

Artigo

Estudo da Composição Química e Aplicação do Óleo Essencial *Origanum vulgare* L como Agente Antibacteriano em Sururu (*Mytella charruana*) *in natura*

Gomes, P. R. B.;* Liston, M. S.; da Silva, J. C.; de Oliveira R. W. S.; Louzeiro, H. C.; Fontenele, M. A.; de Paula, M. L.; Nascimento, A. R.; Filho, V. E. M.

Rev. Virtual Quim., 2019, 11 (6), 1693-1711. Data de publicação na Web: 17 de outubro de 2019

<http://rvq.sbq.org.br>

Study of the Chemical Composition and Application of the Essential Oil *Origanum vulgare* L as Antimicrobial Agent in Sururu (*Mytella charruana*) *in natura*

Abstract: In this work, we tested the preservative action of the essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L) (OEO) in sururu (*Mytella charruana*) *in natura*. In order to do this, we extracted the essential oil by hydrodistillation and then identified the components by gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-MS) and for the activity, we performed counts of *Escherichia coli*, mesophilic total bacteria, total volatile bases, and pH sururu. The result of the gas chromatographic analysis showed that the largest component was carvacrol and the lowest was the 1,4 methanoazulene. The addition of 1.4 % OEO completely inhibited inoculated *E. coli*, decreased the growth of total mesophilic bacteria and delayed the deterioration process. OEO activity is mainly attributed to its main component, carvacrol, which has antibacterial activity. The results indicate that OEO can be applied to help prolong the shelf-life and safety of sururus *in natura*.

Keywords: Food preservative; volatile compounds; *Origanum vulgare* L; *Mytella charruana*; antibacterial activity.

Resumo

Neste trabalho, testamos a ação conservante do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L)(OEO) em sururu (*Mytella charruana*) *in natura*. Para isso, extraímos o óleo essencial por hidrodestilação e em seguida, identificamos os componentes por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) e para a atividade realizamos contagens de *Escherichia coli*, bactérias totais mesofílicas, bases voláteis totais e pH sururu. O resultado da análise cromatográfica gasosa mostrou que o componente em maior quantidade foi o carvacrol e o menor foi o 1,4 metanoazuleno. A adição de 1,4 % de OEO inibiu completamente a *E. coli* inoculada, diminuiu o crescimento do total de bactérias mesofílicas e retardou o processo de deterioração. A atividade OEO é atribuída principalmente ao seu principal componente, o carvacrol, que possui atividade antibacteriana. Os resultados indicam que o OEO pode ser aplicado para ajudar a prolongar o prazo de validade e a segurança de sururus *in natura*.

Palavras-chave: Conservante alimentar; compostos voláteis; *Origanum vulgare* L.; *Mytella charruana*; atividade antibacteriana.

* Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Coordenação de Ensino, Pesquisa e Extensão, Campus Abaetetuba, CEP 68440-000, Abaetetuba-PA, Brasil.

✉ prbgomes@yahoo.com.br

DOI: [10.21577/1984-6835.20190119](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190119)

Estudo da Composição Química e Aplicação do Óleo Essencial *Origanum vulgare* L como Agente Antibacteriano em Sururu (*Mytella charruana*) *in natura*

Paulo R. B. Gomes,^{a,*} Mariane S. Liston,^b Jeremias C. da Silva,^a Rayone W. S. de Oliveira,^b Hilton C. Louzeiro,^c Maria A. Fontenele,^d Maria L. de Paula,^e Adenilde R. Nascimento,^b Victor E. M. Filho^b

^a Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Coordenação de Ensino, Pesquisa e Extensão, Campus Abaetetuba, CEP 68440-000, Abaetetuba-PA, Brasil.

^b Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Tecnologia Química, Campus São Luís, CEP 65080-805, São Luís-MA, Brasil.

^c Universidade Federal do Maranhão, Coordenação de Licenciatura em Ciências Naturais, CEP 65200-000, Campus Pinheiro, Pinheiro-MA, Brasil.

^d Universidade Federal do Maranhão, Coordenação de Engenharia de Alimentos, Campus Avançado, CEP 65915-240, Imperatriz-MA, Brasil.

^e Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Farmácia, Campus São Luís, CEP 65080-805, São Luís-MA, Brasil.

* prbgomes@yahoo.com.br

Recebido em 27 de fevereiro de 2019. Aceito para publicação em 26 de agosto de 2019

1. Introdução
2. Parte Experimental
3. Resultados
4. Discussão
5. Conclusão

1. Introdução

A contaminação de carnes e peixes exige o desenvolvimento de metodologias que possam retardá-las ou inibi-las. Dentre os diversos métodos com essa finalidade, temos: conservantes químicos,¹ super-resfriamento,² alta pressão hidrostática,³

embalagem ativa,⁴ conservantes naturais, como quitosana,⁵ subprodutos de citros⁶ e nanopartículas.⁷ Cada uma das estratégias acima contribui na retenção de propriedades físico-químicas (pH, peróxidos, ácido tiobarbitúrico, nitrogênio básico volátil total, rancidez e textura), microbiológicas (contagem total viável) e sensorial (odor, sabor, cor, maciez),³ conforme citado por Patel.⁸

Dentre esses métodos, o conservante químico é o mais utilizado. No entanto, está comprovado a relação deste com o desenvolvimento de algumas doenças, tais como: toxicidade neural e tumorigenicidade,⁹ Transtorno de Deficit de Atenção com Hiperatividade,^{10,11} carcinomas,¹² doenças renais¹³ colorretais¹⁴ e pâncreas.¹⁴ Assim, é necessário o desenvolvimento de conservantes que sejam de baixo custo e menos nocivo ao ser humano. Nessa linha de raciocínio, temos os conservantes naturais.

Os conservantes naturais a base de óleos essenciais despertam interesse na busca de plantas. Isso é explicado por que a aplicação de óleos essenciais nos alimentos possui três vantagens, que são: prolongação da vida útil nas prateleiras, inibição do desenvolvimento de patógenos alimentar e redução da atividade tóxica.¹⁵ Assim, das diversas espécies de plantas com essa finalidade, destacamos o orégano (*Origanum vulgare* L). Pois além de possuir essas características, este óleo essencial é utilizado como conservante natural em pescados.

A ação desse óleo essencial como conservante natural em pescados é atribuída a sua atividade antibacteriana. Um estudo realizado por Pyrgotou e colaboradores¹⁶ mostraram que esse óleo a 0,2 % aumentou o tempo de armazenamento de filés de truta fresca, salgados e embalados por sete a oito dias. Durante o armazenamento, os autores observaram que a população de bactérias produtoras de sulfeto de hidrogênio diminuiu os valores de nitrogênio total e nitrato de triemetilamina voláteis

Mas é viável que se diminuirmos ainda mais a concentração do óleo, este continuará garantindo a conservação? A resposta é sim. O estudo realizado por Evangelista-Barreto e colaboradores¹⁷ mostraram que esse óleo inibiu o desenvolvimento de *Escherichia coli* na concentração de 0,08 %, enquanto na concentração de 0,16 % este foi mais efetivo no controle de bactérias psicotróficas cultiváveis.

