

**Camila Carolina de Sousa Silva**

**EFEITO SANITIZANTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *SALMONELLA*  
CHOLERAESUIS TRANSFERIDA DE CARNE DE FRANGO PARA AÇO  
INOXIDÁVEL E POLIPROPILENO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto de Ciências Agrárias da Universidade  
Federal de Minas Gerais como requisito parcial  
para obtenção do título de Bacharel em Engenharia  
de Alimentos

Orientadora: Roberta Torres Careli

Montes Claros, 21 de Junho de 2018.

Camila Carolina de Sousa Silva. EFEITO SANITIZANTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *SALMONELLA CHOLERAESUIS* TRANSFERIDA DE CARNE DE FRANGO PARA AÇO INOXIDÁVEL E POLIPROPILENO

Aprovado pela banca examinadora constituída por:

Prof. Maximiliano Soares Pinto - ICA/UFMG

Camila Rocha - Mestre em Ciência de Alimentos – UFV

Prof<sup>a</sup>. Roberta Torres Careli - Orientadora ICA/UFMG

Montes Claros, 21 de junho de 2018

Dedico esse trabalho a todos que contribuíram para a realização deste. Em especial aos meus pais, Maria Eliana e Geraldo Magela, aos meus irmãos, Felipe Augusto e Lucas Marcelo, com toda minha gratidão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me abençoar e me honrar em todos os momentos da minha vida.

A minha família, em especial a minha mãe, minha melhor amiga e grande incentivadora dos meus sonhos. Ao meu pai pelo seu amor. Aos meus irmãos, pelo incentivo, nosso laço é eterno.

A todos os meus amigos, em especial àqueles que conviveram comigo durante toda a graduação.

Aos técnicos do laboratório que me auxiliam no desenvolvimento desse trabalho, em especial a Cintia.

À professora Roberta Torres Careli, pela paciência e generosidade.

Agradeço ao professor Maximiliano e a mestre Camila Rocha por gentilmente terem aceito o convite para participar da banca de avaliação e por contribuírem para a melhoria deste trabalho.

Agradeço a Francine Fonseca técnica do laboratório de plantas medicinais pelo auxílio.

Ao laboratório de Química Instrumental do Instituto de Ciências Agrárias, pela colaboração na realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Minas Gerais, pela estrutura física para a realização dos experimentos.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa concedida para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação colaborando para que eu chegasse até aqui.

“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco; à medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida”

(Johan Goethe)

## RESUMO

A contaminação de superfícies processadoras de alimentos com microrganismos patogênicos é uma ocorrência de grande preocupação, pois reduzem a qualidade higiênico sanitária dos alimentos e conseqüentemente causam danos à saúde do consumidor. No presente estudo avaliou-se a ação antibacteriana dos óleos essenciais (OE) de orégano, canela e menta frente a células de *Salmonella Choleraesuis* biotransferidas de cortes de peito de frango para superfícies de aço inoxidável e polipropileno. Avaliou-se através da cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM) os constituintes majoritários presentes nos OE. Através do método de macrodiluição em caldo foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para cada OE. O potencial de transferência de *S.Choleraesuis* contaminada artificialmente na carne de frango para as superfícies foi realizado por 24 h a  $7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A ação sanitizante dos OE em concentrações encontradas na CIM sobre células aderidas nas superfícies de aço e polipropileno foram avaliadas após diferentes tempos de contato (2,5; 5; 10; 15 e 20 min). Os compostos majoritários identificados no sistema CG-EM dos OE correspondem aos encontrados na literatura. *S. Choleraesuis* apresentou perfil de resistência diferenciado de acordo com o OE testado. Cubos de peito de frango contaminados com *S.Choleraesuis* foram capazes de transferir mais de  $3\text{ log UFC.cm}^{-2}$  para as superfícies. Todas as soluções sanitizantes a base de OE reduziram totalmente as células aderidas no aço inoxidável em 5 min de contato. Enquanto que para o polipropileno, o OE de menta foi capaz de reduzir totalmente as células aderidas e os demais OE reduziram apenas 1 ciclo log, em todos os tempos avaliados. Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que a utilização de sanitizantes a base de óleos essenciais de orégano, canela e menta são uma alternativa ao uso de sanitizantes convencionais.

**Palavras-chave:** Adesão bacteriana. Contaminação cruzada. Sanitizantes naturais. Concentração inibitória mínima.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cromatograma CG/MS - Óleo Essencial de *Origanum vulgare* ..... 17
- Figura 2.** Cromatograma CG/MS - Óleo Essencial de *Cinnamomum zeylanicum*..... 17
- Figura 3.** Cromatograma CG/MS - Óleo Essencial de *Mentha piperita* ..... 17

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Composição Química dos constituintes presentes no óleo essencial de *Origanum vulgare*, determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa..... 18
- Tabela 2.** Composição Química dos constituintes presentes no óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*, determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa ..... 19
- Tabela 3.** Composição Química dos constituintes presentes no óleo essencial de *Mentha piperita* determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa ..... 20
- Tabela 4.** Número de células aderidas em superfícies de aço inoxidável, expressas em log UFC.cm<sup>-2</sup>, após tratamento com soluções sanitizantes à base de OE e solução controle em diferentes tempos de contato. .... 23
- Tabela 5.** Número de células aderidas em superfícies de polipropileno, expressas em log UFC.cm<sup>-2</sup>, após tratamento com soluções sanitizantes à base de OE e solução controle em diferentes tempos de contato. .... 24



