



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**BRUNO DUTRA DA SILVA**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Plectranthus amboinicus* (LOUR.) SPRENG.:  
PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS CONTRA *Escherichia coli* E *Listeria  
monocytogenes* *IN VITRO* E EM MATRIZ CÁRNEA**

ALEGRE - ES  
MAIO - 2021

BRUNO DUTRA DA SILVA

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Plectranthus amboinicus* (LOUR.) SPRENG.:  
PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS CONTRA *Escherichia coli* E *Listeria  
monocytogenes* IN VITRO E EM MATRIZ CÁRNEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Consuelo Domenici Roberto  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Campos Bernardes  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Fontes Pinheiro

ALEGRE – ES  
MAIO – 2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

S586o Silva, Bruno Dutra da, 1995-  
Óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. : Propriedades antimicrobianas contra *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* in vitro e em matriz cárnea / Bruno Dutra da Silva. - 2021.  
69 f. : il.

Orientadora: Consuelo Domenici Roberto.  
Coorientadores: Patrícia Campos Bernardes, Patrícia Fontes Pinheiro.  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Hambúrgueres. 2. Antimicrobiano. 3. Compostos bioativos. 4. *Escherichia coli*. 5. *Listeria monocytogenes*. I. Roberto, Consuelo Domenici. II. Bernardes, Patrícia Campos. III. Pinheiro, Patrícia Fontes. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 664

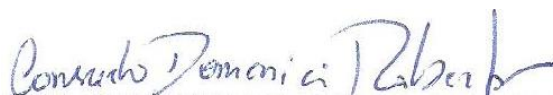
---

**BRUNO DUTRA DA SILVA**

**ÓLEO ESSENCIAL de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.:  
PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS CONTRA *Escherichia coli*  
E *Listeria monocytogenes* IN VITRO E EM MATRIZ CÁRNEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 24 de maio de 2021.



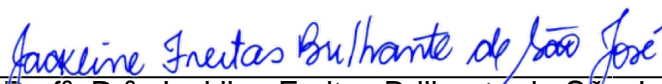
---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Consuelo Domenici Roberto  
Universidade Federal de Espírito Santo-UFES  
Orientadora



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Campos Bernardes  
Universidade Federal de Espírito Santo-UFES  
Coorientadora



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jackline Freitas Brilhante de São José  
Universidade Federal de Espírito Santo-UFES  
Examinadora

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha mãe, Maria Luiza da Silva que sempre acreditou em mim, me apoiou nas diversas decisões da minha vida, que culminaram em todas realizações atuais e que irão resultar nas realizações futuras.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Consuelo Domenici Roberto, por todo conhecimento compartilhado, disponibilidade para ajudar, incentivo e por acreditar no meu potencial e em meu trabalho.

Às minhas coorientadoras Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Campos Bernardes e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Fontes Pinheiro por toda atenção, disponibilidade e toda ajuda, seja teórica ou prática que foram fundamentais para realização deste trabalho.

Aos técnicos dos laboratórios, Raphael, Maurício e Letícia pela colaboração e disponibilidade em cada análise executada.

Aos funcionários do PCTA, em especial ao Toninho por toda atenção, paciência e disponibilidade.

À Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos e professores pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela bolsa concedida.

Aos amigos do PCTA, que compartilharam essa caminhada e tornaram a experiência mais enriquecedora. Em especial, a Caroline de Souza Motta e Keila Rodrigues Zanardi que sempre estiveram presentes em toda minha trajetória, disponibilizando ajuda voluntária no laboratório, apoio em momentos difíceis e o compartilhamento em momentos de felicidade.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

“O único homem que está isento de erros,  
é aquele que não arrisca acertar.” (Albert Einstein)

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO DE PESQUISA

- Figura 1.** Ensaios experimentais com as folhas de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng.: (I) Ensaios *in vitro* e (II) Aplicação em sistema modelo de hambúrguer bovino.....16
- Figura 2.** Efeito antimicrobiano do OEPA na viabilidade celular de: (a) *E. coli* (ATCC 11229); e (b) *L. monocytogenes* (ATCC 7644) em 24 horas de incubação a 35 °C.....31
- Figura 3.** Adesão de (a) *E. coli* ATCC 11229; e (b) *L. monocytogenes* ATCC 7644 incubados a 35 °C por 24 horas após tratamento com diferentes concentrações de OEPA .....34
- Figura 4.** Remoção de células aderidas: (a) *E. coli* (ATCC 11229); e (b) *L. monocytogenes* (ATCC 7644) incubados a 35 °C por 24 horas após tratamento com diferentes concentrações de OEPA”.....37
- Figura 5.** Atividade de água dos hambúrgueres com diferentes concentrações de OEPA e não inoculados com suspensão bacteriana, armazenados a 7 °C por 15 dias.....40
- Figura 6.** Comportamento da atividade antimicrobiana do OEPA em hambúrgueres contaminados com: (a) *E. coli* (ATCC 11229); e (b) *L. monocytogenes* (ATCC 7644) durante 15 dias de armazenamento a 7 °C.....42

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO DE PESQUISA

- Tabela 1.** Formulações de hambúrguer bovino: Controle – Hambúrguer bovino sem adição de OEPA; OEPA MIC – Hambúrguer bovino com adição de 2 mg.mL<sup>-1</sup> de OEPA; OEPA sub-MIC – Hambúrguer bovino com adição de 1 mg.mL<sup>-1</sup> de OEPA. ....24
- Tabela 2.** Composição química do óleo essencial das folhas de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng. ....27
- Tabela 3.** Concentrações mínima inibitória (MIC) e bactericida (MBC) do óleo essencial de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng. contra bactérias patogênicas.....29
- Tabela 4.** Valores de pH dos hambúrgueres com diferentes concentrações de OEPA armazenados à 7°C por 15 dias.....39



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
1.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	9
2.1. Objetivo geral.....	9
2.1. Objetivos específicos.....	9
<b>ARTIGO DE REVISÃO: Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: natural preservative and limitations of use in meat products</b> .....	10
<b>ARTIGO DE PESQUISA: Propriedades antimicrobianas do óleo essencial de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng. contra <i>Escherichia coli</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> <i>in vitro</i> e aplicação em matriz cárnea</b> .....	11
Resumo.....	12
1. Introdução.....	14
2. Material e métodos.....	16
2.1. Material vegetal.....	16
2.2. Extração do óleo essencial de <i>P. amboinicus</i> (Lour.) Spreng.....	16
2.3. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM).....	17
2.4. Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC).....	18
2.5. Ensaio antimicrobiano <i>in vitro</i> .....	18
2.5.1. Preparo das culturas de microrganismos.....	18
2.5.2. Concentração mínima inibitória (MIC).....	19
2.5.3. Concentração mínima bactericida (MBC).....	20
2.5.4. Ensaio antimicrobiano de tempo x morte.....	20
2.6. Ensaio de adesão bacteriana na presença de OEPA.....	21
2.7. Ensaio de remoção de células aderidas na presença de OEPA.....	22
2.8. Preparo dos hambúrgueres.....	23
2.9. Análise de pH e atividade de água.....	25
2.10. Ensaio antimicrobiano em hambúrguer bovino.....	25
2.11. Análise estatística.....	26

3. Resultados e discussão .....	27
3.1. Caracterização química e rendimento do óleo essencial .....	27
3.2. Concentração mínima inibitória e bactericida. ....	28
3.3. Ensaio tempo x morte .....	30
3.4. Adesão bacteriana na presença de OEPA .....	33
3.5. Remoção de células aderidas na presença de OEPA .....	35
3.6. pH e atividade de água dos hambúrgueres. ....	38
3.7. Atividade antimicrobiana do OEPA em hambúrgueres bovinos .....	41
4. Conclusão .....	45
Referências bibliográficas .....	46

## RESUMO

da SILVA, Bruno Dutra. **Óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.: Propriedades antimicrobianas contra *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes in vitro* e em matriz cárnea.** 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Consuelo Domenici Roberto. Coorientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Campos Bernardes e Prof<sup>a</sup>. Dr. Patrícia Fontes Pinheiro.

Os óleos essenciais são investigados em função da sua atividade antimicrobiana e de seu potencial de aplicação como ingrediente natural no processamento de alimentos. Pesquisas relatam sua aplicação para garantir a qualidade e segurança microbiológica em substituição aos conservantes tradicionalmente utilizados em alimentos processados. O hambúrguer geralmente é comercializado cru, sob refrigeração ou congelado, sendo este o principal método para garantir a conservação desse produto cárneo. A adição de óleos essenciais com comprovada atividade antimicrobiana representa uma alternativa para melhorar a conservação do hambúrguer. Fontes vegetais são bastante investigadas cientificamente, havendo uma ampla variedade de espécies cujo potencial antimicrobiano e a aplicação em alimentos está sendo ou ainda não foram estudadas. Neste contexto, a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (OEPA) foi investigada *in vitro*, e em hambúrgueres bovinos durante armazenamento sob refrigeração. A composição fitoquímica do OEPA foi caracterizada por cromatografia gasosa. Foram avaliadas as concentrações mínimas inibitórias (MIC) e bactericidas (MBC) do OEPA contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. Posteriormente, *E. coli* (Gram-negativa) e *L. monocytogenes* (Gram-positiva) foram utilizados para verificar a atividade antimicrobiana *in vitro*, analisando-se os parâmetros tempo *versus* morte e a atividade antiadesão do OEPA. O hambúrguer bovino foi utilizado para avaliar as concentrações sub-MIC e MIC do OEPA contra *E. coli* e *L. monocytogenes* durante armazenamento a 7 °C por 15 dias. Os constituintes majoritários encontrados no OEPA foram timol (45,64%), *p*-Cymeno (19,46%),  $\beta$ -Myrceno (12,59%) e  $\alpha$ -Terpinoleno (9,86%). O MIC para as bactérias avaliadas foi de 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> (*S. aureus*), 1 mg.mL<sup>-1</sup> (*P. aeruginosa*) e 2 mg.mL<sup>-1</sup> (*E. coli*, *Salmonella Typhimurium* e *L. monocytogenes*). Em

relação à MBC os valores obtidos para *E. coli* e *P. aeruginosa* foram iguais ao MIC, que é um indicativo de apenas ação bactericida do OEPA. Para as demais bactérias avaliadas, o MBC foi maior que o MIC, que destaca a distinção do efeito inibitório e bactericida nas diferentes concentrações. No ensaio de tempo *versus* morte para *E. coli*, o OEPA na concentração 2 mg.mL<sup>-1</sup> apresentou uma redução da carga microbiana com contagem <10 UFC.mL<sup>-1</sup> em 1 hora de incubação. Para *L. monocytogenes* tratados com 4 mg.mL<sup>-1</sup> essa redução ocorreu a partir de 4 horas. Para o ensaio antiadesão, em concentrações sub-inibitórias de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, houve redução na adesão de 30,6% para *E. coli* e 13,7% para *L. monocytogenes*. Em concentrações 8 vezes menores que MIC (0,25 mg . mL<sup>-1</sup>) também foram observados efeitos significativos. No ensaio sobre remoção de células aderidas a concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup> de OEPA removeu 48% das células de *E. coli* e 60,6% de *L. monocytogenes* em 24 horas de incubação. Nos hambúrgueres bovinos, o OEPA apresentou atividade antimicrobiana inferior àquela comparada ao resultado dos testes *in vitro*. Porém, na concentração de 2 mg.g<sup>-1</sup> houve redução significativa na contagem de *E. coli* e *L. monocytogenes* a partir do 6º dia em relação ao tratamento controle, com redução da contagem até o 12º dia de armazenamento. Após o 12º dia de armazenamento, observou-se um aumento na população de *E. coli* e *L. monocytogenes* para todas as concentrações de OEPA testadas. Ressalta-se que na concentração de 2 mg.g<sup>-1</sup> de OEPA esse aumento foi significativamente menor quando comparado às concentrações de 1 mg . g<sup>-1</sup> e às contagens de *E. coli* e *L. monocytogenes* no hambúrguer controle. Os resultados, portanto, confirmam o potencial de aplicação do OEPA como conservante natural para garantir a segurança microbiológica de hambúrgueres refrigerados.

**Palavras – chave:** Antimicrobianos naturais, Bactérias patogênicas, Atividade antiadesão, Produto cárneo, Conservação.

## ABSTRACT

da SILVA, Bruno Dutra. **Essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.: Antimicrobial properties against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* *in vitro* and in meat matrix.** 2021. Dissertation (Master's degree of Food Science and Technology) - Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES. Advisor: Prof. Dsc. Consuelo Domenici Roberto. Co-advisors: Prof. Dsc. Patrícia Campos Bernardes e Prof. Dsc. Patrícia Fontes Pinheiro.