Apesar dos recentes estudos do efeito desse óleo essencial sobre pescados,¹⁷⁻²²

observamos na literatura a ausência da aplicação desse óleo em sururu ou mexilhões (*Mytella charruana*). Esse molusco é proveniente das regiões litorâneas da América Central e do Sul, especialmente do Brasil,²³ e possui alto valor nutricional, o que garante fonte de renda e alimentos para boa parte da população do nordeste brasileiro.²⁴ Portanto, o desenvolvimento de uma metodologia a base de óleo essencial que possa conservá-lo por mais tempo é de suma importância. Nesse aspecto, determinamos a composição química e testamos ação conservante do óleo essencial do orégano em sururu (*Mytella charruana*) *in natura*.

2. Parte Experimental

2.1. Obtenção e extração do Óleo Essencial de Orégano (OEO)

Adquirimos as folhas de orégano orgânico desidratadas da empresa Arvoredo Brasil – Coopaflores, Turvo, Paraná, em maio de 2012 e verificamos que o certificado emitido pela empresa atestou que as amostras foliculares pertenciam à espécie *Origanum vulgare*. Em seguida, armazenamos essas amostras em embalagens plásticas de 1 kg, até o momento da extração.

Realizamos a extração a partir do processo de hidrodestilação, utilizando o aparelho extrator de Clevenger. Em cada extração, colocamos 220 gramas da planta desidratada em um balão de fundo redondo de 6000 mL com cerca de 2000 mL de água destilada e o aquecemos em uma manta elétrica que estava acoplado ao balão e este ao aparelho de Clevenger e a um condensador. No condensador, circulava água refrigerada a 10 °C por um banho termostático. Após três horas de destilação, recolhemos o óleo essencial do aparelho de Clevenger. Secamos o óleo com uma percolação de sulfato de sódio anidro e centrifugamos. Acondicionamos o óleo seco em ampolas de vidro âmbar e em seguida guardamos na geladeira (15 °C)

Determinamos o melhor tempo de extração a partir da relação do rendimento do óleo essencial em função do tempo. Para isso, utilizamos o mesmo sistema anterior de extração, com as mesmas condições, variando os tempos de extração: 30, 60, 90, 120 e 180 minutos. Ao aproximar-se de cada tempo pré-determinado, desligávamos a fonte geradora de calor, anotávamos e mediávamos o volume em mililitros do óleo extraído. Para o cálculo do rendimento de cada extração de óleo, calculamos na razão da massa de óleo essencial pela massa de planta em base livre de umidade. Determinamos a umidade das folhas de orégano de cada pacote adquirido, antes das extrações. Para essa determinação, utilizamos o analisador de umidade por infravermelho do fabricante Gehaka.

2.2. Caracterização física e química do óleo essencial

Para a caracterização das propriedades físico-químicas, realizamos as seguintes análises: Densidade a 25 °C, solubilidade em etanol a 70 e 90 %, índice de refração, cor e aparência.²⁵

Para a determinação química, utilizamos a análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Realizamos essa análise em cromatógrafo a gás acoplado a detector seletivo de massa – GC/MSD (Shimadzu, modelo QP5050A), usando uma coluna capilar BPX5 5 % (30 m x 0,25 mm x 25 µm), gás de arraste hélio, e uma taxa de fluxo de 2,5 mL/min, no modo de impacto de elétrons em modo split. O gradiente de temperatura usado foi: 60 °C (4 min) – 5 °C/ 2 min – 320 °C (2 min). A temperatura da interface foi mantida à 280 °C. Identificamos os compostos, comparando os espectros de massas obtidos com os das bibliotecas Wiley e Nist²⁶ e expressamos os teores dos mesmos em percentuais.

2.3. Avaliação da eficácia do óleo essencial de orégano quando aplicado como um conservante em sururu

Para a avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de orégano frente à *Escherichia coli* e bactérias mesófilas totais do sururu, realizamos um estudo do efeito do OE sobre a viabilidade das células microbianas após períodos de estocagem refrigerada. Também, realizamos as análises de pH e bases voláteis totais para avaliação do impacto na estabilidade físico-química. Em paralelo, preparamos controles sem adição do OE e utilizando-se método de conservação tradicional (congelamento), para efeito de comparação.

2.4. Teste de solubilização

Quando uma porção de óleo essencial é adicionada a um meio aquoso, uma fase oleosa separa-se da fase aquosa. A estabilização da solução de óleo essencial em caldo de meio de cultura, melhora suas propriedades antimicrobianas. Uma vantagem a mais de se estabilizar a solução é a redução da concentração requerida de óleo essencial, assim reduzindo também o aroma herbáceo. Isso amplia a perspectiva de se utilizar óleos essenciais como antimicrobianos em alimentos.²⁷

Realizamos testes prévios de solubilização do OE em água a partir de emulsificantes de grau alimentício: Tween 20 e Tween 80. Preparamos esses emulsificantes em tubos de ensaio com óleo essencial e água destilada na concentração de 40 µLmL⁻¹. Escolhemos uma concentração acima da máxima concentração a ser usada em todo experimento para que a solubilização fosse avaliada em uma condição mais crítica. Adicionamos diferentes quantidades dos emulsificantes em cada tubo, promovendo em seguida uma agitação vigorosa por um minuto com auxílio de um agitador de tubos do tipo vortex. Observamos a estabilidade

das emulsões obtidas nos tempos zero (imediatamente após a agitação), 10 minutos e 24 horas de acordo com a metodologia de solubilização proposta por Leite de Souza.²⁸

Aplicamos as concentrações das soluções no sururu e calculamos em função do teor de carvacrol (composto majoritário) do óleo essencial de orégano utilizado e da concentração mínima necessária desse componente para inibição da bactéria *E. coli*²⁹ (selecionamos para este trabalho concentrações de OEO que contessem o teor de carvacrol 10 e 20 vezes maior do que a Concentração Inibitória Mínima MIC (*traduzido do inglês* Concentração Inibitória Mínima) deste composto para a *E. coli*); Preparamos as soluções de óleo essencial a 0,7 % e 1,4 % através da diluição de uma solução mãe de 14 %. As mesmas foram preparadas em tubos de ensaio com água estéril e o tensoativo Tween 80 (30 mg mL⁻¹).