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	-	Graus Celsius
µL	-	Microlitro
BHI	-	Brain Heart Infusion
C.zeylanicum	-	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>
CBM	-	Concetração Bactericida Mínima
CG-MS	-	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa
CIM	-	Concentração Inibitória Mínima
Cm	-	centímetros
eV	-	elétron volts
g	-	gramas
h	-	horas
IRL	-	Índice de Retenção Linear
M.piperita	-	<i>Mentha piperita</i>
Min	-	minuto
mL	-	mililitros
NaCl	-	Cloreto de Sódio
O.vulgare	-	<i>Origanum vulgare</i>
OE	-	Óleos Essenciais
TR	-	Tempo de Retenção
TSA	-	Ágar Triptona de Soja
TTC	-	Tetrafeniltetrazólico
UFC	-	Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
1. Objetivos específicos.....	12
2. Metodologia .....	12
2.1. Microrganismo.....	12
2.2. Obtenção dos óleos essenciais de <i>Origanum vulgare</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> e <i>Mentha piperita</i> .....	12
2.3. Análise dos constituintes majoritários presentes nos óleos essenciais de <i>O.vulgare</i> , <i>C.zeylanicum</i> e <i>M.piperita</i> por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM).....	12
2.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....	14
2.5. Teste de exclusão microbiológica dos peitos de frango.....	14
2.6. Potencial de biotransferência dos microrganismos para superfícies de aço inoxidável e de polipropileno .....	15
2.7. Efeito sanitizante dos OE sobre as células aderidas em aço inoxidável e polipropileno	15
3. Análise Estatística .....	16
4. Resultados e Discussão .....	16
4.1. Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG-EM).....	16
4.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	21
4.3. Biotransferência de <i>Salmonella Choleraesuis</i> para as superfícies de aço inoxidável e polipropileno.....	22
4.4. Efeito sanitizante dos óleos essenciais sobre células aderidas nos cupons de aço inoxidável e polipropileno .....	23
5. Conclusão.....	25
Referencias .....	26

## 1. Introdução

O processo de higienização em estabelecimentos processadores de alimentos é realizado nas etapas de limpeza e desinfecção. A limpeza consiste na remoção de substâncias minerais e/ou orgânicas indesejáveis. Na desinfecção ou sanitização, ocorre a redução por método físico ou químico do número de microrganismos a um nível que não comprometa a qualidade higiênico-sanitária do alimento (BRASIL, 2004).

Falhas no procedimento de higienização favorecem o acúmulo de resíduos de alimentos em superfícies e equipamentos na indústria (ARAÚJO, *et al.*, 2013). Os microrganismos se aderem a estas superfícies e encontram condições favoráveis para o seu crescimento e formam uma massa celular rica em nutrientes, resíduos e outros microrganismos (BAGGE-RAVN, *et al.*, 2003), que podem contaminar as superfícies, reduzir a vida útil dos alimentos e causar malefícios a saúde do consumidor.

Para a escolha de um sanitizante deve-se observar sua eficiência na remoção de sujidades, o efeito causado nos equipamentos e superfícies e os rejeitos lançados nos efluentes industriais (NASCIMENTO, *et al.*, 2010).

A busca por produtos seguros e com menor impacto ao meio ambiente e à saúde estão sendo cada vez mais exigidos pelos consumidores (BEIRÃO DA COSTA *et al.*, 2014). Para atender essa demanda, alternativas não convencionais de sanitização são fonte de estudo, entre elas, a ação antimicrobiana de compostos naturais.

Os óleos essenciais de plantas são constituídos por moléculas biologicamente ativas que possuem efeitos antimicrobianos comprovados e agem em sua maioria diretamente na membrana citoplasmática dos microrganismos, causando alterações nas estruturas celulares (Holey e Patel, 2005; Devi *et al.*, 2010)

Considerando o uso de óleos essenciais como uma alternativa promissora para os antimicrobianos utilizados na indústria de alimentos, visto que reduzem o impacto negativo ao meio ambiente e mantem a segurança microbiológica dos alimentos (BRUGNERA *et al.*, 2011), objetivou-se avaliar a ação antibacteriana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Mentha piperita* frente a células de *Salmonella Choleraesuis* biotransferidas de cortes de peito de frango para superfícies de aço inoxidável e polipropileno.

## 2. Objetivos específicos

Identificar os compostos majoritários presentes nos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Mentha piperita*;

Determinar a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima dos óleos essenciais frente a *Salmonella Choleraesuis*;

Avaliar a biotransferência de *Salmonella Choleraesuis* presentes em carne de peito de frango nas superfícies de aço inoxidável e polipropileno;

Avaliar o efeito sanitizante dos óleos essenciais nas superfícies de aço inoxidável e polipropileno.

## 3. Metodologia

### 3.1. Microrganismo

O microrganismo avaliado foi a estirpe padrão *Salmonella Choleraesuis* ATCC 10708 que faz parte da bacterioteca do laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), campus Montes Claros, Minas Gerais.

### 3.2. Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE) de orégano, canela e menta foram adquiridos comercialmente pela empresa FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda.

### 3.3. Análise dos constituintes majoritários presentes nos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)

As amostras de óleos essenciais foram pesadas (2 mg) utilizando-se balança analítica da Shimadzu (Kyoto, Japão) e solubilizadas em diclorometano (1 mL). Em seguida foram transferidas para *vials* de 2 mL e analisadas.

As análises qualitativas dos óleos foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), utilizando-se cromatógrafo a gás da Agilent Technologies (GC 7890A) equipado com detector de ionização por impacto de elétrons (MS 5975C) e coluna capilar DB-5MS (Agilent Technologies, 30 m comprimento x 0,25 mm diâmetro interno x 0,25 µm espessura do filme). Hélio (99,999 % de pureza) foi utilizado como gás de arraste a uma taxa de 1 mL min<sup>-1</sup>. Utilizando um autoinjeter (CTC combiPaL), 1 µL da amostra foi injetada no cromatógrafo a uma razão de Split 1:5. O injetor split/splitless foi mantido a 220 °C. A coluna cromatográfica inicialmente a 60 °C, foi aquecida a uma taxa de 3

$^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até  $240^{\circ}\text{C}$  permanecendo por 10 min. Após a separação dos compostos a temperatura foi elevada até  $300^{\circ}\text{C}$  e permanecendo por 3 minutos (post run) para limpeza do sistema. A temperatura da interface foi mantida a  $280^{\circ}\text{C}$ , a ionização realizada com impacto de elétrons a 70 eV. A fonte de íons mantida a  $230^{\circ}\text{C}$  e a aquisição de dados realizada pelo monitoramento total de íons 45-550 (m/z).

