como para *Staphylococcus aureus*, por ambos os métodos (Fig. 2, 3, 4 e 5), pois apresentou valores menores que 10mm, exceto para *Staphylococcus aureus* em profundidade que resultou em um halo de 15 mm, e desta forma refletindo atividade antibacteriana não satisfatória. O óleo essencial de Gengibre também não apresentou atividade antibacteriana satisfatória, formando halos no valor de 10mm para as cepas em estudo, por ambos os métodos.

Os óleos essenciais de Canela, Cravo e Hortelã para os dois micro-organismos testados e por ambos os métodos apresentaram halos de inibição do crescimento bacteriano com diâmetros superiores a 15mm, comprovando a atividade antibacteriana dos mesmos.

Os valores de diâmetro dos halos de inibição dos óleos essenciais de Cravo para *E.coli* e Alecrim para *S. aureus* encontrados no presente estudo foram superiores aos encontrados por Bara e Vanetti (2000). Trajano et al.(2009)

encontraram resultados semelhantes ao presente estudo em relação a todos os óleos analisados, destacando o óleo essencial de hortelã que obteve uma interessante atividade inibitória do crescimento bacteriano, inibindo a maioria das cepas testadas em seu estudo.

O presente estudo resultou em diâmetros de halos também maiores aos encontrados por Mendonça (2004) que exibiu valores para inibição de *S.aureus* por diferentes óleos essenciais e todos na concentração de 50%, revelando que os óleos essenciais de Cravo-da-índia, Orégano e Manjerição apresentaram valores de halo de 6,1mm, 3,38mm e 5mm, respectivamente.

Junior et al. (2009) encontrou como diâmetro médio dos halos de inibição, formados em função das concentrações 3,12% de óleo essencial de *T. vulgaris* (Tomilho) e *S. aromaticum* (Cravo) e concentração de 12, 5% de *B. orellana* (Urucum), frente ao *S. aureus*, valores de 10mm para os óleos de Tomilho e Cravo e de 8mm para o de Urucum. Estes resultados são inferiores aos encontrados no presente estudo que mesmo em concentrações menores, o óleo essencial de cravo, formou halos de inibição com diâmetros acima 15mm (Fig. 4 e 5).

Alarcón (2007) avaliou a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de orégano e de pimenta-do-reino preta, ambos na concentração 10%, e encontrou halos de inibição para *E.coli* de 3,9mm e 3,57mm com os óleos de orégano e pimenta-do-reino, respectivamente e para *S.aureus* de 6,87mm e 4,4mm com os mesmos óleos, respectivamente. Estes valores são inferiores aos encontrados no presente estudo com uso do óleo essencial de hortelã aos mesmos microorganismos (Fig. 4 e 5).

López et al. (2005) estudaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais do cravo e canela sobre diversos microrganismos contaminantes de alimentos e observaram que ambos os óleos apresentaram uma excelente ação antibacteriana e antifúngica.

Mimica-Dukić et al. (2003) pesquisaram a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de Hortelã e observaram que o vegetal teve uma ação bacteriostática especialmente frente a *E. coli*.

Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (1998) observaram a atividade bacteriostática do óleo essencial de Canela sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Os resultados do presente estudo divergem dos resultados encontrados por Hoffmann et al. (1999), no que diz respeito ao óleo essencial de Gengibre (Fig. 4 e

5), pois no referente estudo o óleo essencial de gengibre não se mostrou eficiente como agente antimicrobiano.

Os resultados do CIM e CBM dos três óleos em análise estão expostos na Tabela 1. Nas análises do CBM todos os óleos essenciais em teste inibiram o crescimento na concentração 2%, exceto o óleo essencial de cravo que inibiu na concentração 1,5%.

Nas análises do CIM, o óleo essencial de Hortelã apresentou efeito inibidor em todas as concentrações testadas para *Staphylococcus aureus*. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Singh et al. (1992) que concluíram em seus estudos que o óleo de Hortelã na concentração de 500 a 10.000 mg/mL, além de antifúngico, desempenha um papel antibacteriano, controlando o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus*.

Para *Escherichia coli* o óleo essencial de hortelã apresentou atividade antibacteriana, apenas na concentração de 1,0%. O óleo essencial de Cravo inibiu o crescimento dos dois micro-organismos analisados, em todas as concentrações testadas. O óleo essencial de Canela confirmou atividade antibacteriana apenas nas concentrações 1 e 2% para os dois micro-organismos testados.