2.5. Determinação da atividade do OE frente à *Escherichia coli* em sururu

A matéria-prima utilizada como substrato para o crescimento da *E. coli* e avaliação da eficácia do OE de orégano como conservante foi o sururu. Adquirimos o mesmo, sem casca, na feira do bairro São Francisco de São Luís - MA. Diversas aquisições foram feitas para a realização de todos os testes, bem como suas repetições. Transportamos-as imediatamente para o laboratório, em caixa térmica e antes das análises, lavamos o sururu em água corrente por 10 minutos para eliminação de resíduos físicos, como pedaços de concha, algas e areia.

Aplicamos o OE, em diferentes concentrações às amostras de sururus previamente tratadas e inoculadas com *E. coli* e realizamos controles positivos (sururus contaminados sem OE) e um negativo (sururus não contaminados sem OE), que foram refrigerados. Também preparamos controles com um método de conservação tradicional, o congelamento.

A cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 utilizada nessa pesquisa foi fornecida pelo Laboratório de Microbiologia de Águas e Alimentos do Pavilhão Tecnológico da UFMA. Inicialmente as cepas foram estocadas em Ágar Triptona de Soja (TSA / Merck) 1 %. A bactéria foi transferida para crescimento em tubos de 1,0 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI / Merck) por 24 h à 35 °C. A pureza da cepa foi confirmada pela inoculação das células crescidas no caldo, através de alça de platina, para o ágar eosina azul de metileno (Ágar Emb / Himedia) incubado por 24 h à 35 °C. Todas as colônias deveriam apresentar coloração escura com brilho metálico. Selecionamos algumas colônias isoladas e transferimos para TSA inclinado e incubadas por 48 h à 35 °C. Em seguida, transferimos a massa de célula crescida em TSA com auxílio de uma alça de platina para tubos de Caldo BHI até atingir-se turbidez equivalente a 0,5 Mc Farland que equivale a uma carga de aproximadamente 108 UFC mL⁻¹³⁰.

Submetemos as amostras de sururu a um tratamento térmico em água fervente (10 minutos/100 °C) para eliminação de sua carga inicial de micro-organismos. Antes da inoculação das bactérias, retiramos uma amostra para confirmação da eliminação da contaminação bacteriana.³¹ Após o tratamento térmico, colocamos amostras de sururus (10 g) em frascos plásticos estéreis de 50 mL. Cada frasco recebeu 2 mL do inóculo de *E. coli* e 8 mL de solução de OEO ou 8 mL de água estéril, para obter-se concentração final de 0,7 % e 1,4 % (v v) e 0 % (controle), respectivamente. Esse volume foi estipulado no intuito de manter o sururu suficientemente imerso. Visando a comparação com um método convencional de conservação, preparamos amostras sem OEO que foram congeladas. Agitamos manualmente os frascos por 1 minuto para homogeneização do OEO adicionado e conduzimos o procedimento de maneira asséptica,^{28,32} refrigerando essas amostras a 4 °C ou congelamos a -15 °C para ser analisadas para contagem de *E. coli* por sete dias.

Para a contagem das células de *E. coli*, realizamos em cada tratamento o seguinte procedimento: pesamos em frascos estéreis 10 g da amostra e adicionamos 90 mL de solução salina estéril (0,85 % Cloreto de sódio), em seguida agitamos vigorosamente por 1 minuto. A solução (1,0 mL) foi diluída em série em tubos de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina estéril. Conforme a técnica *spread-plate*, 0,1 mL de cada diluição, de cada amostra, foi inoculado em placas de EMB ágar para contagem de *E. coli*. As placas foram incubadas por 24 h à 35 °C, e as colônias foram contadas após a incubação.³¹

2.6. Determinação da atividade do OE frente a bactérias mesófilas totais de sururu *in natura* e estabilidade físico-química

Aplicamos as soluções de OE às amostras de sururu *in natura* e preparamos controles sem OE e também controles usando um método de conservação tradicional, o congelamento. Colocamos 20 gramas das Amostras de sururus *in natura* em frascos plásticos estéreis de 50 mL. Cada frasco recebeu 20 mL de solução de concentração de 0,7 % e 1,4 % (v v) de OEO ou 20 mL de água estéril (controle). Visando a comparação com um método convencional de conservação, preparamos as amostras sem OEO que foram congeladas. Os frascos foram agitados manualmente por um minuto para homogeneização do OEO adicionado. Estas amostras foram refrigeradas (4 °C) ou congeladas (-15 °C) e analisadas para contagem de bactérias mesófilas totais, pH e bases voláteis totais durante 10 dias.

Para a contagem das células de bactérias mesófilas totais, realizamos o seguinte procedimento para cada tratamento: Pesamos 10 g da amostra em frascos estéreis contendo 90 mL de solução salina estéril (0,85 % Cloreto de sódio) e agitamos vigorosamente por 1 minuto. A solução (1,0 mL) foi diluída em série em tubos de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina estéril. Conforme a técnica *pour-plate*, 1,0 mL de

cada diluição, de cada amostra, foi inoculado em placas de Pétri que receberam o *Plate Count Ágar* (Pca / Merck). As placas foram incubadas por 48 h à 35 °C e as colônias foram contadas após a incubação.³¹ Determinamos o pH dos sururus conforme metodologia descrita no manual de Métodos de Análises de Pescados da Embrapa;³³ já para as Bases voláteis totais, realizamos em cada tratamento a homogeneização de 20 gramas de amostra em 60 mL de ácido tricloroacético 5 %. Filtramos a mistura em papel de filtro quantitativo para obtenção de um extrato claro. O nitrogênio proteico era precipitado. Com uma pipeta transferimos 10 mL do extrato para um tubo de micro Kjeldahl e adicionávamos 1,0 g de óxido de magnésio (alcalinizante) e 20 mL de água destilada. Destilamos por arraste a vapor e o produto era recolhido em 20 mL de ácido bórico a 4 % com indicador misto (verde de bromocresol e vermelho de metila). Amônia e aminas voláteis foram tituladas com solução de ácido sulfúrico 0,005 mol L⁻¹ padronizada até a viragem para coloração avermelhada.³⁴