A identificação dos constituintes majoritários da amostra foi realizada através da comparação dos espectros de massas da biblioteca NIST (banco de dados do equipamento). Assim, o índice de similaridade entre os espectros foi utilizado para avaliar e identificar os compostos nas amostras. Utilizou-se também o Índice de Retenção Linear (IRL) como parâmetro de identificação dos compostos presentes na amostra (VIEGAS e BASSOLI, 2007).

Para a determinação do IRL, uma solução de  $20\ \mu\text{L.mL}^{-1}$  padrão de n-alcenos ( $\text{C}_7 - \text{C}_{22}$ ) foi utilizada para verificar o desempenho do sistema CG-EM e posteriormente calcular o IRL de cada composto presente nas amostras. O padrão dos referidos alcanos foi injetado no sistema CG-EM operando nas mesmas condições descritas na análise dos compostos no sistema CG-MS, (VIEGAS e BASSOLI, 2007).

Calculou-se o IRL através da equação 1 e comparou-se os  $\text{IRL}_{\text{obtido}}$  com os valores  $\text{IRL}_{\text{referencia}}$  citados na literatura (ADAMS,2012).

**Equação 1.** Cálculo para determinar o IRL.

$$\text{IRL} = 100 \left| \frac{(t_c - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)} \right| + n$$

Em que, IRL é o índice de retenção linear,  $t_c$  é o tempo de retenção do composto de interesse,  $t_{n+1}$  é o tempo de retenção do hidrocarboneto posterior,  $n$  é o  $n^{\circ}$  de carbonos do hidrocarboneto anterior.

### **3.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

A determinação da concentração mínima necessária para inibir o crescimento de *S.Choleraesuis* foi realizada utilizando-se o método de macrodiluição em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (NCCLS, 2003).

Para a CIM, após padronizar as soluções a concentração de 0,057 mg.mL<sup>-1</sup> para os OE de orégano e canela e 0,912 mg.mL<sup>-1</sup> para o OE de menta, foram produzidas diluições subsequentes, contendo 2,5 mL e Tween 80 da concentração anterior e 2,5 mL do caldo BHI, obtendo-se as concentrações finais de 0,0001; 0,0002; 0,0005; 0,001; 0,003; 0,007; 0,014; 0,028; 0,057 mg.mL<sup>-1</sup> para os óleos de orégano e canela, para o óleo de menta 0,001; 0,003; 0,007; 0,014; 0,028; 0,057; 0,114; 0,228; 0,456; 0,912 mg.mL<sup>-1</sup>.

Inoculou-se 12,5 µL da suspensão do microrganismo em cada tubo contendo as soluções de OE previamente determinadas. Os controles dessas concentrações foram incubados sem o acréscimo da suspensão de *S.Choleraesuis*. O controle positivo foi realizado com acréscimo de 12,5 µL da suspensão direta da bactéria e o controle negativo foi avaliado em tubos sem o acréscimo da bactéria.

Todos os tubos foram homogeneizados em vórtex por 1 min e incubados a 35 °C por 24 h. Após este período, adicionou-se nos tubos 125 µL do reagente cloreto de tetrafeniltetrazóico (TTC) para avaliar o crescimento microbiano. Os tubos que apresentaram coloração vermelha após a adição do reagente indicavam o crescimento microbiano, aqueles que permaneciam com a coloração amarela indicavam ausência microbiana.

Para a determinação da CBM, uma alçada da amostra dos tubos que não apresentaram coloração vermelha foi transferida para placas contendo Ágar Triptona de Soja (TSA), as quais foram incubadas a 35 °C por 24 h para observação do crescimento microbiano.

### **3.5. Teste de exclusão microbiológica dos peitos de frango**

O peito de frango foi obtido comercialmente e armazenado em freezer a -18°C, até o momento das análises. Em todas as amostras foram realizados testes de exclusão microbiológica para verificar a ausência de contaminação por *Salmonella* sp., espécie avaliada nesse estudo. Utilizou-se o método de plaqueamento, seguido de testes bioquímicos para determinação de *Salmonella* sp, na carne de peito de frango (ANDREWS et al., 2001). A partir dos resultados negativos para *Salmonella*, as amostras de peito de frango foram utilizadas nas etapas experimentais.

### 3.6. Biotransferência de *Salmonella Choleraesuis* para as superfícies de aço inoxidável e de polipropileno

Para avaliação do potencial de biotransferência, cubos de peito de frango com  $10 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$  ( $2,0 \times 2,0 \text{ cm}$ ) foram contaminados com  $7 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  de *S. Choleraesuis* e colocados em contato com cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 ( $2,0 \text{ cm} \times 2,0 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm}$ ) e de polipropileno ( $2,0 \text{ cm} \times 2,0 \text{ cm} \times 0,2 \text{ cm}$ ) separadamente, por 24 h a  $7 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os cupons foram previamente higienizados e esterilizados (ROSSONI e GAYLARDE, 2000).

Para a quantificação das células bacterianas transferidas dos cubos de peito de frango para cada superfície, os cupons foram imersos em 10 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,85 % (m/v) por 1 min a fim de retirar as células planctônicas (VALERIANO et al., 2010); transferidos separadamente para 10 mL de solução NaCl a 0,85 % (m/v) e sonicados por 2 min utilizando-se banho de ultrassom (QUIMIS<sup>®</sup>), com frequência de 40 kHz, promover o desprendimento de células aderidas nas superfícies dos cupons (MALHEIROS et al., 2012). Posteriormente, foram realizadas diluições decimais seriadas sucessivas, com plaqueamento em Ágar Hektoen Entérico (HIMEDIA<sup>®</sup>) e incubação a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24h. Após essas condições de crescimento, as unidades formadoras de colônia (UFC) foram quantificadas e os resultados expressos em  $\text{UFC.cm}^{-2}$ , de acordo com Careli *et al.* (2009).