Hoffmann et al. (1999) verificaram que os óleos essenciais com maior atividade antimicrobiana foram os de canela e menta, nas concentrações de 10,0 e 1,0%, respectivamente, assim como o óleo essencial de cravo, na concentração de 10,0%. Tais resultados também são semelhantes aos encontrados por Bayoumi (1992), que confirmou a eficácia destes óleos como agentes antimicrobianos nas concentrações de 0,5-10%.

Alarcón (2007) avaliou a atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais de orégano e pimenta-do-reino sobre o crescimento dos micro-organismos *S.aureus* e *E.coli*, as concentrações eficazes para inibir o crescimento de *S.aureus* foram de 0,5% e 1% para orégano e pimenta-do-reino, respectivamente e para *E.coli* foram de 1% e 5% para os mesmo óleos, respectivamente. Concentrações semelhantes foram encontradas no presente estudo para o óleo essencial de hortelã (1%) (tabela 1) no combate aos mesmos micro-organismos testados.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima(CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais de Hortelã, Cravo e Canela na inibição do crescimento das bactérias ***Escherichia coli*** e ***Staphylococcus aureus*** .

Óleo essencial	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	CIM ($\mu\text{L}/\text{MI}$)	CBM ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	CIM ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	CBM ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
Hortelã (<i>Mentha piperita</i> L.)	10	20	1,2	20
Cravo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	5	15	5	15
Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	10	20	10	20

Como o óleo essencial de alecrim não apresentou resultados satisfatórios no screening, este que era o objeto de estudo no planejamento desta pesquisa foi substituído pelo óleo de hortelã por apresentar um bom resultado do screening e CIM, como também uma boa combinação com alimentos, por seu aroma refrescante.

Com base nos resultados obtidos neste experimento, a concentração de 1% do óleo essencial de Hortelã, foi selecionada para ser empregada no estudo da atividade inibitória de *S.aureus* e *E.coli* inoculadas em soro lácteo.

Os resultados das análises *in vivo* da atividade antibacteriana do óleo essencial de Hortelã, na matriz alimentar soro de queijo coalho tipo A, de composição centesimal conhecida (Tabela 2), estão apresentados nas Figuras 6, 7, 8 e 9.

Tabela 2. Composição físico-química do soro gerado pela produção de queijo coalho e utilizado nos ensaios.

Análises	Valores
Lipídios (g/100g)	0,35 \pm 0,11
Proteínas (g/100g)	0,85 \pm 0,05
Cinzas (g/100g)	0,57 \pm 0,02
Umidade (g/100g)	92,58 \pm 0,31
Lactose (g/100g)	3,81 \pm 0,17
pH	6,46 \pm 0,18
Acidez (% ácido láctico)	0,94 \pm 0,26

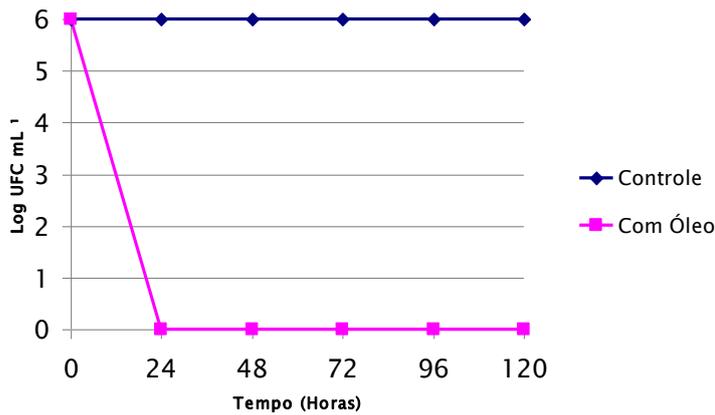


Figura 6. Resultado do Tempo de morte de *Escherichia coli* em bebidas com e sem óleo essencial de Hortelã.