2.7. Determinação da composição química do sururu

Por haver poucos dados na literatura a respeito do sururu e para auxiliar no entendimento das possíveis interações físico-químicas que pode haver entre o sururu e o óleo essencial aplicado, determinamos a composição centesimal do mesmo para umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos. Para a umidade, pesamos cinco gramas da amostra em capsulas de porcelana previamente tarada e aquecidas em estufa a 105 °C por três horas;³⁵ para a determinação das cinzas, pesamos aproximadamente três gramas da amostra em capsulas de porcelana previamente taradas. Em seguida a amostra foi carbonizada sobre o aquecimento brando da chama de um bico de Bunsen e posteriormente incinerada em uma mufla a 570 °C por quatro horas. As cápsulas foram

resfriadas em dessecador e pesadas; para a determinação de lipídios, realizamos a extração com solvente orgânico. Pesamos cinco gramas da amostra de sururu em cartucho de Soxhlet, o qual foi tampado com algodão. Colocamos o cartucho dentro de um extrator de Soxhlet e acoplamos a um balão de fundo chato previamente tarado a 105 °C. Em seguida, adicionamos o solvente hexano e conectamos o conjunto a um condensador de bolas. Realizamos a extração por aquecimento contínuo em chapa elétrica por seis horas. Após a extração removemos o cartucho, recuperamos o hexano, e o balão com o resíduo extraído foi levado para evaporação do resíduo de hexano a uma estufa a 105 °C por uma hora. O balão foi resfriado em dessecador e pesado;³⁵ determinamos a proteína pelo método micro-Kjeldahl, segundo proposto por Silva e Queiroz;³⁶ por fim, calculamos o teor de carboidrato pela diferença entre o total da amostra (100 %) e os teores de proteína, lipídios, umidade e cinza obtidos.³⁷

2.8. Análise estatística

Realizamos as análises microbiológicas em duplicata e as físico-químicas em triplicata. Submetemos os resultados à análise de variância (Anova) para fator duplo com repetição. Determinamos as diferenças entre os tratamentos das amostras aplicando-se o teste de comparação múltipla de Tukey. Diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1. Características físicas e química do Óleo Essencial do Orégano

Processamos uma massa de 4 kg de orégano desidratado em dezoito extrações por hidrodestilação, obtendo-se aproximadamente 39 mL de óleo essencial de orégano. O rendimento médio, em base livre de umidade, foi de 1,17 % \pm 0,298. Na figura 1, mostramos que o tempo para esse rendimento foi em 120 minutos e que este permaneceu constante até 180 minutos.

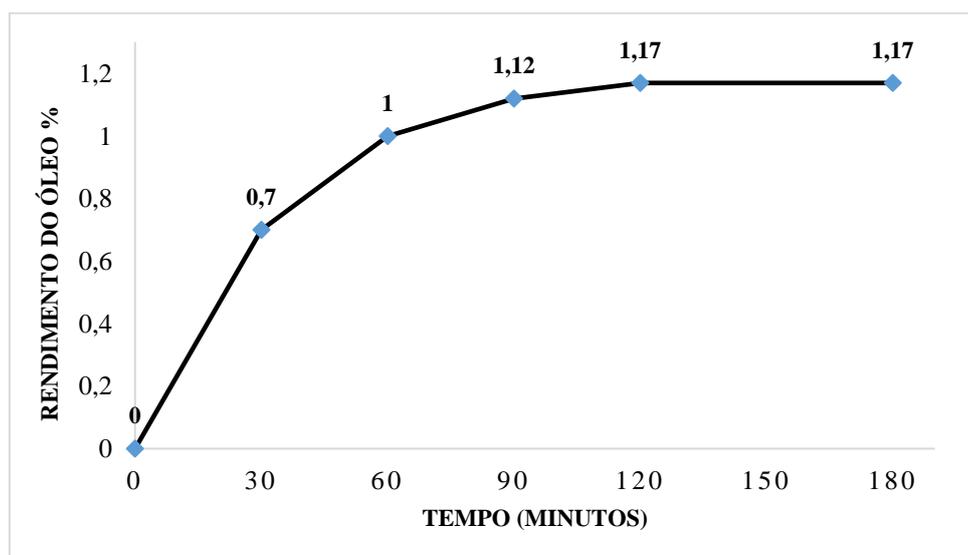


Figura 1. Cinética de extração para o óleo essencial do orégano

Na Tabela 1, apresentamos um resumo das características físico-químicas determinadas neste trabalho e comparamos esses resultados com os dados de referências bibliográficas. Em relação a solubilidade do

óleo, observamos que este é insolúvel em solução de etanol a 70 %, mas solúvel em solução de etanol a 90 % quando comparados na mesma proporção.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do óleo essencial de orégano e comparação com dados de referência

Propriedades	Resultados	Referências
Densidade (g mL ⁻¹)	0,938 ± 0,028	0,92 ³⁸
Índice de refração (20 °C)	1,495 ± 0,000	1,508 ²⁸
Solubilidade em álcool a 90 % (v/v)	01:01	Não disponível
Rendimento (%)	1,17 ± 0,298	1,3 ± 0,16 ³⁸
Cor	Amarelo	Amarelo ²⁸
Aparência	Límpido	Límpido ²⁸

O resultado do cromatograma mostrou 22 picos, indicando assim a existência de 22 compostos (Figura 1S). Identificamos esses compostos comparando-os com os dados da biblioteca Nist e Willey. Na tabela 2, mostramos os 22 componentes do óleo essencial com seus respectivos tempos de retenção, índice de retenção e porcentagem da área normalizada. Desses, temos os componentes majoritário e minoritário, que são, respectivamente, o carvacrol (45,74 %) e o 1,4 metanoazuleno (0,22 %).

3.2. Teste de solubilização

Nesse teste, observamos que ambos eram estáveis na concentração de 30 mg mL⁻¹ após a agitação. No entanto, após 10 minutos de repouso, a emulsão do tensoativo Tween 20 desprende gotículas de óleo na superfície da emulsão, enquanto a emulsão do tensoativo Tween 80 permaneceu estável durante esse período. Assim, escolhemos a solução do tensoativo Tween 80 para dar continuidade nos experimentos.

3.3 Atividade do óleo essencial frente à *Escherichia coli* em sururu

Apresentamos na tabela 3 o efeito antimicrobiano das soluções de óleo essencial do orégano (OEO) a 0,7 % e 1,4 % e do congelamento sob a *E. coli* inoculada em sururus, estocados por sete dias. Inoculamos todas as amostras com uma carga de aproximadamente 7,0 log de UFC g⁻¹ de *E. coli*. A partir da análise de variância de fator duplo com repetição (Anova), observamos que os tratamentos possuem diferenças significativas entre si. A aplicação da solução com 0,7 % de OEO provocou um efeito de redução da carga contaminante apenas no sétimo dia de estocagem (p<0,05), resultando em uma redução de apenas 0,53 log UFC g⁻¹ em relação ao controle; Já a adição da solução com 1,4 % de OEO resultou em um alto efeito inibitório sob a *E. coli*. Houve uma redução gradual da carga de bactérias, sendo que após o terceiro dia não houve crescimento de células viáveis nas placas. Amostras submetidas ao congelamento apresentaram queda significativa na contagem bacteriana a partir do segundo dia

de estocagem. No sétimo dia de estocagem houve a redução de 0,97 log UFC g⁻¹ em relação ao controle. Esse método foi mais eficaz do que a aplicação de solução a 0,7 %

de OEO, porém menos eficaz do que a aplicação de solução de 1,4 % de OEO (p<0,05).