### 3.7. Efeito sanitizante dos OE sobre as células aderidas

Para determinação do efeito antibacteriano dos OE frente a *S. Choleraesuis* biotransferidas por 24 h a  $7,0 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ , os cupons de cada superfície foram submetidos a tratamentos com soluções sanitizantes nas CIM de cada OE. Para isso, cada cupom foi retirado das soluções com auxílio de pinça estéril e imerso em solução de NaCl a 0,85 % por 1 min para a remoção de células planctônicas. Em seguida, foram imersos individualmente em frascos com 10 mL de solução sanitizante composta por solução de NaCl a 0,85%, Tween 80 e OE nas concentrações previamente estabelecidas através do teste de CIM. A ação sanitizante das soluções contra as células aderidas às superfícies dos cupons foram avaliadas após 2,5; 5; 10; 15 e 20 min de contato a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  sob condições estáticas. Além dos tratamentos com as soluções dos OE, foram utilizadas soluções controle, compostas por solução de NaCl a 0,85% e Tween 80, para efeito de comparação com a eficiência dos sanitizantes.

Os cupons foram transferidos, separadamente, para 10 mL de solução de NaCl a 0,85 % e sonicados por 2 min utilizando banho de ultrassom, com 40 kHz. Foram realizadas diluições decimais sucessivas, com plaqueamento em Ágar Hektoen Entérico (HIMEDIA<sup>®</sup>) e incubação a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h. Após essas condições de crescimento, as unidades formadoras de

colônia (UFC) foram quantificadas e os resultados expressos em UFC.cm<sup>-2</sup>, de acordo com Careli *et al.* (2009).

#### **4. Análise Estatística**

Todos os experimentos foram realizados com três repetições por tratamento. Para estimar a biotransferência bacteriana nas superfícies de aço e polipropileno foi realizado o teste t a 5 % de probabilidade. Para a enumeração das células aderidas nos cupons de aço inoxidável e polipropileno após o tratamento destes com soluções sanitizantes em diferentes tempos de contato, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4×5, constituído por quatro tratamentos (controle, OE de orégano, OE de canela e OE de menta) e cinco tempos de contato (2,5 min, 5 min, 10 min, 15 min e 20 min). Os resultados foram analisados pelo teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas a 5% de probabilidade e os resultados foram analisados com o auxílio do Statistical Analysis System - SAS 9.0 (2009).

#### **5. Resultados e Discussão**

##### **5.1. Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG-EM)**

Através das análises realizadas pelo sistema CG-EM, foi possível identificar 31 compostos para o OE orégano (Tabela 1), 28 para o OE canela (Tabela 2) e 27 para o OE de menta (Tabela 3), utilizando-se o sistema CG-EM, interpretação de espectros de massas (NIST) e índice de retenção linear. O IRL foi utilizado com o objetivo de auxiliar no processo de caracterização dos compostos. Para a maioria dos compostos identificados os valores de IRL obtidos estão coerentes com os valores descritos na literatura (ADAMS, 2012) aumentando a confiabilidade dos compostos identificados. Os compostos que não apresentam valores do IRL descrito por Adams, 2012, foram identificados apenas pela biblioteca NIST, sendo necessário a comparação através do uso de um padrão externo.

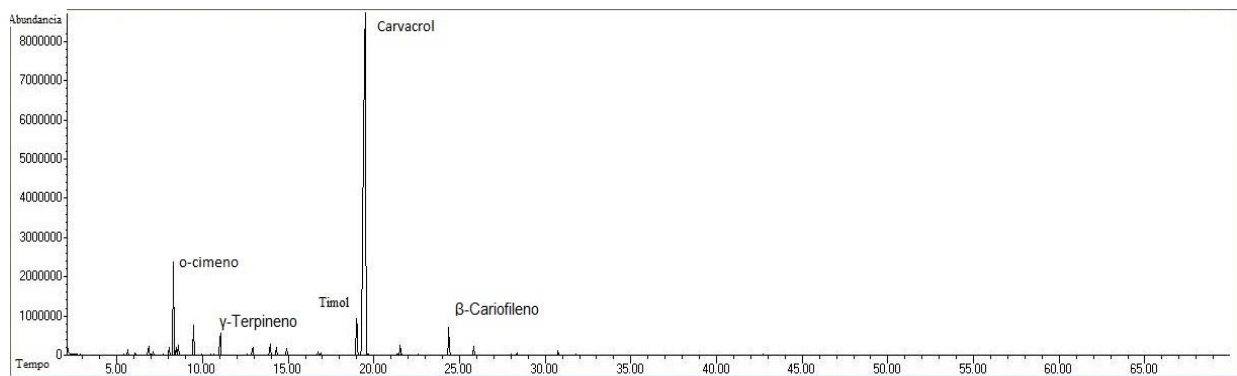
Como representado na Figura 1, os compostos majoritários encontrados no OE de orégano, foram carvacrol (75,39%), o-Cimeno (6,35%),  $\gamma$ -Terpineno (2,02%) e timol (3,92%), totalizando 87,68% da composição identificada (100,00%).

O eugenol (79,02%) foi o composto majoritário identificado no OE de canela (FIGURA 2), seguido pelos compostos  $\beta$ -Cariofileno (3,76%), Benzoato de Benzila (3,49%), Acetato de Eugenila (2,66%) e  $\beta$ -Linalol (1,82%), totalizando 90,75% da composição identificada (100%).



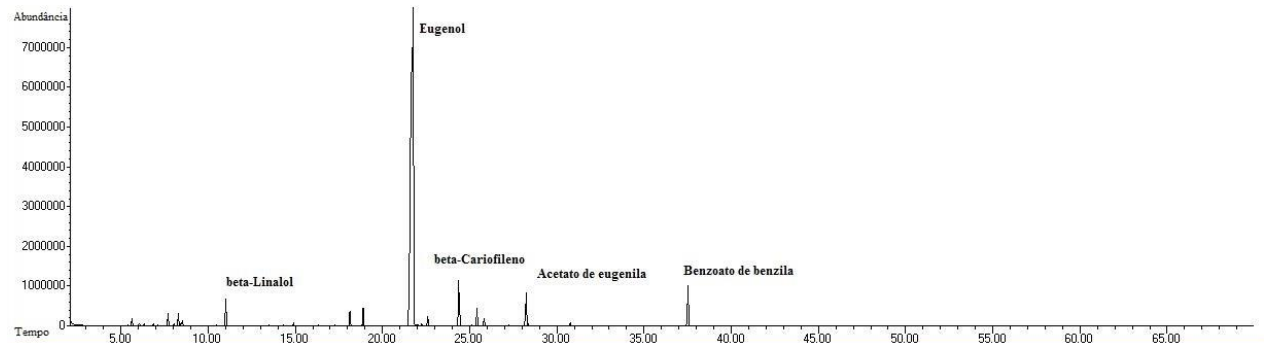
Os compostos majoritários identificados no OE de menta (FIGURA 3) foram mentol (41,30%), mentona (25,57%), Acetato de Isometol (6,55%) e Eucaliptol (5,46%), totalizando 78,88% da composição identificada (100%).