Essential oils have been investigated for their antimicrobial activity and their potential application as a natural ingredient in food processing. Research reports its application to ensure microbiological quality and safety in replacement of preservatives traditionally used in processed foods. The hamburger is usually sold raw, refrigerated, or frozen, which is the main method to ensure the conservation of this meat product. The addition of essential oils with proven antimicrobial activity represents an alternative to improve the conservation of the hamburger. Plant sources are scientifically investigated, with a wide variety of species whose antimicrobial potential and application in food are being or have not yet been studied. In this context, the antimicrobial activity of essential oil from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (PAEO) was investigated *in vitro*, and beef hamburgers during refrigerated storage. The phytochemical composition of PAEO was characterized by gas chromatography. Minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations of PAEO against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium, and *Staphylococcus aureus* were evaluated. Later, *E. coli* (Gram-negative) and *L. monocytogenes* (Gram-positive) were used to verify the antimicrobial activity *in vitro*, analyzing the parameters time versus death and the antiadhesion activity of PAEO. The beef hamburger was used to evaluate the sub-MIC and MIC concentrations of PAEO against *E. coli* and *L. monocytogenes* during storage at 7 °C for 15 days. The major constituents found in the PAEO were thymol (45.64%), p-Cymene (19.46%),  $\beta$ -Myrcene (12.59%), and  $\alpha$ -Terpinolene (9.86%). The MIC for the bacteria evaluated was 0.25 mg.mL<sup>-1</sup> (*S. aureus*), 1 mg.mL<sup>-1</sup> (*P. aeruginosa*), and 2 mg.mL<sup>-1</sup> (*E. coli*, *Salmonella* Typhimurium and *L. monocytogenes*). Regarding MBC, the values obtained for *E. coli* and *P. aeruginosa* were equal to the MIC, which is

indicative of only the bactericidal action of PAEO. For the other bacteria evaluated, the MBC was higher than the MIC, which highlights the distinction of the inhibitory and bactericidal effect at different concentrations. In the time versus death assay for *E. coli*, PAEO at a concentration of 2 mg.mL<sup>-1</sup> showed a reduction in the microbial load with a count <10 CFU.mL<sup>-1</sup> in 1 hour of incubation. For *L. monocytogenes* treated with 4 mg.mL<sup>-1</sup>, this reduction occurred after 4 hours. For the antiadhesion assay, at sub-inhibitory concentrations of 1 mg.mL<sup>-1</sup>, there was a reduction in the adhesion of 30.6% for *E. coli* and 13.7% for *L. monocytogenes*. At concentrations 8 times lower than MIC (0.25 mg . mL<sup>-1</sup>) significant effects were also observed. In the assay on the removal of adhered cells, the concentration of 2 mg.mL<sup>-1</sup> of PAEO removed 48% of *E. coli* cells and 60.6% of *L. monocytogenes* within 24 hours of incubation. In bovine hamburgers, PAEO showed antimicrobial activity lower than that compared to the results of in vitro tests. However, at the concentration of 2 mg.g<sup>-1</sup> there was a significant reduction in the count of *E. coli* and *L. monocytogenes* from the 6th day on compared to the control treatment, with a reduction in the count up to the 12th day of storage. After the 12th day of storage, an increase in the population of *E. coli* and *L. monocytogenes* was observed for all concentrations of PAEO tested. It is noteworthy that at the concentration of 2 mg.g<sup>-1</sup> of PAEO this increase was significantly smaller when compared to concentrations of 1 mg. g<sup>-1</sup> and *E. coli* and *L. monocytogenes* counts in the burger without the addition of PAEO. The results, therefore, confirm the potential application of PAEO as a natural preservative to ensure the microbiological safety of refrigerated hamburgers.

**Keywords:** Natural antimicrobials, Pathogenic bacteria, Anti-adhesion activity, Meat product, Conservation, Hamburger.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Diversos gêneros de bactérias deteriorantes são frequentemente encontrados em carnes e produtos cárneos, incluindo *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, bactérias do ácido lático e diferentes gêneros da família *Enterobacteriaceae*. Como consequência da multiplicação de microrganismos, há produção de compostos voláteis indesejáveis, alterações de cor e formação de limo superficial, que acarretam perdas econômicas (AJAYKUMAR; MANDAL, 2020; CASABURI et al., 2015; DOULGERAKI et al., 2012) entre outros efeitos negativos. Grupos de bactérias patogênicas tais como *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, e *Escherichia coli* também são comumente encontradas em carnes e derivados cárneos. (DOULGERAKI et al., 2012; HEREDIA; GARCÍA, 2018), responsáveis por doenças de origem alimentar, que representam um grande problema para a saúde pública.

Dados publicados pela Organização Mundial da Saúde apontam uma estimativa anual de cerca de 600 milhões de casos mundialmente de doenças de origem alimentar (WHO, 2020). Apesar da aplicação de medidas preventivas para garantir a qualidade e a segurança dos alimentos serem enfatizadas e contribuir efetivamente com a redução ou eliminação de microrganismos patogênicos em diversas etapas da cadeia produtiva (GONZALES-BARRON et al., 2019), o controle do desenvolvimento microbiano em carnes e produtos cárneos, principalmente, é geralmente reforçado através da adição de conservantes químicos tradicionais. Porém, sua utilização no processamento de produtos cárneos tem sido questionada devido à possível toxicidade relatada em diversas pesquisas (ADEWALE et al., 2019; CVETKOVIĆ et al., 2019; EL-NABARAWY et al., 2020; ELSHERBINY et al., 2017; GE et al., 2019). Outro fato relevante é a percepção negativa dos consumidores em relação à saúde, que tem gerado uma demanda por alimentos com apelo natural. Nesse sentido, um dos desafios da indústria para garantir a segurança microbiológica de seus produtos é a busca por alternativas de ingredientes como os antimicrobianos naturais (BHAVANIRAMYA et al., 2019; CALO et al., 2015).

O estudo da aplicação de óleos essenciais, principalmente nas últimas décadas, tem se intensificado com o objetivo de encontrar substitutos aos conservantes químicos tradicionalmente utilizados pela indústria. Além da atividade

biológica na natureza, as propriedades dos óleos essenciais têm sido estudadas visando aplicações em diversos segmentos da indústria, que incluem atividade antioxidante (KANG; SONG, 2019; MOHANKUMAR et al., 2019), inseticida (BACCARI et al., 2020; BENELLI et al., 2019), anticancerígena (HAN; PARKER, 2017; SALEHI et al., 2020), antiviral (BOUAZZI et al., 2018) e antimicrobiana (CALO et al., 2015).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra bactérias deteriorantes e patogênicas *in vitro* e em carnes e produtos cárneos são abordadas na literatura científica e apontadas como alternativa natural para garantir a segurança microbiológica dos produtos (BHAVANIRAMYA et al., 2019; CALO et al., 2015; RADÜNZ et al., 2019; ŠOJIĆ et al., 2019; ZHAO et al., 2019).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas, como terpenos, fenilpropanóides, aldeídos, ésteres, álcoois e cetonas são os responsáveis pelas propriedades bioativas dos óleos essenciais de cada espécie vegetal (BHAVANIRAMYA et al., 2019; TOHIDI; RAHIMMALEK; TRINDADE, 2019). Um dos mecanismos de ação antimicrobiana relatado é a interação do óleo essencial com a membrana plasmática das bactérias. Essa interação pode causar diversas alterações nas funções celulares, como transporte de elétrons, absorção de nutrientes, síntese proteica e de ácidos nucleicos, coagulação do conteúdo celular e inibição de enzimas essenciais para o metabolismo energético da célula (BARBOSA et al., 2020; BURT, 2004; ILIĆ et al., 2019).

*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. é uma planta perene pertencente à família Lamiaceae conhecida como hortelã-grosso ou malvarisco e cultivada em diversas regiões quentes da África, Ásia e América do Sul (ARUMUGAM; SWAMY, SINNI AH, 2016). Das folhas de *P. amboinicus* se extrai o óleo essencial (OEPA) que possui propriedades terapêuticas atribuídas a sua composição fitoquímica, valorizadas pela indústria farmacêutica. São utilizadas na medicina popular por seus efeitos antissépticos, tratamento de resfriados, náuseas, indigestão, febre e dores de garganta (ARUMUGAM; SWAMY; SINNI AH, 2016; SINGH; SHUSHNI; BELKHEIR, 2015). Evidências científicas relatam a ocorrência de até 76 constituintes voláteis e 30 não voláteis pertencentes a diferentes classes de fitoquímicos, como monoterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, sesquiterpenóides, fenólicos, flavonóides, ésteres, álcoois e aldeídos no OEPA (ARUMUGAM; SWAMY; SINNI AH, 2016).



A atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. foi documentada contra diversos microrganismos de importância para indústria de alimentos, e pesquisas com aplicações em alimentos para garantir a segurança microbiológica foram relatadas por Erny et al., (2014); Murthy; Ramalakshmi; Srinivas, (2009); Santos et al., (2016); e Vasconcelos et al., (2017). Esses estudos indicam que o óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. pode ser uma alternativa natural para conservantes químicos tradicionalmente utilizados em produtos cárneos.

## 1.1. Referências Bibliográficas

ADEWALE, O. O. et al. Curcumin protects sodium nitrite-induced hepatotoxicity in Wistar rats. **Toxicology Reports**, v. 6, p. 1006–1011, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.09.003>

AJAYKUMAR, V. J.; MANDAL, P. K. Chapter 18 - Modern concept and detection of spoilage in meat and meat products. In: BISWAS, A. K.; MANDAL, P. K. **Meat Quality Analysis (Org.)**. . [S.l.]: Academic Press, 2020. p. 335–349.

DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819233-7.00018-5>

ARUMUGAM, G.; SWAMY, M.; SINNIHAH, U. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance.

**Molecules**, v. 21, n. 4, p. 369, 2016.

DOI: [10.3390/molecules21040369](https://doi.org/10.3390/molecules21040369)

BACCARI, W. et al. Composition and insecticide potential against *Tribolium castaneum* of the fractionated essential oil from the flowers of the Tunisian endemic plant *Ferula tunetana* Pomel ex Batt. **Industrial Crops and Products**, v. 143, p. 111888, 2020.

DOI: [10.1016/j.indcrop.2019.111888](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111888)

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

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

BARBOSA, L. N. et al. Proteomic analysis and antibacterial resistance mechanisms of *Salmonella* Enteritidis submitted to the inhibitory effect of *Origanum vulgare* essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Proteomics**, v. 214, p. 103625, 2020.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103625>

BENELLI, G. et al. Insecticidal activity of the essential oil and polar extracts from *Ocimum gratissimum* grown in Ivory Coast: Efficacy on insect pests and vectors and

impact on non-target species. **Industrial Crops and Products**, v. 132, p. 377–385, 2019.

DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.02.047

BHAVANIRAMYA, S. et al. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 49–55, 2019.

DOI: 10.1016/j.gaost.2019.03.001

BOUAZZI, S. et al. Cytotoxic and antiviral activities of the essential oils from *Tunisian Fern, Osmunda regalis*. **South African Journal of Botany**, v. 118, p. 52–57, 2018.

DOI: 10.1016/j.sajb.2018.06.015

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

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

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

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>

CASABURI, A. et al. Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. **Food Microbiology**, v. 45, n. PA, p. 83–102, 2015.

DOI: 10.1016/j.fm.2014.02.002

CVETKOVIĆ, D. et al. Sodium nitrite food poisoning in one family. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, v. 15, n. 1, p. 102–105, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s12024-018-0036-1>

DOULGERAKI, A. I. et al. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 130–141, 2012.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020>

EL-NABARAWY, N. A. et al. Effects of nitrite graded doses on hepatotoxicity and nephrotoxicity, histopathological alterations, and activation of apoptosis in adult rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 12, p. 14019–14032, 2020.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07901-6>

ELSHERBINY, N. M. et al. Renal protective effects of thymoquinone against sodium nitrite-induced chronic toxicity in rats: Impact on inflammation and apoptosis. **Life Sciences**, v. 180, p. 1 - 8, 2017.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.05.005>

GE, L. et al. Sodium nitrite negatively affects reproductive ability and offspring survival in female mice. **Toxicology**, v. 427, p. 152284, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.152284>

GONZALES-BARRON, U. et al. Strategy for systematic review of observational studies and meta-analysis modelling of risk factors for sporadic foodborne diseases. **Microbial Risk Analysis**, p. 100082, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mran.2019.07.003>

HAN, X.; PARKER, T. L. Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil in a human skin disease model. **Biochimie Open**, v. 4, p. 73–77, 2017. DOI: 10.1016/j.biopen.2017.02.005

HEREDIA, N.; GARCÍA, S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 250 - 255, 2018.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.006>

ILIC, D. P. et al. Improvement of the yield and antimicrobial activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) essential oil by fruit milling. **Industrial Crops and**

**Products**, v. 142, p. 111854, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111854>

KANG, J. H.; SONG, K. B. Characterization of Job's tears (*Coix lachryma-jobi* L.) starch films incorporated with clove bud essential oil and their antioxidant effects on pork belly during storage. **LWT**, v. 111, p. 711 - 718, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.102>

MOHANKUMAR, A. et al. Antioxidant and stress modulatory efficacy of essential oil extracted from plantation-grown *Santalum album* L. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111623, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111623>

RADÜNZ, Marjana et al. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. **Food Chemistry**, v. 276, p. 180–186, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.173>

SALEHI, F. et al. Incorporation of *Zataria multiflora* essential oil into chitosan biopolymer nanoparticles: A nanoemulsion based delivery system to improve the in-vitro efficacy, stability and anticancer activity of ZEO against breast cancer cells.

**International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 382 - 392, 2020.

DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2019.12.058](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.058)

ŠOJIC, B et al. Coriander essential oil as natural food additive improves quality and safety of cooked pork sausages with different nitrite levels. **Meat Science**, v. 157, p. 107879, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107879>

TOHIDI, B.; RAHIMMALEK, M.; TRINDADE, H. Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of *Thymus* species in Iran.

**Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 89 - 99, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.038>

WHO. World Health Organization. **Estimating the burden of foodborne diseases**. 2015. Disponível em: < <https://www.who.int/activities/estimating-the-burden-of-foodborne-diseases>>. Acesso em: 01/04/2020.

ZHAO, Y. et al. Antimicrobial activity of bioactive starch packaging films against *Listeria monocytogenes* and reconstituted meat microbiota on ham. **International Journal of Food Microbiology**, v. 305, p. 108253, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108253>

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (OEPA) *in vitro* e em hambúrgueres bovinos mantidos sob armazenamento refrigerado.

### 2.2. Objetivos específicos

- Extrair e caracterizar quimicamente o óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.
- Determinar a concentração mínima inibitória (MIC) e bactericida (MBC) do OEPA contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Thyphimurium, e *Staphylococcus aureus*.
- Avaliar o desenvolvimento microbiano *in vitro* em função do tempo sob ação do OEPA nas concentrações MIC e MBC.
- Avaliar a atividade antiadesão do óleo essencial de OEPA contra *E. coli* e *L. monocytogenes*.
- Avaliar a ação antimicrobiana do OEPA em hambúrgueres bovinos contaminados com células viáveis de *E. coli* e *L. monocytogenes* durante armazenamento por 15 dias a 7 °C.

## ARTIGO DE REVISÃO

### **Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: natural preservative and limitations of use in meat products<sup>1</sup>**

Bruno Dutra da Silva<sup>a</sup>, Patrícia Campos Bernardes<sup>a</sup>, Patrícia Fontes Pinheiro<sup>b</sup>, Elisabete Fantuzzi<sup>c</sup>, Consuelo Domenici Roberto<sup>a\*</sup>.

a - Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brazil.

b - Departamento de Química e Física, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brazil.

c - Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brazil.