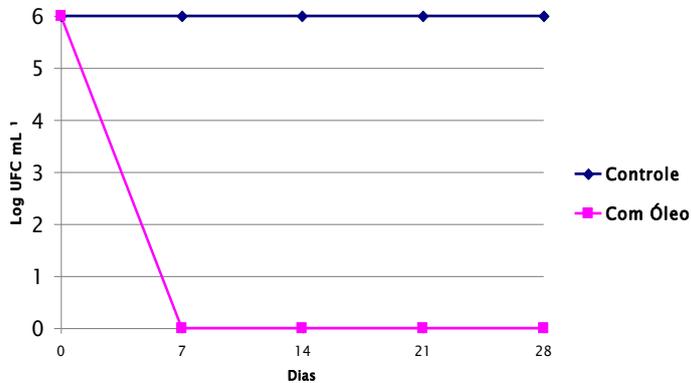


Figura 7. Resultado da contagem de *Escherichia coli* durante vida de prateleira das bebidas com e sem óleo essencial de hortelã.

O óleo essencial de hortelã, na concentração testada, inibiu o crescimento bacteriano da *Escherichia coli* com 24 horas, provocando uma redução de 6 log₁₀ UFC/ml (Fig. 6) e a ausência de crescimento deste micro-organismo permaneceu durante os 28 dias de análises (Fig. 7), comprovando desta forma a sua eficiência no combate ao crescimento de *Escherichia coli*, portanto sua atividade antibacteriana também na matriz alimentar.

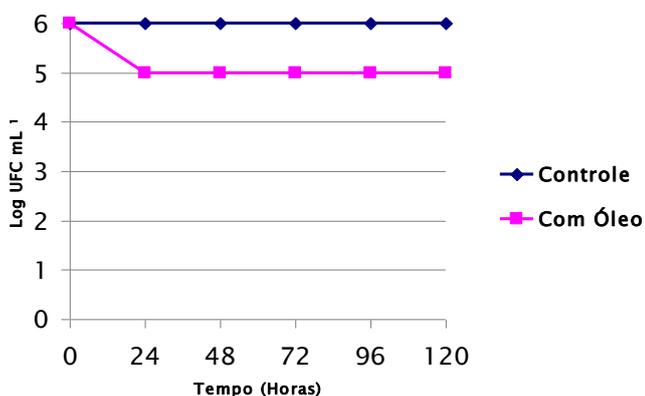


Figura 8. Resultado do Tempo de morte de *Staphylococcus aureus* com e sem óleo essencial de Hortelã.

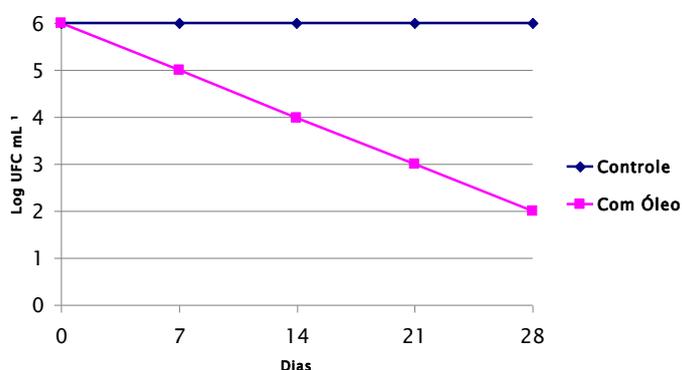


Figura 9. Resultado da contagem de *Staphylococcus aureus* durante vida de Prateleira das bebidas com e sem óleo essencial de hortelã.

O óleo essencial de Hortelã, na concentração testada, para *Staphylococcus aureus* não cessou o crescimento bacteriano, mas reduziu 1 log₁₀ UFC/mL após 24 horas, cuja redução permaneceu até 120 horas (Fig. 8), e 4 log₁₀ UFC/mL (Fig. 9) no 28º dia de arma, resultando a níveis aceitáveis de 100 UFC/ml, valor máximo permitido para queijo tipo coalho pela legislação em vigor (BRASIL, 2001). Este resultado se deve possivelmente à interferência dos componentes do alimento na atividade antibacteriana do óleo. Sabe-se que os componentes das matrizes alimentares podem, possivelmente, interagir com os princípios ativos desses potenciais compostos antimicrobianos resultando em moderada a não significativa efetividade antimicrobiana (MENON; GARG, 2001).

Muitos estudos *in vitro* sobre atividade antimicrobiana de óleos essenciais são realizados, contudo, poucos envolvem a adição dessas substâncias em matrizes alimentares. De modo geral, fatores intrínsecos e extrínsecos interferem no efeito antimicrobiano dos óleos essenciais e na conduta do micro-organismo no alimento (BURT, 2004; GONZÁLES-MONTALVO et al., 2007).