**Figura 1.** Cromatograma de íons totais obtidos por CG-EM do óleo essencial de orégano apresentando os principais compostos detectados na análise



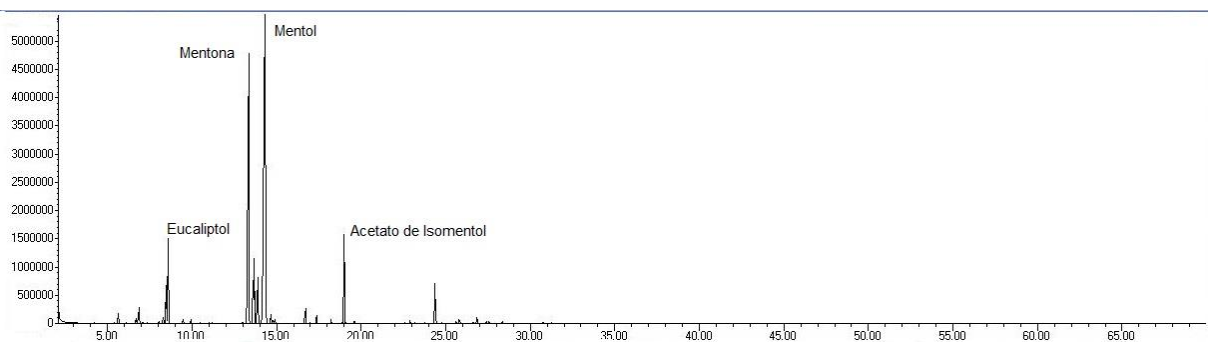
Fonte: Do autor, 2018.

**Figura 2.** Cromatograma de íons totais obtidos por CG-EM do óleo essencial de canela apresentando os principais compostos detectados na análise



Fonte: Do autor, 2018

**Figura 3.** Cromatograma de íons totais obtidos por CG-EM do óleo essencial de menta apresentando os principais compostos detectados na análise



Fonte: Do autor, 2018

**Tabela 1.** Composição Química dos constituintes presentes no óleo essencial de orégano, determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

Pico	TR (min)	Composto	IRL (obtido)	IRL (referencia)	Área (%)
1	5.631	1R- $\alpha$ -Pinene	932	932	0,439
2	6.076	Camfeno	948	946	0,154
3	6.848	L- $\beta$ -Pineno	977	974	0,745
4	6.989	Octan-3-ona	982	982	0,076
5	6.989	$\beta$ -Pinene	987	982	0,245
6	6.989	Octan-3-ol	995	NI	0,034
7	7.704	$\alpha$ -Felandreno	1006	1002	0,084
8	8.049	$\alpha$ -Terpineno	1016	1014	0,550
9	8.307	o-Cimeno	1023	1022	6,353
10	8.307	$\alpha$ -Limoneno	1027	1024	0,401
11	8.307	Eucaliptol	1031	NI	0,601
12	9.482	$\gamma$ -Terpineno	1056	1054	2,023
13	10.492	Terpinoleno	1084	1086	0,060
14	11.036	$\beta$ -Linalool	1099	1095	1,543
15	12.936	Cânfora	1145	1141	0,614
16	13.956	Borneol	1169	1165	0,859
17	14.322	4-Terpineol	1178	1174	0,647
18	14.931	$\alpha$ -Terpineol	1193	NI	0,593
19	16.330	Formato de Bornila	1226	NI	0,019
20	16.759	Metil timid éter	1236	1232	0,245
21	16.898	Cuminaldeido	1239	1238	0,153
22	18.990	Timol	1288	1289	3,925
23	19.525	Carvacrol	1300	1298	75,386
24	21.516	Eugenol	1347	NI	0,765
25	22.565	Copaeno	1372	1374	0,073
26	24.357	$\beta$ -Cariofileno	1415	NI	2,216
27	25.806	$\alpha$ -Humuleno	1450	1452	0,636
28	27.990	$\beta$ -Bisaboleno	1504	1505	0,066
29	28.353	$\delta$ -Cadineno	1513	NI	0,176
30	28.457	Calameneno	1515	NI	0,015
31	30.757	Óxido de cariofileno	1575	NI	0,305
Total					100%

\*NI (Não identificado)

**Tabela 2.** Composição Química dos constituintes presentes no óleo essencial de canela, determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

Pico	TR (min)	Composto	IRL (obtido)	IRL (referencia)	Área (%)
1	5.626	1R- $\alpha$ -Pinene	932	932	0,552
2	6.071	Canfeno	948	946	0,180
3	6.350	Benzaldeido	959	NI	0,135
4	6.848	$\beta$ -Pino	977	974	0,152
5	7.122	$\beta$ -Mirceno	987	988	0,046
6	7.698	$\alpha$ -Felandreno	1006	1002	0,792
7	8.041	$\alpha$ -Terpineno	1016	1014	0,087
8	8.293	o-Cimeno	1023	1022	0,830
9	8.457	D-Limoneno	1027	1024	0,087
10	8.520	$\beta$ -Felandreno	1029	1025	0,214
11	9.023	$\beta$ -Ocimeno	1043	1044	0,020
12	9.473	$\gamma$ -Terpineno	1055	1054	0,026
13	10.488	Terpinoleno	1083	1086	0,072
14	11.029	$\beta$ -Linalool	1098	1095	1,825
16	14.914	$\alpha$ -Terpineol	1192	NI	0,218
19	18.126	E)-Cinamaldeido	1268	1267	1,281
20	18.891	Safrol	1285	1285	1,387
21	19.302	Timol	1295	NI	0,015
22	19.593	Álcool Cinamílico	1302	1302	0,044
23	21.755	Eugenol	1353	1356	79,018
24	22.583	Copaeno	1372	1374	0,678
25	24.365	$\beta$ -Cariofileno	1415	NI	3,757
26	25.404	Acetato de cinamila	1440	1443	1,411
27	25.806	$\alpha$ -Humuleno	1450	1452	0,609
28	28.220	Acetato de Eugenila	1510	NI	2,662
29	28.355	$\delta$ -Cadineno	1513	NI	0,140
30	30.759	Óxido de cariofileno	1575	NI	0,274
31	37.524	Benzoato de Benzila	1758	1759	3,487
Total					100%