\*Corresponding author:

Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias,  
Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brazil.

domeniciconsuelo@gmail.com

<sup>1</sup>**Nota:** De acordo com as diretrizes do periódico *Meat Science*, os autores têm o direito de tornar o manuscrito aceito público no repositório da instituição de ensino após um período de embargo de 12 meses. O artigo de revisão está disponível na *Meat Science* através do DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108463>

Article published in *Meat Science* Journal (Publishing version): Received 3 November 2020; Accepted 9 February 2021; Available online 11 February 2021. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108463>



## ARTIGO DE PESQUISA

### **Propriedades antimicrobianas do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. contra *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes in vitro* e aplicado em hambúrguer bovino**

Bruno Dutra da Silva<sup>a</sup>, Patrícia Campos Bernardes<sup>a</sup>, Patrícia Fontes Pinheiro<sup>b</sup>, Juliana Di Giorgio Giannotti<sup>c</sup> Consuelo Domenici Roberto<sup>a\*</sup>

a - Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

b - Departamento de Química e Física, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

c - Departamento de Engenharia Rural, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

\*Autor correspondente:

Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias,  
Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

domeniciconsuelo@gmail.com

Este artigo será submetido a revista *Meat Science*. A formatação do texto foi feita segundo recomendações do guia de autores da própria revista.

## Resumo

A concentração mínima inibitória (MIC) e bactericida (MBC) do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (OEPA) contra bactérias patogênicas e sua atividade antiadesão foram avaliadas. O hambúrguer bovino foi utilizado para avaliar as concentrações sub-MIC e MIC contra *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* durante armazenamento por 15 dias a 7 °C. Os componentes do OEPA foram identificados por CG-EM e quantificados por CG-DIC. Os constituintes majoritários encontrados no OEPA foram timol (45,64%), *p*-Cymeno (19,46%),  $\beta$ -Myrceno (12,59%) e  $\alpha$ -Terpinoleno (9,86%). O MIC para as bactérias avaliadas variou de 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> (*Staphylococcus aureus*), 1 mg.mL<sup>-1</sup> (*Pseudomonas aeruginosa*) e 2 mg.mL<sup>-1</sup> (*E. coli*, *Salmonella* Typhimurium e *L. monocytogenes*). Na concentração de 4 mg.mL<sup>-1</sup> (2x-MIC) de OEPA houve redução da carga microbiana (<10 UFC.mL<sup>-1</sup>) após 1 hora para *E. coli* e 4 horas de incubação para *L. monocytogenes*. O OEPA apresentou atividade antiadesão significativa em concentrações inibitórias (2 mg.mL<sup>-1</sup>) e sub-inibitórias (1, 0,5 e 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>) para *E. coli* e *L. monocytogenes*. Nos hambúrgueres bovinos, o OEPA apresentou atividade antimicrobiana inferior àquela comparada ao resultado dos testes *in vitro*. Para hambúrgueres com concentração de 2 mg.g<sup>-1</sup> de OEPA houve redução significativa na contagem de *E. coli* do 3° ao 15° dia de armazenamento comparado ao hambúrguer controle, com diferença máxima de 0,93 log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup> entre as contagens observadas no 9° dia. A presença de 2 mg.g<sup>-1</sup> de OEPA resultou na redução significativa da contagem de *L. monocytogenes* a partir do 6° dia de armazenamento quando comparado ao hambúrguer controle, com diferença máxima de 1,52 log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup> na contagem microbiana no 12° dia. Após o 12° dia de armazenamento, hambúrgueres com 2 mg.g<sup>-1</sup> de OEPA apresentaram crescimento de *E. coli* e *L. monocytogenes* significativamente menor que nos hambúrgueres tratados com 1 mg.g<sup>-1</sup> e o controle. Por ser um produto geralmente comercializado cru sob refrigeração ou congelamento sem adição de conservantes, o efeito do OEPA no hambúrguer bovino, em especial na concentração de 2 mg.g<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>, pode representar uma alternativa natural para conservação do produto juntamente com o armazenamento refrigerado.

**Palavras-chave:** Óleo essencial; Conservante natural; Atividade antiadesão; Concentração mínima inibitória; Produto cárneo; Conservação.

## 1. Introdução

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos de baixo peso molecular sintetizados pelas plantas. Podem ser extraídos de flores, folhas, caules, brotos, sementes, frutas e glândulas dos vegetais (Burt, 2004). As folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., conhecidas como hortelã-grosso ou malvarisco, são utilizadas na medicina popular por seus efeitos terapêuticos, analgésico, tratamento de resfriados, tosse, febre e dores de cabeça (Arumugam, Swamy, & Sinniah, 2016). Além da aplicação medicinal da planta, o óleo essencial das folhas de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng. tem sido avaliado em pesquisas sobre a atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias patogênicas, como *Streptococcus mutans* (F. A. V. Santos et al., 2016), *Klebsiella pneumoniae* (Gonçalves et al., 2012), *Staphylococcus aureus* (Vasconcelos et al., 2017), *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens* (Erny, Razali, Mirfat, & Mohd, 2014), e atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Candida versatilis* e *Fusarium* sp. (Murthy, Ramalakshmi, & Srinivas, 2009).

A necessidade de aumentar a conservação dos alimentos, aliada à crescente preocupação dos consumidores com os possíveis efeitos adversos a saúde pelo uso de conservantes químicos tradicionais, gera uma demanda por alimentos com apelo natural e com garantia de segurança microbiológica (Calo et al., 2015). Pesquisas em matrizes alimentares cárneas como carne suína (Bukvički et al., 2014), salsicha toscana (Silveira et al., 2014), hambúrguer bovino (Ghaderi-Ghahfarokhi et al., 2017), linguiça suína (Šojić et al., 2019), presunto (Zhao, Teixeira, Saldaña, & Gänzle, 2019) e produto cárneo semelhante ao hambúrguer (Radünz et al., 2019) evidenciam a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e de seus constituintes.

*Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. A maioria das estirpes de *E. coli* são comensais no intestino humano, porém, existem 6 sorotipos de *E. coli* que possuem fatores de

virulência (Heredia & García, 2018; Lianou et al., 2017). O reservatório primário da bactéria compreende o trato gastrointestinal de animais e humanos, e a via de contaminação de alimentos pode ocorrer através da água, alimentos mal cozidos ou pela contaminação cruzada entre equipamentos, superfícies e manipuladores (Elias, Noronha, & Tondo, 2019).

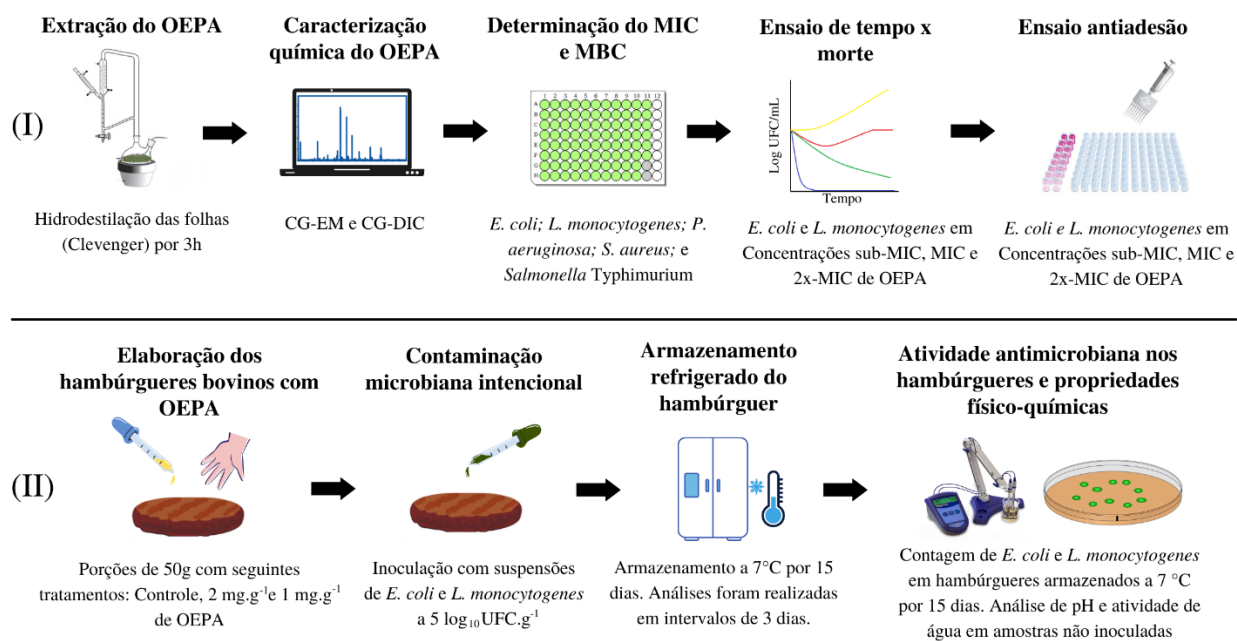
*Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos, amplamente distribuída no ambiente, causadora da listeriose (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). A bactéria *L. monocytogenes* é ubíqua, com capacidade de se desenvolver em diversos ambientes, mesmo em condições adversas (Chen, Regan, Laksanalamai, Healey, & Hu, 2017; Lianou & Sofos, 2007). A ampla faixa de temperatura de desenvolvimento de *L. monocytogenes* contribui para ocorrência do patógeno em diversos tipos de alimentos, mesmo durante o armazenamento refrigerado (Buchanan, Gorris, Hayman, Jackson, & Whiting, 2017; CDC, 2013; Radoshevich & Cossart, 2018).

Considerado um produto cárneo com grande aceitação, cujo consumo é comum na alimentação em função do preparo rápido e fácil, o hambúrguer, em geral, é armazenado refrigerado ou sob congelamento, que correspondem aos principais mecanismos de barreira para garantir sua conservação. Durante o processamento, as etapas de moagem e mistura resultam na perda de integridade das membranas celulares, que em conjunto com a composição química da carne contribuem para o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos e comprometem a qualidade sensorial e segurança microbiológica do produto, entre outras alterações (Dannenberg, Funck, Mattei, da Silva, & Fiorentini, 2016; Doulgeraki et al., 2012; Møller et al., 2016).

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi investigar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng. (OEPA) *in vitro* e em hambúrguer bovino durante o armazenamento refrigerado.

## 2. Material e métodos

Os ensaios experimentais que avaliaram as propriedades antimicrobianas do OEPA *in vitro* contra *E. coli* e *L. monocytogenes* e sua aplicação em hambúrguer bovino durante o armazenamento refrigerado são apresentados na Figura 1.



**Figura 1:** Ensaios experimentais com as folhas de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng.: (I) Ensaios *in vitro* e (II) Ensaios antimicrobianos em hambúrgueres bovinos.

### 2.1. Material vegetal

As folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. foram coletadas no município de Apiacá, Espírito Santo, Brasil (21°08'49.5"S 41°37'04.3"W) no período de dezembro a março de 2019. Uma exsiccata foi depositada (n° 21590) no herbário da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

### 2.2. Extração do óleo essencial de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng.

O material foliar foi pesado e seco em estufa de secagem (Polidryer, Brasil) a 50 °C até peso constante por aproximadamente 72 horas. O óleo essencial foi extraído a partir de 200 g de folhas secas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. por hidrodestilação, utilizando um

aparelho do tipo Clevenger. O material seco foi colocado em um balão de destilação de 3 litros e a água destilada adicionada até metade do volume do balão e a hidrodestilação mantida por 3 horas após início da ebulição da água. O óleo essencial foi seco com sulfato de sódio anidro em béquer e armazenado em frascos de vidro âmbar a 2 °C. O rendimento da extração foi calculado de acordo com a equação 1 (Zhang et al., 2015):

$$\text{Rendimento do óleo (\%)} = \frac{\text{Óleo essencial obtido (g)}}{\text{Massa seca das folhas (g)}} * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

### 2.3. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM)

A composição do OEPA foi determinada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) QP-PLUS-2010 (Shimadzu®, Japão). A coluna capilar de sílica fundida usada foi a RTx-5MS (30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno) e o hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 220 °C e do detector de 300 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C, sendo programada para ter acréscimos de 3 °C a cada minuto até se atingir a temperatura máxima de 240 °C. Para determinar os constituintes químicos do OEPA, os espectros de massas obtidos foram comparados com os dados disponíveis na biblioteca do cromatógrafo (Wiley7) e com dados de outros trabalhos científicos como o de Adams (2007).

Para realizar o cálculo dos índices de retenção linear (IRL) foi injetado no cromatógrafo uma mistura de alcanos lineares C<sub>8</sub> – C<sub>40</sub> (Sigma Aldrich®) nas mesmas condições usadas na análise do referido óleo essencial. Os índices de retenção linear (IRL) foram calculados usando a equação 2 (Pinheiro et al., 2015).

$$\text{IRL} = 100 * \frac{t'_{RX} - t'_{RZ}}{t'_{RZ+1} - t'_{RZ}} + n \quad (\text{Equação 2})$$

Em que: X, é o composto analisado; Z, é o número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção de X; t'<sub>RX</sub>, é o tempo de

retenção ajustado de X;  $t'_{RZ}$ , é o tempo de retenção ajustado de Z;  $t'_{RZ} + 1$ , é o tempo de retenção ajustado do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior ao tempo de retenção de X.

Os valores dos IRLs foram calculados para os compostos voláteis do OEPA e comparados com dados da literatura científica em trabalhos em que foram usadas colunas de polaridade similares à RTx5MS como os de Arumugam et al., (2016); Vasconcelos et al., (2017); e Velasco, Rojas, Díaz, & Usubillaga, (2009).

#### **2.4. Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC)**

Para determinar as porcentagens em área (%) dos compostos identificados na CG-EM, foi utilizado cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização de chama (CG-DIC) CG-2010 Plus (Shimadzu®, Japão). A coluna capilar Rtx-5MS (30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno) foi usada como fase estacionária e o nitrogênio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 240 °C e do detector foi de 250 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C, sendo programada para ter acréscimos de 3 °C a cada minuto até se atingir a temperatura máxima de 240 °C. Uma amostra de 10 mg do óleo essencial foi diluída em 1 mL de etanol grau HPLC, sendo injetado 1 µL da mistura (Pinheiro et al., 2013).

#### **2.5. Ensaio antimicrobiano *in vitro***

##### **2.5.1. Preparo das culturas de microrganismos**

As concentrações mínimas inibitórias (MIC) e bactericidas (MBC) do OEPA foram avaliadas para cinco bactérias patogênicas, incluindo *E. coli* (ATCC 11229), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). A cultura estoque dos microrganismos foi fornecida pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos (CCAUE/UFES). As cepas foram



ativadas duas vezes em caldo BHI (Brain Heart Infusion) (ACUMEDIA, Michigan, USA) com incubação por 24 horas a 35 °C, seguidas pela técnica de esgotamento em ágar PCA (Plate Count Agar, OXOID, Hampshire, England) com incubação a 35 °C por 24 horas para obtenção de colônias isoladas. A ativação e o isolamento das bactérias foram realizados segundo método descrito por Silva et al. (2010).