O efeito dos óleos essenciais de limão, laranja e bergamota e alguns dos seus componentes também foi menos efetivo em comparação ao teste *in vitro* em reduzir concentração de *S.aureus*, quando inoculados em folhas de repolho ou pele de frango (FISCHER & PHILLIS, 2006).

Souza et al. (2006) analisaram o tempo de morte para *E.coli* e *S.aureus*, por 24 horas, com o óleo essencial *Origanum vulgare* L, com CIM de 40 e 20µL/mL respectivamente, e revelaram uma Contagem de bactérias (UFC/mL) sempre menor para os ensaios com o óleo do que os encontrados nos ensaios controle. Estes resultados são semelhantes aos encontrados no presente estudo referente a *S.aureus* (Fig. 8), enquanto para *E.coli* (Fig. 6) os resultados encontrados foram mais satisfatórios pois mesmo em concentrações mais baixas, 10 µL/mL, o óleo essencial de hortelã cessou o crescimento de *E.coli* e não apenas reduziu, neste mesmo período de tempo.

Souza et al. (2006) realizaram também estudo na matriz alimentar comprovando a ação inibitória do óleo essencial de *orégano (vulgare o.)* na contagem total de bactérias na carne armazenada sob refrigeração. As diferentes concentrações (80, 40, 20 µL/mL) foram escolhidos com base nos valores da CIM anteriormente encontrados. O desempenho antimicrobiano de óleo essencial de *orégano (vulgare o.)* na matriz alimentar confirmou seu potencial antimicrobiano observado nos estudos *in vitro*. Adição de óleo essencial foi capaz de reduzir a contagem de *S.aureus* na carne quando comparado com o ensaio controle (amostras de carne crua sem óleo), ambos com mesma concentração de bactérias iniciais, por um período de 72 horas. Os Resultados foram semelhantes aos do presente estudo, no entanto a redução de 1 log₁₀ UFC/mL foi mantida por 120 horas (Fig. 8), reduzindo ainda mais posteriormente (Fig. 9).

Silva et al. (2009) analisaram o potencial inibitório do óleo essencial (OE) de *Saião K. brasiliensis* no crescimento de *Staphylococcus aureus* nas concentrações de 1%, correspondente a sua CIM e na concentração de 4% e 8%, por 24 horas. A menor concentração do OE de *K. brasiliensis* não inibiu a amostra, apresentando uma curva de crescimento equitativo a curva controle. Na concentração de 4% o início da inibição ocorreu a partir da sexta hora de exposição ao óleo essencial com uma diminuição de 1 log₁₀ em UFC/mL, semelhante ao comportamento da amostra padrão ATCC 6538 tratada na maior concentração (8%). Porém nesta concentração, o óleo essencial inibiu em 24 h o crescimento bacteriano. A ação observada foi

considerada bacteriostática por reduzir 1 \log_{10} UFC/mL a partir da sexta hora de exposição da amostra ao óleo essencial nas concentrações de 4% e 8%, pois Jones et al. (2002) consideraram atividade bacteriostática quando houve redução de até dois \log_{10} CFU/ml comparado ao inóculo inicial. O presente estudo revelou resultados satisfatórios uma vez que na concentração 1%, o óleo essencial de Hortelã apresentou diminuição de 1 \log_{10} em UFC/mL no mesmo período (Fig. 8).

O número de pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais na matriz de alimentos ainda pode ser considerado pequeno quando comparado com o número de pesquisas *in vitro* (BURT, 2004). Mas Mendonça (2004) acompanhou a inibição do crescimento de *S.aureus*, inoculado em ricota cremosa adicionada de óleos essenciais de Cravo-da-índia (concentração 1%), Manjerição(10%) e orégano(concentração 5%) no decorrer de 0, 6, 12, 24, 48 horas e 5, 10, 15 e 21 dias. O óleo essencial de cravo-da-índia apresentou redução do número de micro-organismos na ordem de 3,5 \log_{10} UFC/mL após 6 horas de inoculação; o de manjerição foi na ordem de 3,5 \log_{10} UFC/mL nas seis primeiras horas e, com 24 horas, ocorreu diminuição de mais 1 \log_{10} UFC/mL, permanecendo até 21 dias (504 horas); o de orégano foi de 3,35 \log_{10} UFC/mL para as primeiras 6 horas de inoculação, porém com 21 dias (504 horas), a redução foi menor, 3,0 \log_{10} UFC/mL. Isso demonstra que uma menor ação nos últimos dias de análises, é devido a uma redução na atividade antimicrobiana destes compostos, principalmente o composto ativo timol, que pode ser afetado por proteínas, afirma Mendonça (2004). Os valores encontrados no presente estudo para *S.aureus* apresentou redução de 3 \log_{10} UFC/mL no período de 21 dias, valor aproximado ao encontrado por Mendonça (2004), e com 28 dias ocorreu redução de mais 1 \log_{10} UFC/mL, totalizando redução de 4 \log_{10} UFC/mL (Fig. 9).