Tabela 2. Compostos identificados na amostra de óleo essencial de orégano

Pico ¹	Compostos	TR ² (min.)	IR ³	%A ⁴
1	α-Felandreno	4.529	4.452	1,22
2	2-Pineno	4.750	4.618	0,83
3	Canfeno	5.274	5.202	0,79
4	β-Pineno	6.121	6.052	0,32
5	1-octen-3-ol	6.498	6.377	6,18
6	3-Octanona	6.593	6.552	0,43
7	α-terpineno	7.386	7.318	1,6
8	<i>m</i> -Cimeno	7.836	7.652	24,17
9	1,8-Cineol	7.965	7.893	0,71
10	γ-Terpineno	8.778	8.702	2,94
11	(Z)-β-Terpineol	9.348	9.277	0,43
12	α-Terpinoleno	10.308	10.235	0,77
13	Borneol	12.788	12.693	2,81
14	Terpineol-4	12.955	12.910	1,01
15	Timol metil éter	14.650	14.543	3,15
16	Carvacrol	16.894	16.602	45,74
17	Timol	16.982	16.952	0,69
18	trans-Cariofileno	19.665	19.585	1,16
19	α-humuleno	20.170	20.102	0,28
20	1,4-Metanoazuleno	21.577	21.510	0,22
21	β-Bisaboleno	22.027	21.910	4,22
22	(+)-espatulenol	24.014	23.943	0,33

Nota: ¹Número do pico pela ordem de eluição da coluna; ²Tempo de retenção dos compostos na coluna em minutos; ³Índice de retenção; ⁴%A: Porcentagem da área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos componentes na amostra

Tabela 3. Desenvolvimento da *E. coli* inoculada em sururus submetidos a diferentes tratamentos

Tratamento ^a	Tempo de estocagem (dias)						
	0	1	2	3	4	7	
1	7,00 ± 0,05 ^{Aa}	7,04 ± 0,23 ^{ACa}	7,23 ± 0 ^{Ca}	7,06 ± 0,08 ^{ACa}	6,78 ± 0,01 ^{Da}	5,73 ± 0,07 ^{Ba}	±
2	7,00 ± 0,05 ^{Aa}	6,79 ± 0,13 ^{ABa}	6,89 ± 0,09 ^{ABa}	6,78 ± 0,02 ^{ABa}	6,63 ± 0,17 ^{Ba}	5,20 ± 0 ^{Cc}	±
3	7,00 ± 0,05 ^{Aa}	2,85 ± 0 ^{Bb}	2,18 ± 0,21 ^{Cc}	0,00 ^b ± 0 ^{Dc}	0,00 ^b ± 0 ^{Dc}	0,00 ^b ± 0 ^{Dd}	±
4	7,00 ± 0,05 ^{Aa}	6,65 ± 0,07 ^{Ba}	6,22 ± 0,02 ^{Cb}	6,16 ± 0,11 ^{CDb}	5,93 ± 0,05 ^{Db}	4,76 ± 0,03 ^{Eb}	±

Valores expressos em Média ± DP log UFC g⁻¹. Diferentes letras significam diferença a 95 % (teste de Tukey - p<0,05), sendo a comparação feita entre letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas. ^a: 1: sem OEO; 2: solução com 0,7 % de OEO; 3: solução com 1,4 % de OEO; 4: sem OEO, congelado à -15 °C. ^b: menor do que o limite de detecção da análise (2 log UFC g⁻¹)

3.4. Atividade do óleo essencial frente às bactérias mesófilas totais de sururu in natura e estabilidade físico-química

Na tabela 4, apresentamos o efeito antimicrobiano das soluções de OEO a 0,7 % e 1,4 % e do congelamento sob a contagem de bactérias mesófilas em sururus *in natura*, estocados por 10 dias. Através da análise de variância (Anova) realizada, observamos que os tratamentos possuem diferenças significativas entre si. Amostras refrigeradas que não receberam solução de OEO apresentaram aumento de 2,12 log UFC g⁻¹, na contagem de bactérias mesófilas durante o período de estocagem. A aplicação de solução a 0,7 % de OEO resultou em um aumento mais discreto da carga bacteriana ao longo do período de estocagem, sendo

que essas amostras apresentaram contagem de bactérias mesófilas totais 1,24 log UFC g⁻¹ menor do que o controle. Amostras que receberam solução de 1,4 % de OEO apresentaram uma queda na contagem de bactérias mesófilas no segundo dia, porém nos dias seguintes as mesmas ultrapassaram a contagem inicial, apresentando aumento de 0,66 log UFC g⁻¹ ao final dos 10 dias de estocagem em relação à contagem inicial e redução de 1,46 log UFC g⁻¹ em relação ao controle. O congelamento foi o tratamento mais eficaz no controle da contagem de bactérias mesófilas, pois apesar dos aumentos de 0,46 log UFC/g e 0,42 log UFC/g observados no 2º e 4º dias de estocagem, após o 6º dia, a contagem voltou a ficar igual a contagem inicial (p<0,05) e 1,96 log UFC g⁻¹ menor do que o controle.

Tabela 4. Desenvolvimento das bactérias mesófilas totais em sururus *in natura* submetidos a diferentes tratamentos

Tratamento ^a	Tempo de estocagem (dias)					
	0	2	4	6	8	10
1	6,10 ± 0,05 ^{Aa}	7,34 ± 0,10 ^{Ba}	7,72 ± 0,01 ^{BCa}	± 7,89 ± 0,09 ^{BCa}	± 8,20 ± 0,24 ^{Ca}	8,22 ± 0,35 ^{Ca}
2	6,10 ± 0,05 ^{Aa}	6,72 ± 0,04 ^{Bb}	6,92 ± 0,05 ^{Cb}	± 7,17 ± 0,04 ^{Cb}	± 7,31 ± 0,01 ^{Cc}	7,34 ± 0,23 ^{Cac}
3	6,10 ± 0,05 ^{Aa}	5,48 ± 0 ^{Bc}	6,23 ± 0,02 ^{ACc}	± 6,65 ± 0,03 ^{CDc}	6,67 ± 0,20 ^{CDbc}	± 6,76 ± 0,19 ^{Dbc}
4	6,10 ± 0,05 ^{Aa}	6,56 ± 0,11 ^{Bb}	6,52 ± 0 ^{Bd}	6,10 ± 0,02 ^{Ad}	± 6,22 ± 0,09 ^{Ab}	± 6,26 ± 0,04 ^{Ab}

Valores expressos em Média ± DP log UFC/g. Diferentes letras significam diferença a 95 % (teste de Tukey - $p < 0,05$), sendo a comparação feita entre letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas. ^a: 1: sem OEO; 2: solução com 0,7 % de OEO; 3: solução com 1,4 % de OEO; 4: sem OEO, congelado à -15 °C

Apesar da aplicação da solução de OEO não ter sido capaz de reduzir a contagem de bactérias mesófilas totais, a solução de 1,4 % de OEO impediu o aumento dessas bactérias.