\*NI (Não identificado)

**Tabela 3.** Composição Química dos constituintes presentes no óleo essencial de menta determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

Pico	TR (min)	Composto	IRL (obtido)	LRI (referencia)	Área (%)
1	5.632	1R- $\alpha$ -Pineno	932	932	0,754
2	6.685	Sabineno	971	969	0,360
3	6.852	$\beta$ -Pineno	977	974	1,161
4	8.049	$\alpha$ -Terpineno	1016	1014	0,127
5	8.300	o-Cimeno	1022	1022	0,391
6	8.466	$\alpha$ -Limoneno	1027	1024	2,518
7	8.587	Eucaliptol	1031	NI	5,465
8	9.478	$\gamma$ -Terpineno	1055	1054	0,242
9	13.360	Mentona	1055	NI	25,568
10	13.609	Mentofurano	1061	NI	1,443
11	13.684	Isomentona	1063	NI	2,968
12	13.894	Isomentol	1068	NI	3,444
13	14.333	Mentol	1078	NI	41,298
14	14.678	Neoisomentol	1087	NI	0,566
15	14.932	$\alpha$ -Terpieol	1093	NI	0,252
16	16.718	Pulegona	1235	NI	1,151
17	17.373	Piperitona	1250	1249	0,598
18	18.225	Acetato de Mentila	1270	NI	0,278
19	18.987	Acetato de Isomentol	1288	NI	6,547
20	22.886	$\beta$ -Bourboneno	1379	NI	0,193
21	23.148	$\beta$ -Elemeno	1386	1389	0,095
22	24.355	$\beta$ -Cariofileno	1415	NI	3,313
23	25.621	$\gamma$ -Cadineno	1446	NI	0,130
24	25.802	$\alpha$ -Cariofileno	1450	NI	0,270
25	26.842	Germacrene D	1476	NI	0,514
26	27.546	$\gamma$ -Muuroleno	1493	NI	0,178
27	28.354	$\delta$ -Cadineno	1513	NI	0,176
Total					100%

\*NI (não identificado)

Fonte: Do autor, 2018

## 5.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

*S. Choleraesuis* ATCC 10708 demonstrou variações no perfil de resistência de acordo com o tipo de OE. O crescimento da bactéria nas soluções dos OE de orégano e canela foi inibido a 0, 00005 e 0,001 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Enquanto foram necessários 0,912 mg.mL<sup>-1</sup> de OE de menta para inibição da cepa avaliada. Estas mesmas concentrações foram capazes de provocar a morte celular detectada no teste de CBM.

Iscan *et al.* (2002), analisou a composição química de quatro marcas de óleos de menta adquiridas comercialmente e identificou 11 compostos, sendo mentol (27,5 a 42,3%) e mentona (18,4 a 27,9%) os compostos majoritários encontrados na amostra. O estudo avaliou a ação antimicrobiana dos OE e seus componentes isolados em dezessete microrganismos, sendo seis patógenos de origem alimentar (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*). Para *S. Typhimurium* foram determinadas CIM de 1,25 a 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> para as diferentes marcas. Os valores de CIM para os compostos isolados mentol e mentona foram 0,625 e 5,0 mg.mL, respectivamente. Evidenciou-se que *S. Typhimurium* foi mais sensível ao composto mentol quando comparado a mentona.

Sartoratto *et al.* (2004), encontraram resultados inibitórios dos OE de *O.vulgare*, frente a *Salmonella Choleraesuis* (CIM 0,6 mg.mL<sup>-1</sup>). O timol foi o composto mais fragmentado na amostra (38,0 %). Botrel et al, (2010), afirma que o carvacrol e timol são responsáveis pela ação antimicrobiana do OE de *O.vulgare* e que a mistura de carvacrol e timol produzem efeito sinérgico no OE de orégano.

Estudo realizado por Santurio *et al.* (2007) também demonstrou alta sensibilidade de *Salmonella enterica* frente ao OE de orégano, com CIM e CBM consideravelmente baixas (529 µg.mL<sup>-1</sup> e 661 µg.mL<sup>-1</sup>).

Trajano *et al.*, (2010), identificou os constituintes do OE de *C. zeylanicum*, adquirido comercialmente, através do sistema CG-EM, O eugenol (73,27%) foi o composto mais abundante presente no óleo, constando o efeito inibitório em cepas bacterianas (*Salmonella* entérica, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*).

Aligiannis *et al* (2001), considera que a atividade antibacteriana de um OE é forte quando apresenta valores de CIM entre 0,05 e 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, CIM moderada entre 0,6 e 1,5 mg.mL e atividade fraca acima de 1,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Assim os OE de orégano e canela avaliados no presente estudo demonstraram possuir forte atividade antimicrobiana e o OE de menta atividade moderada.

### 5.3. Biotransferência de *Salmonella Choleraesuis* para as superfícies de aço inoxidável e polipropileno

No teste de exclusão microbiológica foram obtidos resultados negativos para a presença de *Salmonella* sp. nas amostras de peito de frango.

Cubos de peito de frango, artificialmente contaminados com cerca de 7 log UFC.g<sup>-1</sup> de *S. Choleraesuis*, foram capazes de transferir mais de 3 log UFC.cm<sup>-2</sup> quando mantidos em contato com cupons de aço inoxidável e polipropileno por 24h a 7 °C.