Para padronização dos inóculos, as colônias de bactérias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5,0 mL de solução salina esterilizada 0,85% (m/v). A turbidez foi comparada com uma solução padrão de sulfato de bário equivalente a escala 0,5 de MacFarland, que corresponde a uma concentração bacteriana aproximada de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Diluições decimais foram realizadas a partir da suspensão ajustada de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> para obter suspensões de diferentes concentrações de acordo com a necessidade das análises *in vitro* e *in situ* (CLSI, 2006).

### **2.5.2. Concentração mínima inibitória (MIC)**

A concentração mínima inibitória foi determinada em ensaio de diluição em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em U (OLEN, China) com base no método descrito por Wiegand, Hilpert & Hancock (2008). A partir de uma solução estoque de OEPA com concentração de 80 mg.mL<sup>-1</sup> foi preparada uma série de diluições em tubos de ensaio com caldo BHI esterilizado e 0,5% de Tween 80 (v/v) (Audaz, São Paulo, Brasil) para obter concentrações finais de 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> de OEPA na microplaca. Posteriormente, em cada poço foram adicionados 100 µL de cada suspensão bacteriana ajustada em  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e 100 µL de OEPA, correspondendo a uma concentração bacteriana final de aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> nos poços da microplaca. Poços contendo apenas caldo BHI + Tween 80 e caldo BHI com inóculo bacteriano foram utilizados como controle de esterilidade e controle de crescimento, respectivamente. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. A

concentração mínima inibitória foi considerada a menor concentração de óleo essencial que impediu o crescimento bacteriano visível nos poços da microplaca (CLSI, 2006).

### **2.5.3. Concentração mínima bactericida (MBC)**

Após determinação do MIC, uma alíquota de 100 µL foi retirada dos poços sem crescimento microbiano visível e inoculada em placa de Petri contendo ágar BHI (Brain Heart Infusion, HIMEDIA, Índia). As placas de Petri foram incubadas a 35 °C por 24 horas. A concentração mínima bactericida foi registrada como a menor concentração do óleo essencial sem crescimento microbiano visível no ágar BHI (Bassanetti et al., 2017).

### **2.5.4. Ensaio antimicrobiano de tempo x morte**

Com base em dados científicos disponíveis na literatura sobre a ocorrência de patógenos em produtos cárneos (Dhifi, Jazi, El Beyrouthy, Sadaka, & Mnif, 2020; Hulankova, Borilova, & Steinhäuserova, 2013; Osaili et al., 2021) e em dados do presente estudo, *E. coli* e *L. monocytogenes* foram as bactérias selecionadas para a avaliação antimicrobiana utilizando hambúrgueres bovinos por ser um produto cárneo, geralmente, comercializado cru sob refrigeração ou congelamento sem adição de conservante.

Para investigar a ação antimicrobiana do OEPA, foi realizado um ensaio *in vitro* de eliminação das bactérias ao longo do tempo de acordo com método descrito por Dumlupinar et al. (2020). A suspensão foi ajustada para uma concentração aproximada de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> através de diluições decimais em série a partir de um inóculo padronizado de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, equivalente a escala 0,5 MacFarland. As concentrações de OEPA selecionadas para o experimento foram MIC, 2x MIC e ½ MIC, preparadas em caldo BHI com 0,5% de Tween 80 (v/v) com base em testes preliminares. Em seguida, 1,8 mL da mistura de caldo BHI com OEPA e 200 µL de inóculo bacteriano ajustado em  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> foram adicionados em microtubos tipo Eppendorf e incubados a 35 °C por 24 horas. Como controle positivo para o

desenvolvimento bacteriano utilizou-se um tubo eppendorf de caldo BHI com 0,5% de Tween 80 (v/v) sem adição de OEPA. Nos tempos zero (logo após inoculação), 1h, 2h, 4h, 8h e 24h de incubação, foram realizadas diluições decimais seriadas em solução salina esterilizada 0,85% (v/v) e alíquotas de 100 uL foram plaqueadas em ágar BHI sendo conduzido o plaqueamento pela técnica *Spread plate*. Para *E. coli*, foi também monitorado o tempo de 15 min após inoculação, devido ao rápido efeito antimicrobiano observado em algumas concentrações nos ensaios preliminares do presente estudo. Para as concentrações maiores ou iguais ao MIC também ocorreram plaqueamentos diretos em ágar BHI a partir de alíquotas de 100 µL. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e as unidades formadoras de colônia foram enumeradas com os resultados expressos em  $\log_{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

## **2.6. Ensaio de adesão bacteriana na presença de OEPA**

A atividade antiadesão do OEPA foi avaliada contra cepas de *E. coli* (ATCC 11229) e *L. monocytogenes* (ATCC 7644) com base no ensaio de coloração com cristal violeta em microplacas de 96 poços descrito por Pejčić et al. (2020) com modificações. A partir de uma suspensão bacteriana padronizada de 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> em solução salina 0,85% (m/v), diluições decimais seriadas foram obtidas para se atingir uma concentração bacteriana final de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> nos poços da microplaca. Alíquotas de 100 µL das suspensões bacterianas foram inoculadas individualmente nos poços da microplaca que continham 100 µL de OEPA diluído em caldo BHI + 0,5% de Tween 80 (v/v) para atingir concentrações sub-MIC (1, 0,5 e 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>). As placas inoculadas foram posteriormente incubadas a 35 °C por 24 horas para adesão microbiana. Poços contendo caldo BHI + 0,5% de Tween 80 (v/v) com suspensão bacteriana foram utilizados como controle de crescimento, e poços apenas com caldo BHI + 0,5% de Tween 80 (v/v) foram utilizados como controle de esterilidade.

Após período de incubação, o conteúdo dos poços da microplaca foi removido e os poços lavados duas vezes com solução salina esterilizada 0,85% (m/v) para remoção de células planctônicas. Posteriormente, as placas foram secas em estufa de secagem (MA033, Marconi) a 60 °C por 45 minutos. Os poços foram corados com 200 µL de solução de cristal violeta a 0,5% (m/v) e mantidos em repouso por 20 minutos. Após etapa de coloração, os poços foram lavados com água destilada esterilizada e descoloridos com 250 µL de álcool etílico 96% (v/v) por 45 minutos. O conteúdo dos poços foi transferido para uma nova microplaca e a absorbância (ABS) das soluções medida a 595 nm em espectrofotômetro de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finlândia). A absorbância de poços contendo apenas álcool etílico (Branco) foi medida e os valores foram subtraídos de cada absorbância dos respectivos tratamentos. Os valores obtidos foram transformados em porcentagem de adesão microbiana (Equação 3), considerando 100% a adesão bacteriana não tratada com OEPA (Pejčić et al., 2020).

$$\text{Adesão microbiana(\%)} = \frac{\text{ABS Tratamento}}{\text{ABS Controle de crescimento}} * 100 \text{ (Equação 3)}$$

## **2.7. Ensaio de remoção de células aderidas na presença de OEPA**

O experimento foi realizado conforme descrito por Pejčić et al. (2020) com modificações. A partir de um inóculo padronizado de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> equivalente a escala 0,5 MacFarland, a adesão microbiana ocorreu pela adição de 100 µL de uma suspensão bacteriana ajustada para se atingir aproximadamente  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> nos poços de uma microplaca de 96 poços contendo 100 µL de caldo BHI. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e após período de incubação o conteúdo dos poços da microplaca foi removido e lavado com solução salina 0,85% (m/v). Foram adicionados 200 µL de caldo BHI fresco em todos os poços. As microplacas foram incubadas por mais 24 horas. Após o período de adesão microbiana, 200 µL das concentrações de OEPA 2x-MIC (4 mg.mL<sup>-1</sup>), MIC (2 mg.mL<sup>-1</sup>) e sub-MIC (1, 0,5 e

0,25 mg.mL<sup>-1</sup>) dissolvidos em caldo BHI + 0,5% de Tween 80 (v/v) foram adicionados aos poços da microplaca.

Poços contendo apenas caldo BHI + 0,5% de Tween 80 (v/v) foram usados como controle de crescimento. A placa foi novamente incubada a 35 °C por 24 horas. O ensaio de coloração com cristal violeta foi realizado após o período de incubação, conforme descrito no item 2.6. A porcentagem de remoção de células aderidas foi determinada de acordo com Equação 4 (Pejčić et al., 2020).

$$\text{Remoção de células aderidas (\%)} = \frac{\text{ABS Controle} - \text{abs Tratamento}}{\text{ABS Controle}} * 100 \quad (\text{Equação 4})$$

## **2.8. Preparo dos hambúrgueres**

Para o estudo em matrizes alimentares, as concentrações de óleo essencial foram escolhidas com base nos valores de MIC obtidos para *E. coli* e *L. monocytogenes* obtidos nas etapas anteriores do presente estudo. A formulação do hambúrguer bovino utilizada para avaliar a atividade antimicrobiana do OPEA é apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Formulações de hambúrguer bovino: Controle – Hambúrguer bovino sem adição de OEPA; OEPA MIC – Hambúrguer bovino com adição de 2 mg.g<sup>-1</sup> de OEPA; OEPA sub-MIC – Hambúrguer bovino com adição de 1 mg.g<sup>-1</sup> de OEPA.

<b>Ingredientes (m/m)</b>	<b>Controle (%)</b>	<b>OEPA MIC (%)</b>	<b>OEPA sub-MIC (%)</b>
Acém moído	75,3	75,3	75,3
Gordura suína	15	15	15
Água gelada	2,5	2,3	2,4
Sal refinado	2,0	2,0	2,0
Proteína texturizada de soja	4,0	4,0	4,0
Tripolifosfato de sódio	0,4	0,4	0,4
Ácido eritórbico	0,5	0,5	0,5
Pasta de alho	0,2	0,2	0,2
Pimenta do reino	0,1	0,1	0,1
OEPA	-	0,2	0,1

O acém bovino moído e a gordura suína foram descongelados a 5 °C por 12 horas aproximadamente antes do preparo dos hambúrgueres. A gordura suína foi moída em moedor elétrico (Beccaro, PBM08I, Brasil) com discos de 8 mm e os ingredientes calculados e pesados. O acém moído foi misturado com o toucinho suíno e após homogeneização da massa cárnea, o OEPA foi adicionado nas concentrações listadas na Tabela 1. O restante dos ingredientes foi adicionado e misturado manualmente de forma asséptica até que a massa cárnea se tornasse bem homogênea. A massa cárnea foi moldada em um moldador manual de hambúrgueres tipo prensa de aproximadamente 50 g. Os hambúrgueres foram embalados individualmente em sacos de polietileno, identificados e armazenados sob refrigeração a 7 °C.

## **2.9. Análise de pH e atividade de água**

Para verificar se a adição de OEPA exerce influência nos valores de pH e atividade de água, estes parâmetros foram avaliados em hambúrgueres sem inoculação dos microrganismos *E. coli* e *L. monocytogenes*, sendo adotadas as mesmas condições de preparo dos tratamentos inoculados. O pH dos hambúrgueres foi determinado usando um medidor de pH (T-1000, Tekna). A atividade de água dos hambúrgueres foi determinada pelo equipamento Hygrolab (Marca Rotronic, Suíça). Estas medições foram conduzidas durante o armazenamento (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias) conforme metodologia estabelecida pela AOAC (2000).

## **2.10. Ensaio antimicrobiano em hambúrguer bovino**

Os lotes de hambúrgueres bovinos foram preparados para cada tratamento testado (Controle - sem adição de OEPA, 2 e 1 mg.g<sup>-1</sup> de OEPA). Foram realizadas inoculações de *E. coli* e *L. monocytogenes* separadamente nos hambúrgueres de acordo com cada tratamento (Tabela 1). Além do controle, amostras não inoculadas também foram preparadas para análises de atividade de água, pH e enumeração de *E. coli* e *L. monocytogenes*.

O experimento foi realizado com base no trabalho descrito por Osaili et al. (2021). Amostras de 50 g de hambúrguer foram colocados em placas de Petri esterilizadas e inoculados superficialmente com 500 µL de suspensão bacteriana diluída para se atingir uma concentração final de aproximadamente  $5,5 \times 10^5$  UFC.g<sup>-1</sup>. A inoculação foi realizada em temperatura ambiente de forma asséptica em capela bacteriológica (MA1550, Marconi) e os hambúrgueres mantidos em repouso por 30 min para adesão do patógeno. Posteriormente, os hambúrgueres foram embalados e armazenados a 7 °C. Análises microbiológicas ocorreram em intervalos de tempo de 0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias de armazenamento, considerando dia zero como dia do processamento dos hambúrgueres.

Em cada tempo de armazenamento, amostras de 25 g dos hambúrgueres foram transferidos para sacos esterilizados com 225 mL de água peptonada 0,1% (m/v) (HIMEDIA,

Mumbai, India) e homogeneizados em Stomacher (Sample Mixer Stomacher, Stomax) por 2 minutos. A partir do homogenato, diluições decimais em série foram preparadas em água peptonada 0,1% (m/v) (N. Silva et al., 2010).

A enumeração de *E. coli* foi determinada por *Spread plate* em placas de Petri esterilizadas contendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (ACUMEDIA, Michigan, USA). Para enumeração de *L. monocytogenes* foi utilizado o ágar Listeria seletivo Oxford (ACUMEDIA, Michigan, USA) modificado com 5% de NaCl (m/v). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. As unidades formadoras de colônia foram enumeradas e expressas em  $\log_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> (N. Silva et al., 2010).

### **2.11. Análise estatística**

Todas as análises foram realizadas em duplicata e o experimento em 3 repetições no delineamento inteiramente casualizado. As análises estatísticas foram realizadas no software RStudio versão 1.2.1335 (RSTUDIO TEAM<sup>®</sup>, 2019) de livre acesso. Os resultados das análises *in vitro*, *in situ* e físico-químicas foram expressas como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA unidirecional foi utilizada para analisar a influência do OEPA nos ensaios de adesão, e ANOVA bidirecional foi aplicada para analisar os efeitos dos diferentes tratamentos e o tempo de armazenamento para os ensaios de tempo x morte, análises físico-químicas e atividade antimicrobiana nos hambúrgueres. O teste de Bartlett foi utilizado para testar a homogeneidade das variâncias. Quando significativos pelo teste F ( $p < 0,05$ ), o teste *post-hoc* de Tukey foi aplicado à 5% de significância (Gomes, 2000).



### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Caracterização química e rendimento do óleo essencial

O OEPA extraído apresentou aspecto líquido, translúcido, de coloração dourada e rendimento da extração com base na massa seca das folhas do vegetal de 1,028% (m/m). Foram identificados 9 compostos no OEPA totalizando 94,45% dos constituintes, sendo 4 compostos (5,54%) não identificados. Os principais constituintes majoritários identificados no OEPA foram o timol (45,64%), *p*-Cymene (19,46%),  $\beta$ -Myrcene (12,59%) e  $\alpha$ -Terpinolene (9,86%) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Composição química do óleo essencial das folhas de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng.

TR	Composto	IRL <sub>cal</sub>	IRL <sub>tab</sub>	Área (%)
10,5	N.I.	977	-	1,68%
11,5	N.I.	992	-	3,47%
11,9	$\beta$ -Myrcene	999	994	12,59%
12,1	N.I.	1003	-	0,21%
13,1	$\alpha$ -Terpinene	1025	1018	0,10%
13,5	<i>p</i> -Cymene	1034	1026	19,46%
14,9	$\beta$ - <i>trans</i> -Ocimene	1059	1050	0,28%
15,9	$\alpha$ -Terpinolene	1094	1088	9,86%
26,1	Timol	1294	1291	45,64%
30,3	<i>trans</i> -Caryophyllene	1425	1418	3,94%
31,1	$\alpha$ -Bergamotene	1442	1436	1,47%
31,8	$\alpha$ -Humulene	1460	1454	1,11%
37,6	N.I.	1591	-	0,18%
<b>Total identificado</b>				<b>94,45%%</b>
<b>Total de constituintes</b>				<b>99,99%</b>

TR = Tempo de retenção (min.); IRL<sub>cal</sub> = Índice de retenção linear calculado; IRL<sub>tab</sub> = Índice de retenção linear tabelado; N.I. = Não identificado; as porcentagens da área de pico são calculadas em cromatografia gasosa usando a coluna Rtx-5MS.

Os compostos químicos identificados no presente trabalho são semelhantes aos encontrados por Mota, Dantas e Frota (2018), que identificaram o timol (61,5%) e o *p*-Cymene (11,2%) como os constituintes presentes em maior quantidade no OEPA. Os resultados também se assemelham à composição química do OEPA determinados por Da Costa et al. (2010), em que o timol (64,3%) e *p*-Cymene (10,3%) representavam os compostos majoritários. O timol também foi identificado como composto majoritário por Oliveira et al. (2011) em duas diferentes estações do ano, primavera (75,3%) e inverno (70,28%).

Apesar dos valores encontrados no presente estudo se aproximarem daqueles encontrados por da Costa et al., (2010); Mota et al., (2018); e Oliveira et al., (2011) é importante reforçar que a composição dos óleos essenciais pode sofrer variações dentro da mesma espécie em relação à região geográfica que foi cultivada, condições climáticas, época de colheita, condições de secagem e métodos de extração (Burt, 2004; Dorneles et al., 2019; Megawati et al., 2019).

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais são atribuídas aos seus compostos bioativos como o timol, composto majoritário do OEPA avaliado no presente trabalho (Tabela 2). Estudos científicos indicam o potencial antimicrobiano do timol contra bactérias patogênicas de grande importância para a indústria de alimentos em produtos cárneos, como hambúrguer (Radünz et al., 2020), frango marinado (Karam; Roustom; Abiad; El-obeid; & Savvaidis, 2019) e presunto (Pérez-baltar; Serrano; Bravo; Montiel; & Medina, 2019).

### **3.2. Concentração mínima inibitória e bactericida**

O OEPA apresentou melhor atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (0,25 mg.mL<sup>-1</sup>) e maior resistência para *E. coli* e *L. monocytogenes* (2 mg.mL<sup>-1</sup>) (Tabela 3). Os valores de MBC obtidos para *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram maiores do que aqueles obtidos para o MIC, indicando efeito apenas inibitório do OEPA. Para as demais

bactérias avaliadas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), o MBC foi igual ao MIC, que é um indicativo de ação bactericida do OEPA a partir das concentrações mínimas inibitórias (Tabela 3).

**Tabela 3.** Concentrações mínima inibitória (MIC) e bactericida (MBC) do óleo essencial de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng. contra bactérias patogênicas.

<b>Cepas bacterianas</b>	<b>MIC</b>	<b>MBC</b>
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 7644)	2 mg.mL <sup>-1</sup>	4 mg.mL <sup>-1</sup>
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	2 mg.mL <sup>-1</sup>	2 mg.mL <sup>-1</sup>
<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028)	1 mg.mL <sup>-1</sup>	2 mg.mL <sup>-1</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	0,25 mg.mL <sup>-1</sup>	4 mg.mL <sup>-1</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	1 mg.mL <sup>-1</sup>	1 mg.mL <sup>-1</sup>

Todos os microrganismos avaliados são importantes cepas patogênicas associadas a doenças de origem alimentar e indicadores de qualidade em alimentos. A morfologia celular de bactérias Gram-negativas no presente trabalho não apresentou maior resistência a ação antimicrobiana do óleo essencial como é relatado na literatura científica por Burt, 2004. Como os óleos essenciais possuem diferentes grupos de compostos químicos, é provável que a ação antimicrobiana dos seus constituintes possua diferentes alvos na célula bacteriana e não seja atribuída a um mecanismo específico (Gyawali & Ibrahim, 2014; Raut & Karuppayil, 2014).

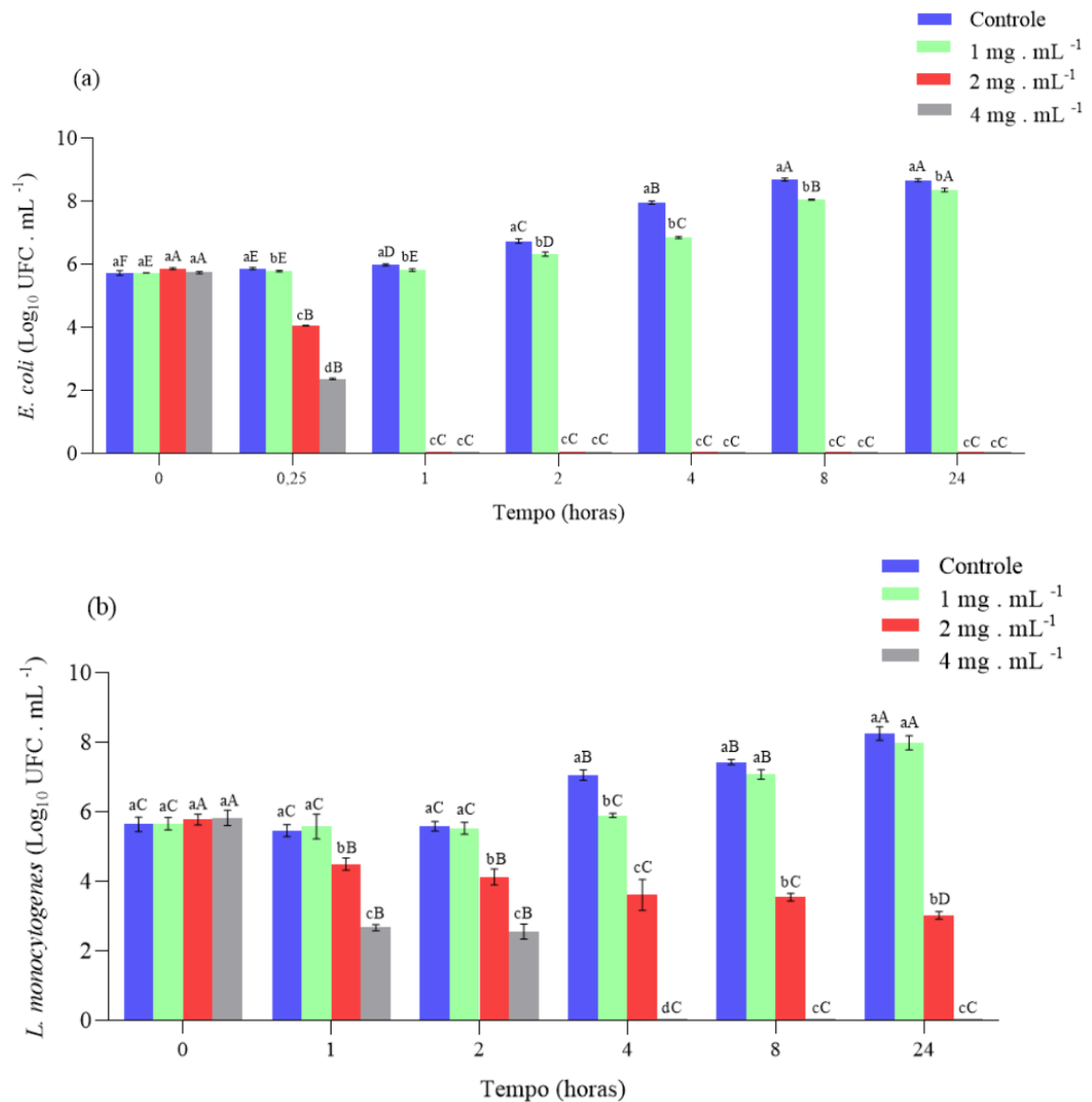
Alterações na morfologia celular dos microrganismos envolvem aumento da permeabilidade e danos a membrana celular e, conseqüentemente, extravasamento de constituintes intracelulares, o que possivelmente pode ter ocorrido com os microrganismos avaliados no presente estudo pela ação do OEPA. Outras alterações que podem ocorrer estão relacionadas ao transporte de elétrons, absorção de nutrientes, síntese proteica e de ácidos

nucléicos, coagulação do conteúdo celular e inibição de enzimas essenciais para o metabolismo energético da célula (Barbosa et al., 2020; Burt, 2004; Ilić et al., 2019).

Ressalta-se que diversos fatores podem influenciar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais, como a composição dos óleos, tipo de microrganismo avaliado, carga microbiana, condições de cultivo da planta, concentração do óleo essencial testada e estrutura celular bacteriana (Siddique, Parveen, Firdaus-e-Bareen, & Mazhar, 2020).

### **3.3. Ensaio tempo x morte**

Para *E. coli* e *L. monocytogenes*, os resultados evidenciaram amplo espectro de ação do OEPA contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, influenciado pelos fatores concentração de OEPA aplicada e o tempo de incubação ( $p \leq 0,05$ ), cuja interação foi significativa (Figura 2), sendo mais evidenciado para *E. coli* (Figura 2a).



**Figura 2.** Efeito antimicrobiano do OEPA na viabilidade celular de: (a) *E. coli* (ATCC 11229); e (b) *L. monocytogenes* (ATCC 7644) em 24 horas de incubação a 35 °C. Concentrações: 1 mg.mL<sup>-1</sup> (sub-MIC), 2 mg.mL<sup>-1</sup> (MIC) e 4 mg.mL<sup>-1</sup> (2x-MIC). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de OEPA dentro dos diferentes tempos de incubação avaliados pelo teste de Tukey a 5% de significância ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos de incubação em cada concentração de OEPA pelo teste de Tukey a 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

Já nos primeiros 15 minutos de incubação, todas as concentrações de OEPA foram mais efetivas na redução de células viáveis de *E. coli* que o tratamento controle. A partir de 1 hora, as populações iniciais de *E. coli* para 4 mg.mL<sup>-1</sup> (5,74 log<sub>10</sub> UFC.mL<sup>-1</sup>) e para 2 mg.mL<sup>-1</sup> (5,86 log<sub>10</sub> UFC.mL<sup>-1</sup>) apresentaram uma redução nas contagens de células viáveis para <10 UFC.mL<sup>-1</sup>, que se manteve durante o restante do período de incubação (Figura 2a).

A concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> não reduziu efetivamente o número de células viáveis de *E. coli* em comparação com concentrações de 2 mg.mL<sup>-1</sup> e 4 mg.mL<sup>-1</sup>, mas apresentou diferença significativa em relação ao controle após 24 horas de incubação, apresentando população média de 8,69 log<sub>10</sub> UFC.mL<sup>-1</sup> após o período de incubação (Figura 2a).

A atividade antimicrobiana do OEPA contra *L. monocytogenes* na concentração de 4 mg.mL<sup>-1</sup> (MBC) reduziu a população bacteriana inicial de 5,83 log<sub>10</sub> UFC.mL<sup>-1</sup> para <10 UFC.mL<sup>-1</sup> em 4 horas de incubação e a do tratamento com 2 mg.mL<sup>-1</sup> de 5,78 log<sub>10</sub> UFC.mL<sup>-1</sup> foi reduzida para 3,02 log<sub>10</sub> UFC.mL<sup>-1</sup> em 24 horas de incubação, demonstrando um menor efeito bactericida do OEPA (Figura 2b). A concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> apresentou efeito significativo em relação ao controle apenas no período de 4 horas de incubação com uma tendência ao aumento na contagem de células viáveis tanto para o controle quanto para 1 mg.mL<sup>-1</sup> de OEPA após 4 horas de incubação, diferente do comportamento observado para os tratamentos com concentrações de 2 e 4 mg.mL<sup>-1</sup>. Nesses tratamentos, o efeito antimicrobiano do OEPA apresentou diferenças significativas em relação ao controle já na primeira hora de incubação a partir das concentrações inibitórias (Figura 2b).

Em relação à estrutura celular, as bactérias Gram-negativas tendem a ser mais resistentes à ação antimicrobiana dos óleos essenciais do que as bactérias Gram-positivas, devido às diferenças na composição da parede celular (Behbahani, Noshad, & Falah, 2019; Guo et al., 2018). No entanto, essa resistência não foi observada para *Escherichia coli* avaliada no presente trabalho, visto que o efeito antimicrobiano do OEPA foi mais efetivo com redução de contagem

de células viáveis a  $<10 \text{ UFC.mL}^{-1}$  com  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Figura 2a). Para *L. monocytogenes*, este efeito foi observado somente a partir de 4 horas de incubação na concentração de  $4 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Figura 2b).