O efeito das soluções de OEO a 0,7 % e 1,4 % e do congelamento sob o pH e o teor de BVT em sururus *in natura*, estocados por 10 dias, mostramos na Tabela 5 e Tabela 6, respectivamente. Sururus refrigeradas que não receberam solução de OEO apresentaram uma queda significativa ($p < 0,05$) do pH e um aumento também significativo ($p < 0,05$) do teor de BVT. Sendo o limite máximo aceitável para o teor de BVT em pescados 30 mg/100 gramas³⁹, entre o sexto e oitavo dia de estocagem essas amostras de sururu tornaram-se inaceitáveis. Amostras que receberam solução de OEO 0,7 % apresentaram alterações mais discretas, porém não diferiram significativamente ($p < 0,05$) de amostras que

não receberam solução de OEO. Amostras congeladas e as que receberam solução de OEO 1,4 % apresentaram redução do pH significativamente menor do que as amostras que não receberam solução de OEO. Apesar de a redução de pH ter sido maior nas amostras que receberam solução de OEO 1,4 % do que a ocorrida nas amostras congeladas, estes tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si. O mesmo ocorreu em relação ao teor de BVT para sururus que receberam solução de OEO 1,4 %, o aumento foi pequeno, assim como nas amostras congeladas e foi significativamente menor do aumento registrado para amostras que não receberam solução de OEO. Amostras congeladas apresentaram maior estabilidade dos parâmetros analisados, não sendo observadas alterações significativas ao longo dos 10 dias de estocagem.

Tabela 5. Gráfico do pH de sururus *in natura* submetidos a diferentes tratamentos

Tratamento ^a	Tempo de estocagem (dias)					
	0	2	4	6	8	10
1	7,50 0,14 ^{Aa}	± 7,17 ± 0,15 ^{Ba}	7,05 0,14 ^{B^{Da}}	± 6,84 0,03 ^{CDa}	± 6,77 0,07 ^{CDa}	± 6,72 ± 0,04 ^{Ca}
2	7,50 0,14 ^{Aa}	± 7,30 0,17 ^{ABa}	± 7,15 0,19 ^{ABa}	± 7,03 0,20 ^{ABab}	± 6,99 0,23 ^{ABab}	± 6,97 0,22 ^{Bab}
3	7,50 0,14 ^{Aa}	± 7,42 0,11 ^{Ab}	± 7,30 0,08 ^{ABa}	± 7,18 0,04 ^{Bb}	± 7,16 0,08 ^{Bb}	± 7,13 0,11 ^{Bb}
4	7,50 0,14 ^{Aa}	± 7,41 0,13 ^{Aa}	± 7,40 0,14 ^{Aa}	± 7,32 0,12 ^{Ab}	± 7,26 0,07 ^{Ab}	± 7,21 0,03 ^{Ab}

Valores expressos em pH Médio ± DP. Diferentes letras significam diferença a 95 % (teste de Tukey - $p < 0,05$), sendo a comparação feita entre letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas. ^a: 1:sem OEO; 2: solução com 0,7 % de OEO; 3: solução com 1,4 % de OEO; 4: sem OEO, congelado à -15 °C

Tabela 6. Teor de BVT em sururus *in natura* submetidos a diferentes tratamentos

Tratamento ^a	Tempo de estocagem (dias)					
	0	2	4	6	8	10
1	12,36 3,63 ^{Aa}	± 22,79 4,18 ^{ABa}	± 25,44 3,75 ^{ABa}	± 29,84 7,51 ^{ABa}	± 32,29 8,43 ^{Ba}	± 34,78 7,96 ^{Ba}
2	12,36 3,63 ^{Aa}	± 16,21 2,20 ^{Aab}	± 17,73 3,22 ^{Aab}	± 20,08 4,00 ^{Aab}	± 23,50 6,51 ^{Aa}	± 24,56 6,66 ^{ABab}
3	12,36 3,63 ^{Aa}	± 13,71 2,91 ^{ABb}	± 16,09 2,88 ^{ABb}	± 17,38 2,16 ^{ABb}	± 19,98 2,58 ^{ABa}	± 20,63 2,98 ^{Bb}
4	12,36 3,63 ^{Aa}	± 15,00 3,05 ^{Aab}	± 15,87 2,94 ^{Ab}	± 16,26 2,65 ^{Ab}	± 18,03 3,06 ^{Aa}	± 18,83 2,39 ^{Ab}

Valores expressos em Média ± DP mg N/100 g. Diferentes letras significam diferença a 95 % (teste de Tukey - $p < 0,05$), sendo a comparação feita entre letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas. ^a: 1:sem OEO; 2: solução com 0,7 % de OEO; 3: solução com 1,4 % de OEO; 4: sem OEO, congelado à -15 °C

3.5. Composição química do sururu (*Mytella charruana*)

Apresentamos na tabela 7 os teores médios encontrados de umidade, proteína,

cinzas, lipídios e carboidratos do sururu. Calculamos o intervalo de confiança a 95 % e verificamos que esses resultados foram concordantes com o estudo realizado por Lemos (1988).⁴⁰

Tabela 7. Composição química do sururu fresco em porcentagem

Componente	Teor médio* (%)	Referência (Lemos, 1988)
Umidade	70,68 ± 0,258	76,67
Proteína	24,72 ± 0,539	20,05
Cinzas	2,74 ± 0,137	3,19
Lipídios	1,35 ± 0,300	0,99
Carboidratos	0,51**	Não determinado

* Média ± IC / ** IC não calculado por que o teor de carboidrato é determinado teoricamente

4. Discussão

Nesse estudo, descrevemos as características físicas e químicas do óleo essencial do orégano antes de testá-lo como conservante no sururu. Ao testá-lo, o óleo essencial inibiu o desenvolvimento da bactéria alimentar *Escherichia coli*, confirmando assim a atividade antibacteriana. Assim, com os resultados desse estudo, abrimos o leque de estudos a respeito dos métodos de conservação em um alimento muito conhecido por habitantes da região litorânea da América Central e do Sul,²³ devido ao seu inestimável valor nutricional.