Observou-se diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na quantidade de células aderidas nos cupons de polipropileno (4,3 log UFC.cm<sup>-2</sup>) em relação ao aço inoxidável (3,4 log UFC.cm<sup>-2</sup>), o que pode ser justificado pela maior rugosidade do polipropileno em relação ao aço inoxidável (OH *et al.*, 2009)

Rocha *et al.* (2014), avaliaram a adesão bacteriana e formação de biofilme em superfícies de polipropileno de bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Choleraesuis* e *Escherichia coli*) e Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*). O estudo demonstrou que *S. Choleraesuis* atingiu contagem média de 5 log UFC.cm<sup>-2</sup> de células aderidas na superfície de polipropileno, resultado próximo ao obtido no presente estudo.

A contagem de microrganismos aderidos à uma superfície é fator determinante para indicar se há formação de biofilme maduro ou somente adesão bacteriana (DALLA COSTA, 2016). De acordo com Andrade, Bridgeman e Zottola (1998), para se considerar um biofilme é necessário um número mínimo de células de 7 log UFC.cm<sup>-2</sup>. Em comparação com o resultado encontrado neste estudo não foi observada a formação de biofilme maduro, contudo ocorreu um processo de adesão bacteriana.

É importante destacar que, mesmo que o número de células aderidas à superfície esteja abaixo do número mínimo para se considerar um biofilme, existe o risco de contaminação microbiológica direta do alimento (OLIVEIRA, 2010). Além disso, a contaminação pode ocorrer de forma cruzada, como demonstrado por Soares *et al.* (2012). Esses autores manusearam pele de frango contaminada com 5 log UFC.g<sup>-1</sup> de *S. Enteritidis* em superfícies de madeira, plástico tratado com triclosan, vidro e aço inoxidável. Constatou-se que após procedimentos inadequados de higienização, ocorreu contaminação de outros alimentos manipulados nessas superfícies.

#### 5.4. Efeito sanitizante dos óleos essenciais sobre células aderidas nos cupons de aço inoxidável e polipropileno

As concentrações utilizadas para o preparo de todas as soluções sanitizantes foram as determinadas no teste CIM.

Soluções de OE de orégano e de canela provocaram o desprendimento das células de *S. Choleraesuis* aderidas aos cupons de aço inoxidável após 5 min de contato. Enquanto a solução de OE de menta foi capaz de remove-las em 2,5 min (Tabela 4).

Para a superfície de polipropileno as soluções de orégano e canela demonstraram apenas a redução de 1 ciclo logaritmo após os tempos de contato avaliados, enquanto o OE de menta foi capaz de reduzir todas as células aderidas (Tabela 5).

O fato das soluções preparadas com os OE de orégano e canela promoverem apenas a redução bacteriana na superfície de polipropileno pode ser explicado pela diferença do tipo de superfície, uma vez que superfícies constituídas por polímeros apresentam fissuras, fendas e rugosidades, que favorecem o aumento dos níveis de adesão devido a proteção das células bacterianas no interior das irregularidades destas superfícies (ARAÚJO, *et al.*, 2010).

**Tabela 4.** Número de células aderidas em superfícies de aço inoxidável, expressas em log UFC.cm-2, após tratamento com soluções sanitizantes à base de OE e solução controle em diferentes tempos de contato.

Óleo Essencial	Tempo de Contato (minutos)				
	2,5	5	10	15	20
<b>Solução Controle</b>	3,45 <sup>a</sup>	3,61 <sup>a</sup>	3,28 <sup>a</sup>	3,62 <sup>a</sup>	3,49 <sup>a</sup>
<b>Orégano</b>	2,75 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>
<b>Canela</b>	3,59 <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>
<b>Menta</b>	0,00 <sup>c</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>

Fonte: Do autor, 2018

\*Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade em relação aos tratamentos.

**Tabela 5.** Número de células aderidas em superfícies de polipropileno, expressas em log UFC.cm-2, após tratamento com soluções sanitizantes à base de OE e solução controle em diferentes tempos de contato.

Óleo Essencial	Tempo de Contato (minutos)				
	2,5	5	10	15	20
<b>Solução Controle</b>	4,20 <sup>a</sup>	4,57 <sup>a</sup>	4,83 <sup>a</sup>	4,60 <sup>a</sup>	4,30 <sup>a</sup>
<b>Orégano</b>	3,33 <sup>b</sup>	3,61 <sup>b</sup>	2,47 <sup>c</sup>	2,61 <sup>b</sup>	2,74 <sup>b</sup>
<b>Canela</b>	3,55 <sup>b</sup>	3,18 <sup>b</sup>	3,37 <sup>b</sup>	2,39 <sup>b</sup>	2,02 <sup>c</sup>
<b>Menta</b>	0,00 <sup>c</sup>	0,00 <sup>c</sup>	0,00 <sup>d</sup>	0,00 <sup>c</sup>	0,00 <sup>d</sup>

Fonte: Do autor, 2018

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade em relação aos tratamentos.

Valeriano *et al.* (2012), avaliaram a ação sanitizante de soluções formuladas com óleos essenciais de *Mentha piperita* e *Cymbopogon citratos* (capim limão) sobre células de *Salmonella Enteritidis* na superfície de aço inoxidável AISI 304. Os tempos de contato avaliados foram 10, 20 e 40 min e a partir de 20 min não foi constatada contagem de células aderidas para ambas soluções (7,80  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ). Os autores não apresentaram dados de composição química dos óleos avaliados para efeito de comparação com o presente estudo.

Sugere-se que o efeito sanitizante do OE de orégano sobre a superfície de aço inoxidável avaliado nas condições desse estudo está relacionado com o composto carvacrol. Uchida *et al.* (2013), avaliaram o efeito sanitizante do carvacrol em superfícies de aço inoxidável com biofilmes formados de *S. Saintpaul*. Após 1 hora de contato da solução de carvacrol (CIM 117  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) com a superfície, observou-se uma redução de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos na contagem de células.

Sanitizantes convencionais como os derivados do cloro demonstram efetividade contra células bacterianas (JOSEPH *et al.* 2001). Porém, algumas células podem se tornar resistentes, como demonstrado em estudo avaliado por Beraldo *et al* (2013). O Autor demonstrou que células bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Listéria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella sp.*), apresentaram menor sensibilidade frente ao hipoclorito de sódio quando comparado com soluções a base de OE (*Cinnamomum zeylanicum* e *Syzygium aromaticum*).