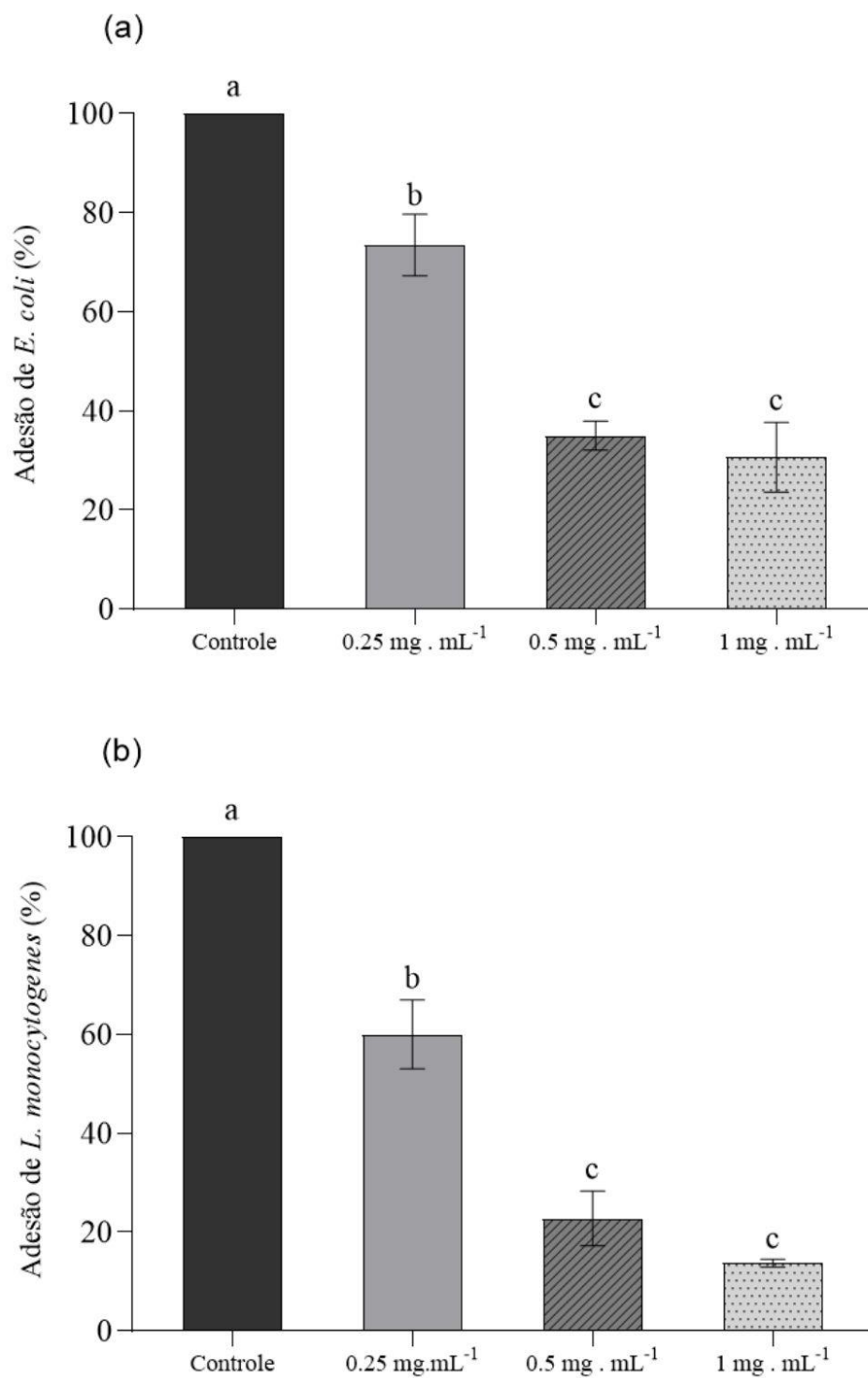
O timol é capaz de desintegrar a membrana externa de bactérias Gram-negativas, o que leva ao aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática e extravasamento de ATP (Burt, 2004). Kachur & Suntres (2020) atribuíram à presença de um grupo hidroxila com um sistema de elétrons deslocalizados na estrutura do timol, monoterpênóide isômero do carvacrol, como responsável pela atividade antimicrobiana do composto. Nesse sentido, a presença de timol no OEPA como composto majoritário e de outros componentes identificados (Tabela 2) podem ter influenciado a sensibilidade da membrana celular de *Escherichia coli*.

### **3.4. Adesão bacteriana na presença de OEPA**

O OEPA exibiu efeito significativo ( $p < 0,05$ ) em concentrações sub-inibitórias em relação à capacidade de adesão bacteriana (Figura 3). Para *E. coli*, concentrações de  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  apresentaram  $34,9\% \pm 2,9\%$  e  $30,6 \pm 7\%$  de adesão bacteriana em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) respectivamente, e estes resultados apontam uma forte redução na adesão bacteriana.

Comportamento semelhante foi observado para *L. monocytogenes* com menor adesão microbiana nas concentrações de  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  ( $22,8\% \pm 5,5\%$ ) e  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  ( $13,7\% \pm 0,8\%$ ). Para a concentração de  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ , a adesão bacteriana foi de  $61,8\% \pm 6,9\%$  com diferença significativa em relação ao tratamento controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 3).

Todas as concentrações testadas apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao tratamento sem óleo essencial para *E. coli* e *L. monocytogenes*, indicando um efeito positivo da aplicação do OEPA como alternativa de ingrediente natural que pode contribuir para a segurança microbiológica de alimentos.



**Figura 3.** Adesão de (a) *E. coli* ATCC 11229; e (b) *L. monocytogenes* ATCC 7644 incubados a 35 °C por 24 horas após tratamento com diferentes concentrações de OEPA. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância ( $p < 0,05$ ).



Ćirić et al., (2019) atribuíram a redução na formação do biofilme à inibição do mecanismo de *quorum sensing*, que regula a motilidade bacteriana necessárias para adesão das bactérias na superfície e pela redução na produção da matriz de polissacarídeo, essencial para formação da estrutura do biofilme.

Resultado semelhante foi observado por Vasconcelos et al. (2017b), em que o OEPA apresentou atividade antiadesão dependente da concentração com efeito significativo em concentrações sub-MIC, MIC e 2x-MIC quando comparadas ao controle. Mansuri et al. (2020) apontaram uma redução de 63,46% no conteúdo de exopolissacarídeo produzido por *P. aeruginosa* quando tratadas com concentração sub-MIC de óleo essencial de Patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) e uma redução de 88,13% na formação de biofilme para *P. aeruginosa* não aderida. Bazargani e Rohloff (2016) avaliaram a inibição da fixação inicial de células de *E. coli* tratadas com óleo essencial de coentro, anis e hortelã-pimenta na concentração MIC, e relataram inibição média de 72,3%, 56,2% e 98,4%, respectivamente. Os autores ainda destacaram que *E. coli* (Gram-negativa) foi mais resistente a ação dos óleos essenciais na formação de biofilme quando comparado com *S. aureus* (Gram-positiva).

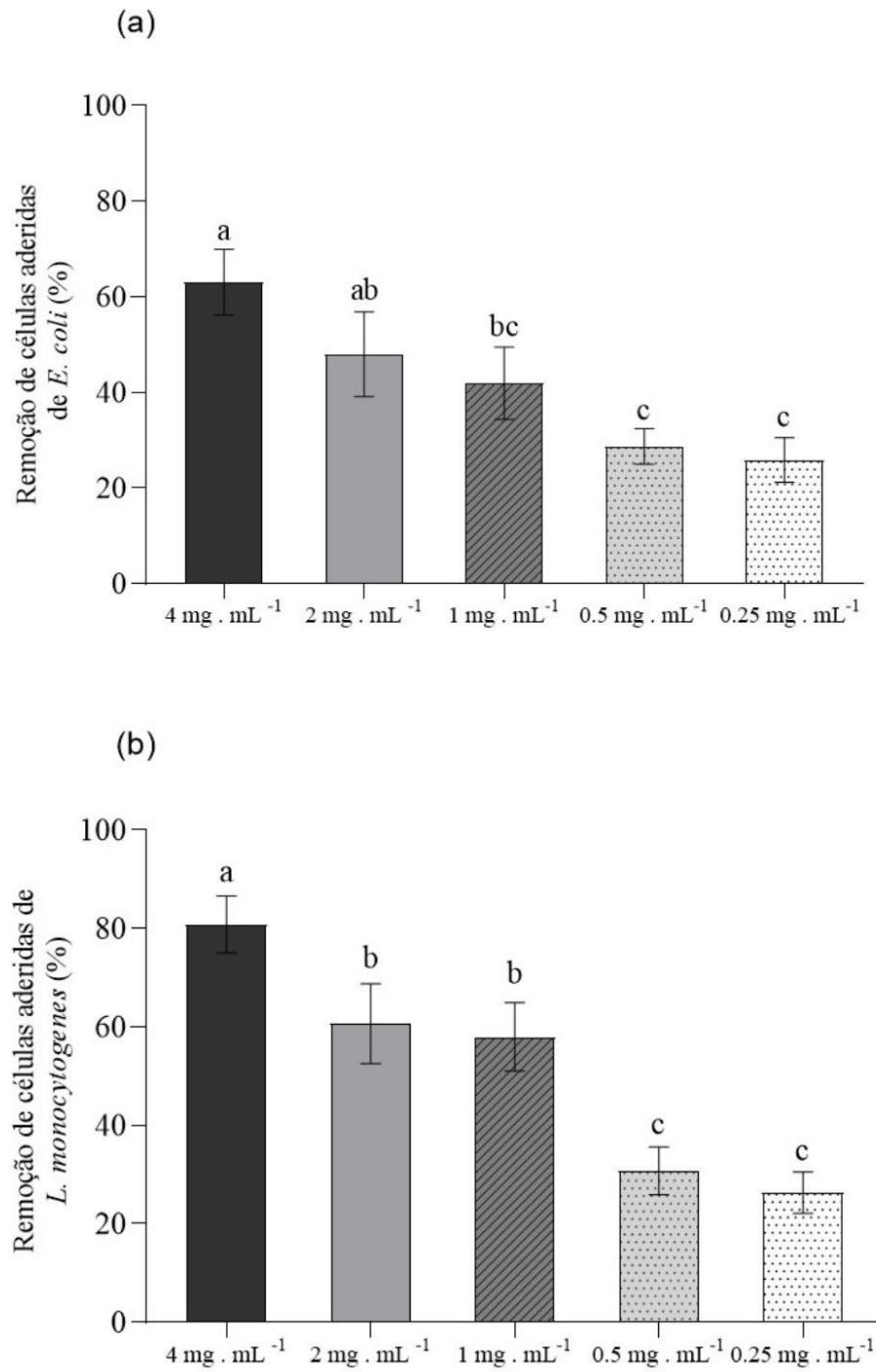
### **3.5. Remoção de células aderidas por OEPA**

O OEPA demonstrou um potencial de remoção de células bacterianas aderidas dependente da concentração utilizada, e os efeitos mais expressivos foram encontrados em concentrações MIC e 2x-MIC. Mesmo assim, concentrações sub-inibitórias mais baixas apresentaram remoção significativa das células de *E. coli* e *L. monocytogenes* aderidas ( $p < 0,05$ ) (Figuras 4a e 4b).

Remoção de células de *E. coli* aderidas de  $63 \pm 6,9$  % quando adicionados  $4 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $48\% \pm 8,8\%$  para  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  (MIC),  $28,7 \pm 3,7\%$  para  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $25,85\% \pm 4,6\%$  para  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  de OEPA foram observadas (Figura 4a). O efeito para *L. monocytogenes* foi mais

expressivo para concentração de 4 mg.mL<sup>-1</sup> (80,8% ± 5,8%) e 2 mg.mL<sup>-1</sup> (60,6% ± 8%). A remoção foi menor para concentrações de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> (30,7% ± 4,9%) e 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> (26,3% ± 4,2%) (Figura 4b).

O efeito de remoção de bactérias aderidas pode ser considerado um efeito expressivo se for considerado que após a adesão, os microrganismos podem adquirir resistência aos antimicrobianos através da produção de exopolissacarídeo para formação de biofilmes como relatado por Gloag, Fabbri, Wozniak, & Stoodley, (2020).



**Figura 4.** Remoção de células aderidas: (a) *E. coli* (ATCC 11229); e (b) *L. monocytogenes* (ATCC 7644) incubados a 35 °C por 24 horas após tratamento com diferentes concentrações de OEPA. Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

### 3.6. pH e atividade de água dos hambúrgueres

Ocorreram alterações significativas ( $p < 0,05$ ) do pH dos hambúrgueres durante o armazenamento que podem ser relacionadas à presença de microrganismos naturalmente presentes na carne. Porém, os valores de pH nas amostras dos hambúrgueres sem OEPA não foram significativos ( $p \geq 0,05$ ) em relação aos hambúrgueres com OEPA em cada período de armazenamento. No 15° dia de armazenamento, o pH dos hambúrgueres foi estatisticamente igual aos observados no primeiro dia de avaliação (dia do processamento dos hambúrgueres) ( $p \geq 0,05$ ). A interação entre os fatores concentração de OEPA e tempo de armazenamento não foi significativa ( $p \geq 0,05$ ) (Tabela 4).