A partir dos estudos cinéticos, constatamos nesse trabalho que o melhor tempo foi em 120 minutos. De acordo com Mouchrek Filho,⁴¹ conforme citado por Gomes e colaboradores,⁴² uma destilação rápida conduz a um produto contendo constituintes mais voláteis, porém destituído das melhores características; ao contrário, uma extração prolongada encarece o produto e também pode sobrecarregá-lo de compostos de aromas indesejáveis.⁴³ Logo, os melhores rendimentos são obtidos, geralmente, entre 180 e 300 minutos.^{42, 44-46}

A partir disso, podemos identificar quais constituintes terão o maior rendimento quando empregamos a técnica cromatográfica gasosa acoplada ao espectrômetro de massa. Dessa análise, identificamos o carvacrol como componente

majoritário. Embora o carvacrol seja o constituinte majoritário predominante na maioria dos estudos de extração do óleo essencial do orégano,⁴⁷⁻⁴⁹ outros estudos revelam a existência de outros constituintes que variam com a origem. O estudo realizado por Busatta³⁸ mostrou que 4-terpineol esteve em maior concentração no óleo essencial do *O. vulgare* de origem chilena; já no estudo realizado por Sahin e colaboradores⁵⁰ mostrou o cariofileno como componente majoritário no OEO da Turquia, enquanto Sartoratto e colaboradores⁵¹ encontraram o timol como majoritário de OE de *O. vulgare* brasileiro.

Além das diferenças das predominâncias do componente majoritário do óleo essencial do orégano, observamos na literatura que há diferenças nas quantidades desses componentes no óleo. O estudo realizado por Kokkini e colaboradores⁵² mostrou que plantas de diferentes regiões da Grécia possuíam o teor de carvacrol variando de 2,4 a 69,6 %, timol de 0,2 a 42,8 % e p-cimeno de 17,3 a 51,3 %. Essas variações são explicadas a partir das condições ambientais como altitude e disponibilidade de água,⁵³ estação do ano,⁵⁴ estágio fenológico da planta,⁵⁵ do tipo de extração,⁵⁶ entre outros fatores. Logo, a presença do carvacrol ou a de seu isômero, o timol, é bastante comum, assim como observamos no óleo essencial desse trabalho.

Com a identificação do componente majoritário do óleo essencial do orégano, verificamos que este possui baixa atividade inibitória na concentração de 0,7 % e alta na

concentração de 1,4 % frente a *E. coli* no sururu. Já os parâmetros físico-químicos, pH e BVT demonstraram que a aplicação de solução de OEO a 1,4 % foi capaz de retardar o processo de deterioração. Entendemos que esse processo é provocado por bactérias deteriorantes específicas, como *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Brochothrix thermosphacta* e bactérias lácticas, que se desenvolvem mais rapidamente do que as demais bactérias, produzindo metabólitos responsáveis pela rejeição sensorial do produto.⁵⁷ Assim, o OEO inibiu tais bactérias, mesmo não sendo capaz de reduzir a contagem de bactérias de mesófilas totais.

Considerando a diversidade de componentes presentes em um OE, sua atividade não deve ser atribuída a apenas um mecanismo de ação. Mesmo um único componente, como o carvacrol, composto majoritário do OE estudado, ou seu isômero timol, possuem diversas formas de ação já elucidadas. O carvacrol e o timol são capazes de desintegrar a membrana externa de bactérias gram negativas.⁵⁸ Além disso, sabemos que o carvacrol provoca o esgotamento da reserva intracelular de ATP (trifosfato de adenosina) e aumenta a permeabilidade da membrana citoplasmática para cátions, o que compromete processos essenciais da célula, causando a morte da bactéria.⁵⁹

Medidas da atividade antimicrobiana de compostos similares ao carvacrol mostraram que o grupo hidroxila deste composto e a presença de um sistema de deslocalização de elétrons são importantes para sua atividade. Dessa forma, o carvacrol desestabiliza a membrana citoplasmática de modo a atuar como um permutador de prótons, o que resulta na redução de pH através da membrana citoplasmática, e consequentemente o colapso da força motriz dos prótons e o esgotamento da reserva de ATP, o que eventualmente leva a célula à morte.⁶⁰

Os dados da composição química do sururu mostram possíveis interações entre o

alimento e o OE aplicado. Se o alimento tem alto teor de lipídio, o OE se dissolve na fase lipídica do alimento, tornando-se menos disponível para atuar contra as bactérias presentes na fase aquosa,³² portanto neste aspecto o sururu é beneficiado, pois possui apenas 1,35 % de gordura. Se este possui alto teor de proteínas, esta acaba protegendo as bactérias contra os efeitos do óleo.⁶¹ No entanto, o estudo realizado por⁶² mostraram a limitação do OE contra *Bacillus cereus* em leite na reação do carvacrol com proteínas. Porém, sabemos que os OEs podem ser mais efetivos contra patógenos de origem alimentar quando aplicados em meios com alto teor de proteína.⁶³ Dessa forma o sururu sofre mais com os efeitos negativos de suas características em relação à eficácia da ação do OEO contra as bactérias, haja vista a necessidade de aplicação de uma concentração bastante alta de OEO, em relação à MIC, para a obtenção de resultados satisfatórios. Este fato sugere que o uso de outros métodos, como a redução do pH, em conjunto com a aplicação do OE possibilite o uso de concentrações menores.

A aplicação de OEO ao sururu traz dois impactos importantes para o aspecto sensorial. Um consiste na redução da perceptibilidade da presença do óleo essencial quando cozido antes do consumo⁶⁴ e o outro na relação inversa da aceitabilidade desse produto com a concentração do óleo essencial. Estudos mostraram que concentrações próximas ou acima de 1 % são perceptíveis a provadores treinados e prejudicam a aceitação do produto⁶⁵⁻⁶⁷ apesar de que, ao longo da vida de prateleira do alimento, a presença do OE afeta positivamente a qualidade sensorial do alimento por retardar o processo de deterioração.⁶⁴ Por isso a aplicação do OEO conjugada à métodos de conservação coadjuvantes, como redução de pH, adição de NaCl, embalagem com atmosfera modificada ou mesmo o congelamento é sugerida visando a aplicação de concentrações menores de OEO, o que resultaria em maior período de estabilidade e

menor impacto na qualidade sensorial do sururu.

5. Conclusão

Determinamos as características físicas e química do óleo essencial do óregano e a atividade antibacteriana em sururu (*Mytella charruana*) in natura. Da análise físico-química, constatamos similaridades do resultado do nosso estudo com os da literatura. Já a análise química, identificamos vinte e dois compostos, no qual o majoritário foi o carvacrol e o minoritário foi o 1,4 metanoazuleno. No estudo da atividade antibacteriana, constatamos que o óleo essencial extraído do óregano inibe o processo de deterioração do sururu, sendo o mesmo uma alternativa para a conservação in natura.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPQ e a FAPEMA por financiarem esta pesquisa.