A toxicidade dos subprodutos dos compostos clorados torna o processo menos atrativo (SILVA *et al.*, 2011), visto que a cloração conduz a formação de compostos organoclorados, trihalometanos e ácidos haloacéticos, que são mutagênicos, tóxicos e carcinogênicos em água, alimentos ou em superfícies de contato (PRESTES, 2007).

## **6. Conclusão**

O cálculo do índice de retenção linear (IRL) aumentou a confiabilidade na identificação dos compostos dos óleos essenciais através do sistema CG-EM. A atividade antimicrobiana dos óleos variou de acordo com o tipo de óleo essencial testado. Essa variação está relacionada com a composição química de cada óleo. A resistência bacteriana ao efeito sanitizante variou de acordo com o tipo de superfície em que a bactéria está aderida. Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que a utilização de sanitizantes a base de óleos essenciais de orégano, canela e menta são uma alternativa ao uso de sanitizantes convencionais. Contudo são necessários testes toxicológicos, para a aplicação de sanitizantes a base de óleos essenciais na indústria de alimentos.

## 7. Referencias

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry, 4 edição. Carol Stream, Illinois - USA. Allured Publishing Corporation, 2012.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

ANDRADE, N. J.; BRIDGMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plat count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 833-838, 1998.

ANDREWS, H. W.; FLOWERS, R.S.; SILLIKER,J., BAILEY,J.S. Salmonela. In: ITO, F.P.D.K. **Compendium of methods for the Microbiological Examination of foods**. American Public Health Association p.357- 376

ARAÚJO, E. A.; ANDRADE, N. J.; CARVALHO, A. F.; RAMOS, A. M.; SILVA, C. A. S.; SILVA, L. H. M. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Quim. Nova**, v. 33, n. 9, p. 1940-1948, 2010.

ARAUJO, L.V.; FREIRE, D. M. G; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Quim. Nova**, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013.

BAGGE-RAVN, D.; HJELM, M.; CHRISTIANSEN, J. N.; JOHANSEN, C.; GRAM, L. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. **International journal of food microbiology**, v. 87, n. 3, p. 239-250, 2003.

BEIRÃO DA COSTA, S.; MOURA GUEDES, M. C.; FERREIRA PINTO, M. M.; EMPIS, J., MOLDÃO-MARTINS, M. Alternative Sanitizing Methods to Ensure Safety and Quality of Fresh-Cut Kiwifruit. **Journal of food processing and preservation**, v. 38, n. 1, p. 1-10, 2014.

BERALDO, C.; SILVA D. N.; SCANAVACCA, J.; TOSHIMI DOYAMA, J.; FERNANDES JÚNIOR, A.; MENGUE, F. M.C. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 4, 2013.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004**. Regulamento técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação.

BRUGNERA, D. F.; DE OLIVEIRA, M. M. M.; PICCOLI, R. H. Essential oils of cymbopogon sp. in the control of foodborne pathogenic bacteria/Oleos essenciais de Cymbopogon sp. no controle de bacterias patogenicas veiculadas por alimentos. **Alimentos e Nutricao (Brazilian Journal of Food and Nutrition)**, v. 22, n. 3, p. 339-344, 2011.

CARELI, R. T.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F.; JÚNIOR, J. I. R.; ROSADO, M. S.; BERNARDES, P. C. The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthetic polymers, and stainless steel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 171-176, jan./mar. 2009.

DALLA COSTA, K. A.; FERENZ, M.; DA SILVEIRA, S. M.; MILLENZI, A. F. Formação de biofilmes bacterianos em diferentes superfícies de indústrias de Alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 2, p. 75-82, 2016.

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107-115, 2010.

ISCAN, G.; KİRİMER, N.; KÜRKCÜOĞLU, M.; BAŞER, H. C.; DEMIRCI, F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 14, p. 3943-3946, 2002.

JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International journal of food microbiology**, v. 64, n. 3, p. 367-372, 2001.

MALHEIROS, P. S.; PASSOS, C. T.; CASARIN, L. S.; SERRAGLIO, L.; TONDO, E. C. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. **Food Control**, v. 21, p. 298–301, 2010.

NASCIMENTO, H. M; DELGADO, B.; BARBARIC, I. F. IF. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana Jun**, v. 2, n. 1, p. 11-13, 2010.

NCCLS. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição. Norma NCCLS M7-A6. 53 p. 2003.

OLIVEIRA, M. M. M. D.; BRUGNETRA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 69, n. 3, p. 277-284, 2010.

PRESTES, E. B. Avaliação da eficiência do ozônio como sanitizante em hortaliças folhosas minimamente processadas. 2007. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ROCHA, C. R.; CARELI, R. T.; SILVA, R. P.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R.; OLIVEIRA, E. M. B., e DUARTE, E. R. Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. como sanitizante natural para controle de bactérias sésseis em superfície utilizada para corte de alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 4, p. 338-344, 2014.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p 81-85, 2000.

SANTURIO, J. M.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SOARES, V. M.; PEREIRA, J. G.; VIANA, C.; IZIDORO, T. B.; DOS SANTOS BERSOT, L.; PINTO, J. P. D. A. N. Transfer of *Salmonella Enteritidis* to four types of surfaces after cleaning procedures and cross-contamination to tomatoes. **Food microbiology**, v. 30, n. 2, p. 453-456, 2012.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. D. O.; Travassos, A. E.; SOUZA, E. L. D. Inhibitory effect of the essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume leaves on some food-related bacteria. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, n. 3, p. 771-775, 2010.

UCHIDA, N. S.; GRESPAN, R.; PIOVEZAN, M.; FERREIRA, E. C.; JÚNIOR, M. M.; CUMAN, R. K.; MIKCHA, J. M. G. Effect of carvacrol on *Salmonella* Saintpaul biofilms on stainless steel surface. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 12, p. 2021-2025, 2014.

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

VALERIANO, C.; OLIVEIRA, T. L.; CARVALHO, S. M.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. **Food Control**, v. 25, p. 673-677, 2012.

VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. **Química nova**, v. 30, p. 2031-2034, 2007.