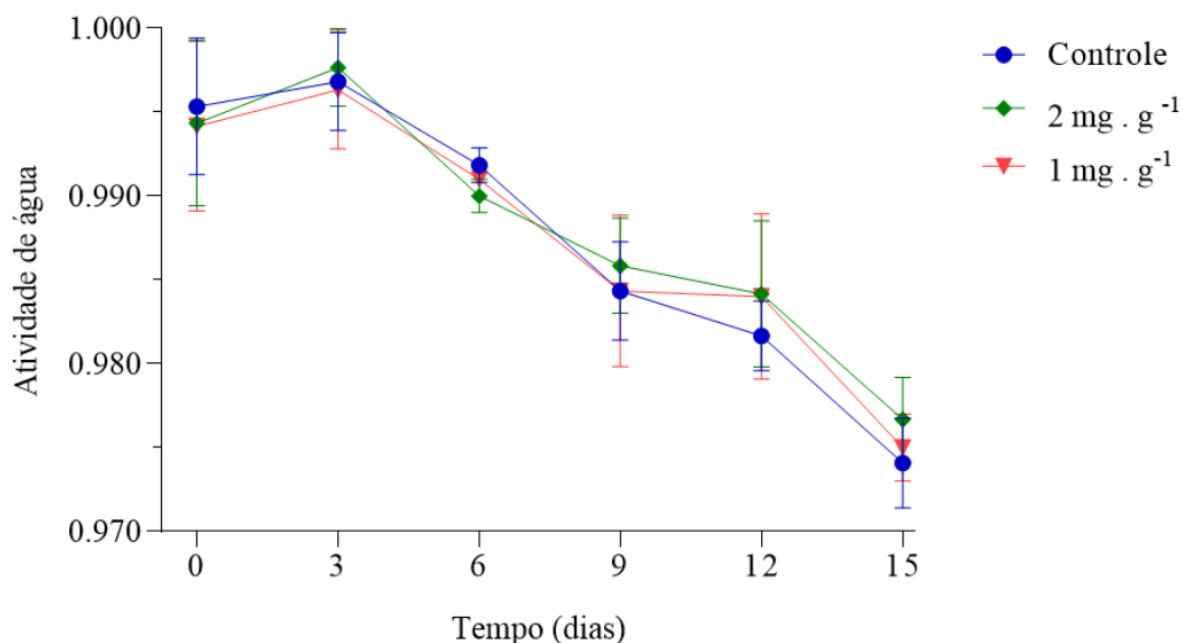
Zamuz et al (2018) atribui uma ligeira queda no pH pode ter ocorrido por conta do acúmulo de ácido lático ocasionado pelo desenvolvimento nos primeiros dias de bactérias lácticas. Como a carne tem baixas concentrações de carboidratos, a queda do pH não apresentou queda mais expressiva ao longo do armazenamento. De acordo com Karabagias, Badeka, & Kontominas (2011) o aumento do pH de carnes pode estar relacionado ao desenvolvimento microbiano e a degradação de proteínas para geração de energia com liberação de aminoácidos livres no meio, como aminas, de caráter alcalino.

**Tabela 4.** Valores de pH dos hambúrgueres com diferentes concentrações de OEPA armazenados a 7 °C por 15 dias.

Tempo de armazenamento (Dias)	Controle	OEPA 2 mg.mL <sup>-1</sup>	OEPA 1 mg.mL <sup>-1</sup>
	0	6.63 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,55 ± 0,1 <sup>ab</sup>
3	6,32 ± 0,07 <sup>bc</sup>	6,22 ± 0,07 <sup>bc</sup>	6,33 ± 0,07 <sup>ab</sup>
6	6,13 ± 0,13 <sup>c</sup>	6,06 ± 0,14 <sup>c</sup>	6,18 ± 0,05 <sup>b</sup>
9	6,31 ± 0,09 <sup>bc</sup>	6,08 ± 0,11 <sup>c</sup>	6,28 ± 0,09 <sup>ab</sup>
12	6,51 ± 0,11 <sup>ab</sup>	6,40 ± 0,17 <sup>bc</sup>	6,4 ± 0,19 <sup>ab</sup>
15	6,73 ± 0,16 <sup>a</sup>	6,77 ± 0,12 <sup>a</sup>	6,55 ± 0,12 <sup>a</sup>

Interação entre concentração de OEPA e tempo de armazenamento não significativa pelo teste F a 5% ( $p \geq 0,05$ ). Para o fator concentração de OEPA, as médias dos tratamentos são estatisticamente iguais pelo teste F a 5% de significância ( $p \geq 0,05$ ). Para o fator tempo de armazenamento, letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de significância ( $p \geq 0,05$ ).

No tempo 0 (dia do processamento dos hambúrgueres), a atividade de água média dos hambúrgueres foi igual a  $0,991 \pm 0,005$  para os tratamentos de 2 mg.mL<sup>-1</sup>,  $0,993 \pm 0,005$  para 1 mg.mL<sup>-1</sup>, e  $0,993 \pm 0,004$  para o tratamento controle (Figura 5). A interação foi não significativa ( $p \geq 0,05$ ) e na análise para cada fator isoladamente (Concentração de OEPA e Tempo) não foi observada diferença significativa pelo teste F ( $p \geq 0,05$ ).



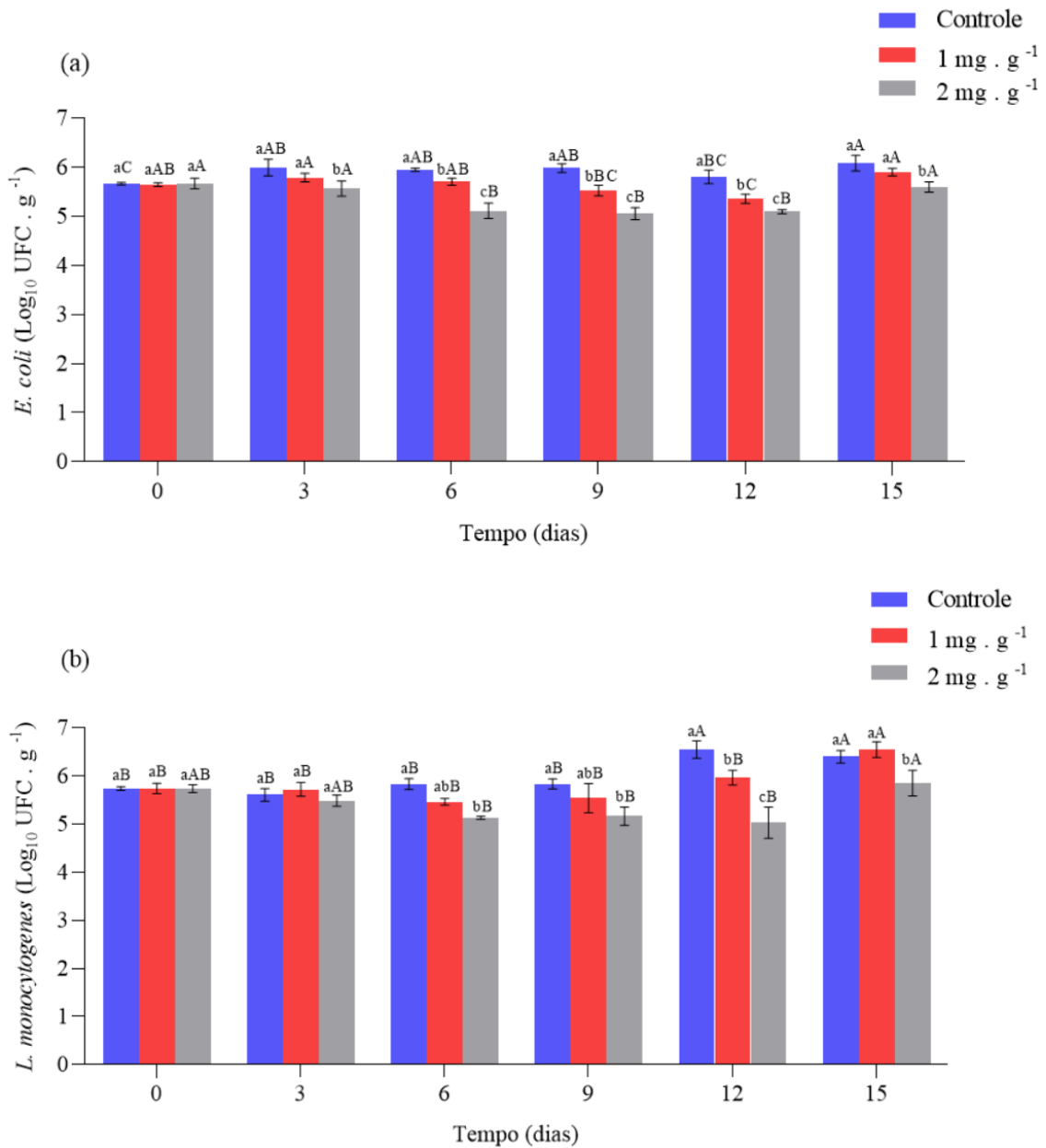
**Figura 5.** Atividade de água dos hambúrgueres com diferentes concentrações de OEPA e não inoculados com suspensão bacteriana, armazenados a 7 °C por 15 dias. Interação entre concentração de OEPA e tempo de armazenamento não significativa pelo teste F a 5% ( $p \geq 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos para os fatores concentração de OEPA e para o fator tempo de armazenamento pelo teste F a 5% de significância ( $p \geq 0,05$ ).

Os resultados apresentados nas Tabelas 4 e Figura 5 indicam que a adição do OEPA nos hambúrgueres não alterou significativamente os valores de pH e atividade de água dos hamburgueres. Considerou-se relevante o monitoramento dessas variáveis porque são fatores que influenciam o desenvolvimento microbiano em alimentos e contribuem para o crescimento da microbiota naturalmente presente na carne fresca, utilizada como matéria-prima para o processamento dos hambúrgueres bovinos.

### 3.7. Atividade antimicrobiana do OEPA em hambúrgueres bovinos

Os hambúrgueres bovinos sem inoculação bacteriana não apresentaram contagem de células viáveis de *E. coli* e *L. monocytogenes* no início do processamento ( $<10 \text{ UFC.g}^{-1}$ ), o que indica ausência de contaminação da carne utilizada com os patógenos avaliados.

Na avaliação durante o armazenamento, para *E. coli*, os hambúrgueres tratados com  $2 \text{ mg.g}^{-1}$  de OEPA apresentaram uma queda significativa da carga microbiana inicial ( $5,67 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ ) em relação ao controle no 3º dia e a diferença se estendeu até 15º dia. O hambúrguer com adição de  $1 \text{ mg.g}^{-1}$  de OEPA apresentou uma queda significativa em relação ao controle até o 12º dia de armazenamento, porém no 15º dia a carga microbiana foi estatisticamente igual ao tratamento sem OEPA (Figura 6a).



**Figura 6.** Comportamento da atividade antimicrobiana do OEPA em hambúrgueres contaminados com: (a) *E. coli* (ATCC 11229); e (b) *L. monocytogenes* (ATCC 7644) durante 15 dias de armazenamento a 7 °C. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações de OEPA dentro dos diferentes tempos de armazenamento pelo teste de Tukey a 5% de significância ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento dentro de cada concentração de OEPA pelo teste de Tukey a 5% de significância ( $p < 0,05$ ).



A contagem de *L. monocytogenes* na concentração de 2 mg.g<sup>-1</sup> apresentou tendência de redução da carga microbiana em relação ao tratamento controle a partir do 6º dia de armazenamento ( $p \geq 0,05$ ). Durante o armazenamento, foi observado redução da concentração de *L. monocytogenes* nos hambúrgueres com 2 mg.g<sup>-1</sup> de OEPA com diferença máxima de 1,52 log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup> no 12º dia de armazenamento em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). No entanto, a partir do 12º dia houve aumento de aproximadamente 0,72 log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup> até o 15º dia. Mesmo com o aumento da carga microbiana, a concentração de 2 mg.g<sup>-1</sup> ainda diferiu significativamente do tratamento controle e 1 mg.g<sup>-1</sup> de OEPA ( $p < 0,05$ ), (Figura 6b).

Os hambúrgueres tratados com 1 mg.g<sup>-1</sup> (sub-MIC) de OEPA não apresentaram uma variação significativa ( $p \geq 0,05$ ) em relação à contagem de células viáveis de *L. monocytogenes* até o 12º dia de armazenamento em comparação ao controle. Entretanto, foi verificado o aumento na contagem microbiana após o 12º dia. Ao final do 15º dia de armazenamento a carga microbiana do tratamento de 1 mg.g<sup>-1</sup> de OEPA atingiu os valores da contagem inicial de *L. monocytogenes* inoculada nos hambúrgueres.

Os hambúrgueres tratados com OEPA na concentração de 2 mg.g<sup>-1</sup> (MIC) apresentaram redução significativa da carga microbiana de *E. coli* e *L. monocytogenes* de até 0,93 e 1,52 log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente, durante o período de armazenamento (Figuras 6a e 6b). No último tempo de armazenamento avaliado (15 dias), OEPA na concentração de 2 mg.g<sup>-1</sup> apresentou contagem significativamente menor tanto para população de *E. coli* quanto para *L. monocytogenes* em relação ao controle. A superação do mecanismo de barreira antimicrobiana por conta da menor disponibilidade de compostos bioativos na parte solúvel da carne (Hyldgaard et al., 2012) e a interação do óleo essencial com constituintes lipídicos, proteicos e sais no alimento, o pH do meio e a carga microbiana competitiva presente (Burt, 2004; Doulgeraki et al., 2012; Shekarforoush et al., 2015) são fatores que contribuem para a redução da eficácia antimicrobiana de óleos essenciais quando aplicados em matrizes alimentícias. No

presente estudo, esses fatores podem ter resultado no aumento do crescimento microbiano nos hambúrgueres bovinos a partir do 12º dia de armazenamento, observado em todas as concentrações de OEPA avaliadas (Figuras 6a e 6b).

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, o OEPA apresentou eficácia contra dois patógenos de grande importância para a indústria do setor de carnes e produtos carnes, evidenciando sua capacidade de contribuir para um maior tempo de conservação dos hambúrgueres sob refrigeração.

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a utilização do óleo essencial das folhas de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng. (hortelã-grosso ou malvarisco) na concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup> apresentou excelente efeito antimicrobiano *in vitro* e forneceu proteção adicional contra o desenvolvimento de *E. coli* a partir do 3º dia e de *L. monocytogenes* a partir do 6º dia de armazenamento de hambúrgueres bovinos a 7 °C. Observou-se também uma redução do efeito antimicrobiano *in situ* em relação à atividade antimicrobiana *in vitro* do OEPA, associado a interação do óleo essencial com os componentes da matriz cárnea.

Um dos principais desafios da aplicação de óleos essenciais em matrizes cárneas está relacionada à sua incorporação à essa matriz com objetivo de potencializar a atividade antimicrobiana *in situ*, já que a composição química da carne, entre outros fatores, pode influenciar a eficácia antimicrobiana desses óleos. Nesse sentido, a incorporação dos óleos essenciais em matrizes alimentícias requer mais estudos para que essas substâncias sejam utilizadas de forma eficaz, principalmente se utilizados em aplicações alimentares. Mesmo com a limitação de incorporação na matriz cárnea, o óleo essencial de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng. possui potencial de utilização como conservante natural.