Alarcón (2007) também realizou estudo em matriz alimentar (ricota), analisando a inibição do crescimento de *S.aureus* e *E.coli*, por óleos essenciais de orégano (concentração de 1%) e pimenta-do-reino preta (concentração 5%), os sistemas foram analisados após 0, 6, 12, 24, 48 horas e 5, 10, 15 e 21 dias, armazenados a 7°C. Comparando a atuação dos dois óleos, observou-se que o óleo essencial de orégano foi mais eficiente em reduzir o número de células de *S.aureus*. O óleo essencial de orégano reduziu em 3,3 \log_{10} UFC/g após 48 horas de armazenamento da ricota a 7°C e o óleo essencial de pimenta-do-reino reduziu em 1,5 \log_{10} UFC/g após 120 horas. Estes valores permaneceram constantes até 21

dias (540 horas) de armazenamento, período de condução do experimento. Estes resultados diferem dos encontrados no presente estudo, quando o óleo essencial de Hortelã (concentração 1%), reduziu 1 log UFC/ml após 24 horas de armazenamento, permanecendo desta forma até 120 horas (Fig. 8), porém não manteve esta redução durante todo o período do experimento, pois reduziu 1 log₁₀UFC/mL a cada sete dias, totalizando uma redução de 4 log₁₀ UFC/mL após 28 dias de armazenamento (Fig. 9), enquanto o controle não apresentou variação durante os 28 dias de experimento se mantendo com crescimento de 10⁶ UFC/mL.

Para *E.coli* Alarcón (2007), encontrou diminuição com uso do óleo essencial de orégano em 1,7 log₁₀ UFC/g, após as primeiras 24 horas de armazenamento. Em contraste, o óleo essencial de pimenta-do-reino reduziu somente 1 log₁₀ UFC/g após as primeiras 12 horas de armazenamento. Após este período, as concentrações de *E.coli* se mantiveram constantes até o final do experimento. Estes valores também divergem dos encontrados no presente estudo, pois para *E.coli* com uso do óleo essencial de Hortelã, o crescimento bacteriano foi reduzido a zero após 24 horas de armazenamento (Fig. 6) e assim permaneceu até 28 dias de experimento (Fig. 7).

O resultado supracitado do presente trabalho(fig. 8 e 9) também diferiu daqueles observados por Oliveira (2010), que avaliou a inibição dos compostos fenólicos Timol e Carvacol, componentes majoritários do óleo essencial de orégano (*O.vulgare*), sobre o crescimento de cepas de *S.aureus* isolados de alimentos. As concentrações testadas foram de 1,25µL/mL para o Carvacol e de 0,6 µL/mL para o Timol em ensaio com caldo carne e em modelo alimentar (carne). As análises ocorreram em intervalos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas de experimento. No caldo carne o Timol e Carvacol provocou uma redução na contagem bacteriana de 2 log₁₀ UFC/g após 24 horas, estes valores foram mantidos até o final do experimento, 96 horas. Quando analisados no modelo alimentar (carne), o timol e carvacol em combinação com ácido acético reduziu o inóculo inicial em 4 log₁₀ UFC/g após 24 e 48 horas, respectivamente, porém ocorreu um ligeiro aumento na contagem das bactérias até o final do experimento, 96 horas.

6. Conclusões

O óleo essencial de Hortelã demonstrou eficiência bactericida in vitro na inibição do crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

No alimento (in vivo) o óleo essencial de hortelã apresentou eficiência para combater *Escherichia coli*, na concentração utilizada.

A atividade do óleo essencial reduziu o *Staphylococcus aureus* a níveis aceitáveis (100 ufc/ml), no entanto após um longo período de tempo de contato. Isto demonstra a interferência dos componentes do alimento no combate a este micro-organismo.

O óleo essencial de Hortelã é uma boa opção para a substituição de aditivos sintético em alimentos, por atuar como inibidor de crescimento bacteriano.

7. Apoio Financeiro

Este projeto é parte integrante do projeto intitulado “Soro lácteo: caracterização físico-química e aproveitamento na elaboração de bebidas com frutas e hortaliças” aprovado no edital 06/2008 – PROGRAMA DE INFRA-ESTRUTURA PARA JOVENS PESQUISADORES - Programa Primeiros Projetos – PPP/FACEPE/CNP, processo APQ-0447-5.07/08. Desta forma este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro da FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), pelo financiamento do projeto, e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsa de iniciação científica.

8. Referências

ALARCÓN, M. M. V. **Efeito inibitório dos óleos essenciais no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em queijo ricota.** 2007. 56p. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

ALMEIDA, K.E., TAMIMIE, A.Y., OLIVEIRA, M.N. Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria, **LWT-Food Science and Technology**, *in press*. 2008a.

ALMEIDA, K.E., TAMIME, A.Y., OLIVEIRA, M.N. Acidification rates of probiotic bacteria in Minas Frescal cheese whey, **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, pp. 311-316. 2008b.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4 ed. Washington, D.C., 2001. 676p

AOAC Official methods of analysis, 13. ed. Washington, 2002.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S.I.; OLIVEIRA, J.M.; TEIXEIRA, J.A. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, 112, 929–935, 2009.

BARA, M.T.F.; Estudo da atividade antibaxteriana de plantas medicinais, aromaticas, e corantes naturais. **Revista brasileira de Farmacognosia**, Goias- Goiânia, 2000.

BEHMER, M. L. A.; Tecnologia do Leite – 15ª Edição, Editora Nobel, São Paulo – SP, 1991.

CHIAPPINI, C. C. J.; SANTOS, N. N.; Determinação de alguns parâmetros físicos e químicos do soro de queijo. **Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes**, v.50, p.249-252, 1995.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. *Química nova*, 16(3) (1993)

De WIT, J.M.; HONTELEZ-BACKX, E. Les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum; conséquences des traitements thermiques. **La Techniques Laitiexe**, v.952, mar., p.19-22, 1981.

FAO - FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. Disponível em: <<http://apps.fao.org/page/collections>>. Acesso em: 29 fev 2008.

FERREIRA, C.L.L.F. Relevância da utilização de soro e leiteiro na indústria de laticínios. **Indústria de Laticínio**, n. 11, p.39-40, 1997.

FIGUEIROA, J.G. Ciência no campo: Sinal verde para a reestruturação da agroindústria do leite no agreste pernambucano, 2005. Disponível em: <<http://www.nordeste rural.com.br/dev/nordeste rural/matler.asp?newsId=2826>> Acesso: 15 de abril de 2006.

FONSECA, L.M. Fractionation of whey proteins by complex formation and membrane filtration. 1999. 250f. **Tese** (Doutorado) - University of Wisconsin, Madison.

FOSUM, E. Nutritional evaluation of whey protein concentrates and their fractions. **Journal of Dairy Science**, v.57, n.6, p.665-670, 1974.

FURTADO, M. M.; A arte e a ciência do queijo – 2ª Edição, Editora Globo, São Paulo – SP, 1991.

FLORENTINO, E.R.; MACEDO, G.R.; SANTOS, E.S.; PEREIRA, F.M.S.; SANTOS, F.N.; SILVA, S.F. Caracterização do soro de queijo visando processo de aproveitamento. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 130, p. 30-32, 2005.

HOFFMANN, F. L.; SOUZA, S. J. F.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VINTURIM, T. M.; DUTRA, A. L. Determinação da atividade antimicrobiana "in vitro" de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 11-20, jan./jun.1999.

LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N.; SOUZA, E.L.; TRAVASSOS, A.E.R.; Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência de Tecnologia em Alimentos**, Campinas, 29(3): 542-545, jul.-set. 2009

KOSIKOWSKI, F.U. Whey utilization and whey products. **Journal of Dairy Science**, v.62, p.1149-1160, 1979.

MACIEL, J. F.; SANTOS, J. V. P.; SARAIVA, S. H. et al. Enriquecimento nutricional de pão de forma com soro de queijo. **Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes**, v.54, p.114-116, 1999.

MARWAHA, S.S.; KENNEDY, J.F. Review: whey-pollution problem and potential utilization. **International Journal of Food Science and Technology**, n.23, p.323-336, 1988.