Além disso, ressalta-se que existe um amplo campo de pesquisa para óleos essenciais em sistemas alimentares, envolvendo os efeitos desses compostos sobre propriedades físico-químicas e tecnológicas, atributos sensoriais, sua capacidade antioxidante e de conservação como alternativa natural para garantir a qualidade e segurança de carnes e derivados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R. P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy* (4th ed.; C. Stream, Ed.). Illinois: Allured Publishing Corporation, USA.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official methods of analysis* (14th ed.). Arlینگton: Sidney Willians.
- Arumugam, G., Swamy, M., & Sinniah, U. (2016). *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance. *Molecules*, 21(4), 369. <https://doi.org/10.3390/molecules21040369>
- Barbosa, L. N., Alves, F. C. B., Andrade, B. F. M. T., Albano, M., Rall, V. L. M., Fernandes, A. A. H., ... Fernandes Junior, A. (2020). Proteomic analysis and antibacterial resistance mechanisms of *Salmonella* Enteritidis submitted to the inhibitory effect of *Origanum vulgare* essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Proteomics*, 214, 103625. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103625>
- Bassanetti, I., Carcelli, M., Buschini, A., Montalbano, S., Leonardi, G., Pelagatti, P., ... Rogolino, D. (2017). Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives. *Food Control*, 73, 606–612. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.010>
- Bazargani, M. M., & Rohloff, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 156–164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.036>
- Behbahani, A. B., Noshad, M., & Falah, F. (2019). Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial Pathogenesis*, 136, 103716. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103716>

- Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017, May 1). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, Vol. 75, pp. 1–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>
- Bukvički, D., Stojković, D., Soković, M., Vannini, L., Montanari, C., Pejin, B., ... Marin, P. D. (2014). *Satureja horvatii* essential oil: *In vitro* antimicrobial and antiradical properties and in situ control of *Listeria monocytogenes* in pork meat. *Meat Science*, 96(3), 1355–1360. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.11.024>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O’Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*, 54, 111–119.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- CDC. (2013, November 1). Vital signs: Listeria illnesses, deaths, and outbreaks - United States, 2009-2011 references. *Annals of Emergency Medicine*, Vol. 62, pp. 536–537.  
<https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2013.08.006>
- Chen, J.-Q., Regan, P., Laksanalamai, P., Healey, S., & Hu, Z. (2017). Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness*, 6(3), 97–120. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.06.002>
- Ćirić, A. D., Petrović, J. D., Glamočlija, J. M., Smiljković, M. S., Nikolić, M. M., Stojković, D. S., & Soković, M. D. (2019). Natural products as biofilm formation antagonists and regulators of quorum sensing functions: A comprehensive review update and future trends. *South African Journal of Botany*, 120, 65–80.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.09.010>

da Costa, J. G. M., Pereira, C. K. B., Rodrigues, F. F. G., & de Lima, S. G. (2010). Chemical Composition, Antibacterial and Fungicidal Activities of Leaf Oil of *Plectranthusamboinicus* (Lour.) Spreng. *Journal of Essential Oil Research*, 22(2), 183–185.

<https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700298>

Dannenber, G. da S., Funck, G. D., Mattei, F. J., da Silva, W. P., & Fiorentini, Â. M. (2016). Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) *in vitro* and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 120–127.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.009>

Dhifi, W., Jazi, S., El Beyrouthy, M., Sadaka, C., & Mnif, W. (2020). Assessing the potential and safety of *Myrtus communis* flower essential oils as efficient natural preservatives against *Listeria monocytogenes* growth in minced beef under refrigeration. *Food Science and Nutrition*, 8(4), 2076–2087. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1497>

Dorneles, L. N. S., Goneli, A. L. D., Cardoso, C. A. L., da Silva, C. B., Hauth, M. R., Oba, G. C., & Schoeninger, V. (2019). Effect of air temperature and velocity on drying kinetics and essential oil composition of *Piper umbellatum* L. leaves. *Industrial Crops and Products*, 142, 111846. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111846>

Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., & Nychas, G. J. E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 130–141.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020>

Dumlupinar, B., Şeker Karatoprak, G., Damar Celik, D., Soyogul Güre, Ü., Demirci, B., Gürbüz, B., ... Kurtulus, E. M. (2020). Synergic potential of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. Essential oil and antibiotic combinations against *Klebsiella*

*pneumoniae*. *South African Journal of Botany*, 135, 117–126.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.022>

Elias, S. de O., Noronha, T. B., & Tondo, E. C. (2019). *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 prevalence and levels on lettuce: A systematic review and meta-analysis. *Food Microbiology*, 84, 103217. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.001>

Erny, S. M., Razali, M., Mirfat, A., & Mohd, S. (2014). *Antimicrobial activity and bioactive evaluation of Plectranthus amboinicus essential oil* (Vol. 2). Retrieved from [www.usa-journals.com](http://www.usa-journals.com)

Ghaderi-Ghahfarokhi, M., Barzegar, M., Sahari, M. A., Ahmadi, G. H., & Gardini, F. (2017). Chitosan-cinnamon essential oil nano-formulation: Application as a novel additive for controlled release and shelf life extension of beef patties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 19–28.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.002>

Gloag, E. S., Fabbri, S., Wozniak, D. J., & Stoodley, P. (2020). Biofilm mechanics: Implications in infection and survival. *Biofilm*, 2, 100017.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2019.100017>

Gomes, F. P. (2000). *Curso de estatística experimental* (14th ed.; S. Paulo, Ed.). Piracicaba.

Gonçalves, T. B., Braga, M. A., De Oliveira, F. F. M., Santiago, G. M. P., Carvalho, C. B. M., Cabral, P. B. E., ... Nagao-Dias, A. T. (2012). Effect of subinhibitory and inhibitory concentrations of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on *Klebsiella pneumoniae*. *Phytomedicine*, 19(11), 962–968.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.05.013>

Guo, J, Gao, Z., Li, G., Fu, F., Liang, Z., Zhu, H., & Shan, Y. (2019). Antimicrobial and antibiofilm efficacy and mechanism of essential oil from *Citrus Changshan-huyou* Y. B. chang against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 105, 256–264.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.06.014>
- Guo, Jia-jing, Gao, Z., Xia, J., Ritenour, M. A., Li, G., & Shan, Y. (2018). Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of citrus essential oils from the main cultivated varieties in China. *LWT*, *97*, 825–839. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.060>
- Heredia, N., & García, S. (2018). Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition*, *4*(3), 250–255. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.006>
- Hulankova, R., Borilova, G., & Steinhauserova, I. (2013). Combined antimicrobial effect of oregano essential oil and caprylic acid in minced beef. *Meat Science*, *95*(2), 190–194. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.003>
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, *3*, 12.
- Ilić, D. P., Stanojević, L. P., Troter, D. Z., Stanojević, J. S., Danilović, B. R., Nikolić, V. D., & Nikolić, L. B. (2019). Improvement of the yield and antimicrobial activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) essential oil by fruit milling. *Industrial Crops and Products*, *142*, 111854. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111854>
- Kachur, K., & Suntres, Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(18), 3042–3053. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>
- Karabagias, I., Badeka, A., & Kontominas, M. G. (2011). Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. *Meat Science*, *88*(1), 109–116. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.12.010>
- Karam, L., Roustom, R., Abiad, M. G., El-Obeid, T., & Savvaidis, I. N. (2019). Combined



- effects of thymol, carvacrol and packaging on the shelf-life of marinated chicken. *International Journal of Food Microbiology*, 291, 42–47.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.008>
- Lianou, A., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. E. (2017). Chapter 17 - Meat Safety—I Foodborne Pathogens and Other Biological Issues. In F. B. T.-L. M. S. (Eighth E. Toldra´ (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 521–552). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100694-8.00017-0>
- Lianou, A., & Sofos, J. N. (2007, September 1). A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *Journal of Food Protection*, Vol. 70, pp. 2172–2198.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.9.2172>
- Mansuri, A., Lokhande, K., Kore, S., Gaikwad, S., Nawani, N., Swamy, K. V., ... Pawar, S. (2020). Antioxidant, anti-quorum sensing, biofilm inhibitory activities and chemical composition of Patchouli essential oil: in vitro and in silico approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1–12.  
<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1810124>
- Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-López, C., Faberi, A., Sergi, M., Sigismondi, C., ... Serio, A. (2015). *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, 50, 794–803.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.029>
- Megawati, Fardhyanti, D. S., Sediawan, W. B., & Hisyam, A. (2019). Kinetics of mace (*Myristicae arillus*) essential oil extraction using microwave assisted hydrodistillation: Effect of microwave power. *Industrial Crops and Products*, 131, 315–322.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.067>
- Møller, C. O. A., Sant’Ana, A. S., Hansen, S. K. H., Nauta, M. J., Silva, L. P., Alvarenga, V.

- O., ... Hansen, T. B. (2016). Evaluation of a cross contamination model describing transfer of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* during grinding of pork and beef. *International Journal of Food Microbiology*, 226, 42–52.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.016>
- Mota, A. P. P., Dantas, J. C. P., & Frota, C. C. (2018). Antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citrates*, *Plectranthus amboinicus*, and *Cinnamomum zeylanicum* against *Mycobacterium tuberculosis*. *Ciencia Rural*, 48(6).  
<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170697>
- Murthy, P. S., Ramalakshmi, K., & Srinivas, P. (2009). Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. *Food Chemistry*, 114(3), 1014–1018.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.064>
- Oliveira, R. ., Sá, I. C. ., Duarte, L. ., & Oliveira, F. . (2011). Constituintes voláteis de *Mentha pulegium* L. e *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13(2), 165–169. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000200007>
- Osaili, T. M., Hasan, F., Dhanasekaran, D. K., Obaid, R. S., Al-Nabulsi, A. A., Ayyash, M., ... Holley, R. (2021). Effect of active essential oils added to chicken tawook on the behaviour of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 during storage. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108947.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108947>
- Paparella, A., Mazzarrino, G., Chaves-López, C., Rossi, C., Sacchetti, G., Guerrieri, O., & Serio, A. (2016). Chitosan boosts the antimicrobial activity of *Origanum vulgare* essential oil in modified atmosphere packaged pork. *Food Microbiology*, 59, 23–31.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.007>
- Pejčić, M., Stojanović-Radić, Z., Genčić, M., Dimitrijević, M., & Radulović, N. (2020). Anti-virulence potential of basil and sage essential oils: Inhibition of biofilm formation,

- motility and pyocyanin production of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Food and Chemical Toxicology*, 111431. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111431>
- Pérez-Baltar, A., Serrano, A., Bravo, D., Montiel, R., & Medina, M. (2019). Combined Effect of High Pressure Processing with Enterocins or Thymol on the Inactivation of *Listeria monocytogenes* and the Characteristics of Sliced Dry-cured Ham. *Food and Bioprocess Technology*, 12(2), 288–297. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2212-4>
- Pinheiro, P. F., Costa, A. V., Alves, T. de A., Galter, I. N., Pinheiro, C. A., Pereira, A. F., ... Fontes, M. M. P. (2015). Phytotoxicity and Cytotoxicity of Essential Oil from Leaves of *Plectranthus amboinicus*, Carvacrol, and Thymol in Plant Bioassays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(41), 8981–8990. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03049>
- Pinheiro, P. F., Queiroz, V. T. de, Rondelli, V. M., Costa, A. V., Marcelino, T. de P., & Pratisoli, D. (2013). Insecticidal activity of citronella grass essential oil on *Frankliniella schultzei* and *Myzus persicae*. *Ciência e Agrotecnologia*, Vol. 37, pp. 138–144. scielo .
- Radoshevich, L., & Cossart, P. (2018, January 1). *Listeria monocytogenes*: Towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 16, pp. 32–46. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.126>
- Radünz, M., da Trindade, M. L. M., Camargo, T. M., Radünz, A. L., Borges, C. D., Gandra, E. A., & Helbig, E. (2019). Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. *Food Chemistry*, 276, 180–186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.173>
- Radünz, M., dos Santos Hackbart, H. C., Camargo, T. M., Nunes, C. F. P., de Barros, F. A. P., Dal Magro, J., ... da Rosa Zavareze, E. (2020). Antimicrobial potential of spray drying encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on the conservation of hamburger-like meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 330, 108696.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108696>
- Santos, F. A. V., Serra, C. G., Bezerra, R. J. A. C., Figueredo, F. G., Edinardo, Matias, F. F., ... Coutinho, H. D. M. (2016). Antibacterial activity of *Plectranthus amboinicus* Lour (Lamiaceae) essential oil against *Streptococcus mutans*. *European Journal of Integrative Medicine*, 8(3), 293–297. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2015.11.021>
- Shekarforoush, S. S., Basiri, S., Ebrahimnejad, H., & Hosseinzadeh, S. (2015). Effect of chitosan on spoilage bacteria, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in cured chicken meat. *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, 303–309. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.033>
- Siddique, S., Parveen, Z., Firdaus-e-Bareen, & Mazhar, S. (2020). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oils from leaves of three *Melaleuca* species of Pakistani flora. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 67–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.01.018>
- Silva, N., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. de A., Taniwaki, M. H., Gomes, R. A. R., & Santos, R. F. S. (2010). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos* (4th ed.). São Paulo: Varela.
- Silveira, S. M., Luciano, F. B., Fronza, N., Cunha, A., Scheuermann, G. N., & Vieira, C. R. W. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 °C. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 86–93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.032>
- Šojić, B., Pavlić, B., Ikonić, P., Tomović, V., Ikonić, B., Zeković, Z., ... Ivić, M. (2019). Coriander essential oil as natural food additive improves quality and safety of cooked pork sausages with different nitrite levels. *Meat Science*, 157, 107879. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107879>

- Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. (2007, August 1). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, Vol. 9, pp. 1236–1243.  
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.011>
- Vasconcelos, S. E. C. B., Melo, H. M., Cavalcante, T. T. A., Júnior, F. E. A. C., de Carvalho, M. G., Menezes, F. G. R., ... Costa, R. A. (2017). *Plectranthus amboinicus* essential oil and carvacrol bioactive against planktonic and biofilm of oxacillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1968-9>
- Velasco, J., Rojas, L. B., Díaz, T., & Usubillaga, A. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Coleus amboinicus* Lour., against enteric pathogens. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 12(4), 453–461.  
<https://doi.org/10.1080/0972060X.2009.10643744>
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Zhang, D. H., Yao, X.-H., Duan, M.-H., Wei, F.-Y., Wu, G.-H., & Li, L. (2015). Variation of essential oil content and antioxidant activity of *Lonicera* species in different sites of China. *Industrial Crops and Products*, 77, 772–779.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.048>  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.032>
- Zhao, Y., Teixeira, J. S., Saldaña, M. D. A., & Gänzle, M. G. (2019). Antimicrobial activity of bioactive starch packaging films against *Listeria monocytogenes* and reconstituted meat microbiota on ham. *International Journal of Food Microbiology*, 305, 108253.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108253>