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos oleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 72p. Dissertação (Doutorado em Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

MEILGAARD, M. CIVILLE, G., CARR, B.T. Sensory evaluation techniques. **London: CRC. PRESS**, Inc., 2. 281, 1987.

MITCHELL, T. C. C. **Efetividade do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L., LAMIACEAE) na inibição do crescimento de espécies de *Aspergillus***

Potencialmente toxigênicos. 2008. Dissertação (Mestrado em Nutrição) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

MORR, C. V. Effect of heating and elevated temperature storage on cheese whey. *J Food Sci.*, v.55, p.1177-1179, 1990.

MOHLER, M.R.; HUGUNIN, P.G.; EBER, S.K. Whey-bases nonfat milk replaces in light chocolate-flavoured compounds coolings. *Food Technology*, v.35, n.6, p.79-81, 1981.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; JUNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1): 108-113, Jan./Mar. 2007

NELSON, F.E.; BROWN, W. Corrosion whey utilization in fruit juice drinks. *Journal of Dairy Science*, v.52, n.6, p.901, 1969.

NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 4ª ed., São Paulo, 2005.

OLIVEIRA, C. E. V. **Influência de Timol e carvacol sobre o crescimento, características metabólicas e potencial enterotoxigênico de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos.** 2010. Dissertação (Mestrado em Nutrição)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, L. K. R. TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16(1): 77-82, Jan./Mar. 2006

PAULUS, D.; MEDEIROS, S. L. P.; SANTOS, O. S.; MANFRON, P. A.; DOURADO, D. N.; BORCIONI, E.; FABBRIN, E. Rendimento de biomassa e óleo essencial de menta japonesa (*Mentha arvensis* L.) *REV.BRAS.PL.MED.*, Botucatu, v.7.n.1.p. 34-42, 2004.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, 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. *Ciênc. agrotec., Lavras*, v. 30, n. 4, p. 731-738, jul./ago., 2006.

PESCUMA, M., HÉBERT, E.M., MOZZI, F., DE VALDEZ, G.F., 2008, Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content, *Food Microbiology*, v. 25, pp. 442-451.

PORTE, A.; GODOY, R.L.O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobianas e química do óleo essencial. *B. CEPPA*. v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.

RIBEIRO, A. C.; MARQUES, S. C.; SODRÉ, A. F.; ABREU, L. R.; PICCOLI, R. H. Controle microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 29, n. 1, p. 113-117, jan./fev. 2005.

RICHARDS, N.S.P.S. Emprego racional de soro láctico. **Revista Indústria de Laticínios**, n. 9, p. 67-69, 1997.

SILVA, C.E.S.; CARVALHO, N.C.; GONÇALVES, T.C.C. O desenvolvimento do produto: soro de leite bovino no combate à desnutrição. **Anais. XXIII ENEGEP – Ouro Preto, MG**, 2003.

SILVA, J. G.; PEREIRA, M. S. V.; GURGEL, P. D.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, I. A.; Inhibitory activity of aerial parts of *Kalanchoe brasiliensis* Cambess against microorganisms with variation profile antibiotic-resistant. **Rev. bras. farmacogn.** vol.19 no.3 João Pessoa July/Sept. 2009.

SIQUEIRA, I.M.C.; SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; GLÓRIA, M.B.A. Importância e utilização dos derivados de soro de queijo. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 97, p. 31-35, 2002.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**. vol.37 no.4 São Paulo Outubro/Dezembro 2006.

SUFFREDINI, I. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de três extratos vegetais antibacterianos selecionados da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica brasileiras. **Rev Inst Ciênc Saúde**. 2007; 25(2):127-9.

SGARBIERE, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n.4, 2004.

SMITHERS, G. W., BALLARD, F. J., COPELAND, A. D., DE SILVA, K. J., DE DIONYSIUS, D. A., FRANCIS, G. L., et al. (1996). New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 8, p. 1454–1459.

SOARES, D.S. Desenvolvimento de formulação para produção de iogurte à base de soro de leite. 2008. 86f. **Dissertação** (Mestrado em Nutrição) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE.

TEIXEIRA E.; MEINERT, E.M.; BARBETTA, P.A. **Análise sensorial de alimentos**, Florianópolis: Ed. UFSC, 1987.

TEIXEIRA,L.V.; FONSECA, L.M. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p.243-250, 2008.