Referências Bibliográficas

- ¹ Hecke, T. V.; Bussche, J. V.; Vanhaecke, L.; Vossen, E.; Camp, J. V.; Smet, S. D. Nitrite Curing of Chicken, Pork, and Beef Inhibits Oxidation but Does Not Affect N-Nitroso Compound (NOC)-Specific DNA Adduct Formation during in Vitro Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *6*, 1980. [CrossRef]
- ² Cyprian, O.; Lauzon, H. L.; Jóhannsson, R.; Sveinsdóttir, K.; Arason, S.; Martinsdóttir, E. Shelf life of air and modified atmosphere-packaged fresh tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets stored under chilled and superchilled conditions. *Food science & nutrition* **2013**, *1*, 130. [CrossRef]
- ³ Feng, L.; Jiang, T.; Wang, Y.; Li, J. Effects of tea polyphenol coating combined with ozone water washing on the storage quality of black sea bream (*Sparus macrocephalus*). *Food chemistry* **2012**, *135*, 2915. [CrossRef]
- ⁴ Barbosa-Pereira, L.; Aurrekoetxea, G. P.; Angulo, I.; Paseiro-Losada, P.; Cruz, J. M. Development of new active packaging films coated with natural phenolic compounds to improve the oxidative stability of beef. *Meat science* **2014**, *97*, 249. [CrossRef]
- ⁵ Darmadji, P.; Izumimoto, M. Effect of chitosan in meat preservation. *Meat science* **1994**, *38*, 243. [CrossRef]
- ⁶ Viuda-Martos, M.; Fernández-López, J.; Sayas-Barbera, E.; Sendra, E.; Navarro, C.; Pérez-Álvarez, J. Citrus co-products as technological strategy to reduce residual nitrite content in meat products. *Journal of food science* **2009**, *74*, R93. [CrossRef]
- ⁷ Xie, Y.; He, Y.; Irwin, P. L.; Jin, T.; Shi, X. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and environmental microbiology* **2011**, *77*, 2325. [CrossRef]
- ⁸ Patel, S. Plant essential oils and allied volatile fractions as multifunctional additives in meat and fish-based food products: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2015**, *32*, 1049. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹ Parke, D.; Lewis, D. Safety aspects of food preservatives. *Food Additives & Contaminants* **1992**, *9*, 561. [CrossRef]
- ¹⁰ Feingold, B. F. The role of diet in behaviour. *Ecology of disease* **1982**, *1*, 153. [PubMed]
- ¹¹ Bateman, B.; Warner, J. O.; Hutchinson, E.; Dean, T.; Rowlandson, P.; Gant, C.; Grundy, J.; Fitzgerald, C.; Stevenson, J. The effects of a double blind, placebo controlled, artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. *Archives of disease in childhood* **2004**, *89*, 506. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Aschebrook-Kilfoy, B.; Ward, M. H.; Gierach, G. L.; Schatzkin, A.; Hollenbeck, A.

- R.; Sinha, R.; Cross, A. J. Epithelial ovarian cancer and exposure to dietary nitrate and nitrite in the NIH-AARP Diet and Health Study. *European Journal of Cancer Prevention* **2012**, *21*, 65. [CrossRef] [PubMed]
- ¹³ Dellavalle, C.; Daniel, C.; Aschebrook-Kilfoy, B.; Hollenbeck, A.; Cross, A.; Sinha, R.; Ward, M. Dietary intake of nitrate and nitrite and risk of renal cell carcinoma in the NIH-AARP Diet and Health Study. *British journal of cancer* **2013**, *108*, 205. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ DellaValle, C. T.; Xiao, Q.; Yang, G.; Shu, X.-O.; Aschebrook-Kilfoy, B.; Zheng, W.; Lan Li, H.; Ji, B.; Rothman, N.; Chow, W. Dietary nitrate and nitrite intake and risk of colorectal cancer in the Shanghai Women's Health Study. *International journal of cancer* **2014**, *134*, 2917. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁵ Del Nobile, M. A.; Lucera, A.; Costa, C.; Conte, A. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in microbiology* **2012**, *3*, 287. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Pyrgotou, N.; Gitrakou, V.; Ntzimani, A.; Savvaidis, I. N. Quality assessment of salted, modified atmosphere packaged rainbow trout under treatment with oregano essential oil. *Journal of food science* **2010**, *75*, M406. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁷ Evangelista-Barreto, N. S.; Pedroso Costa Junior, P. S.; Vieira, B. B. Control of psychrotrophic bacteria and *Escherichia coli* in frescal type fish sausage using oregano essential oil. *Boletim Do Instituto De Pesca* **2018**, *44*, 68. [CrossRef]
- ¹⁸ Makri, M. Effect of oregano and rosemary essential oils on lipid oxidation of stored frozen minced gilthead sea bream muscle. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* **2013**, *8*, 67. [CrossRef]
- ¹⁹ Vatavali, K.; Karakosta, L.; Nathanailides, C.; Georgantelis, D.; Kontominas, M. Combined effect of chitosan and oregano essential oil dip on the microbiological, chemical, and sensory attributes of red porgy (*Pagrus pagrus*) stored in ice. *Food and Bioprocess Technology* **2013**, *6*, 3510. [CrossRef]
- ²⁰ Javidi, Z.; Hosseini, S. F.; Rezaei, M. Development of flexible bactericidal films based on poly (lactic acid) and essential oil and its effectiveness to reduce microbial growth of refrigerated rainbow trout. *LWT-Food Science and Technology* **2016**, *72*, 251. [CrossRef]
- ²¹ Sanjuás-Rey, M.; Pourashouri, P.; Barros-Velázquez, J.; Aubourg, S. P. Effect of oregano and thyme essential oils on the microbiological and chemical quality of refrigerated (4 C) ready-to-eat squid rings. *International journal of food science & technology* **2012**, *47*, 1439. [CrossRef]
- ²² Mexis, S.; Chouliara, E.; Kontominas, M. Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4 C. *Food microbiology* **2009**, *26*, 598. [CrossRef]
- ²³ Maioli, O. L. G.; Rodrigues, K. C.; Knoppers, B. A.; Azevedo, D. A. Polycyclic aromatic and aliphatic hydrocarbons in *Mytella charruana*, a bivalve mollusk from Mundaú Lagoon, Brazil. *Microchemical Journal* **2010**, *96*, 172. [CrossRef]
- ²⁴ Tamano, L. T. O.; Araujo, D. M.; de Lima, B. B. C.; da Silva, F. N. F.; da Silva, J. Socioeconomia e saúde dos pescadores de *Mytella falcata* da Lagoa Mundaú, Maceió-AL. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas* **2015**, *10*, 699. [CrossRef]
- ²⁵ Lutz, O. A. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Disponível em <<http://www.ial.sp.gov.br/ial/publicacoes/livros/metodos-fisico-quimicos-para-analise-de-alimentos>>. Acesso em: 24 fevereiro 2018.
- ²⁶ National Institute of Standards and Technology; *Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH)*, 2008. [Link]
- ²⁷ Burt, S. A.; *Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food*, Utrecht University: Utrecht, 2007. [CrossRef]

- ²⁸ de Souza, E. L.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2006. [Link]
- ²⁹ Gutiérrez-Larraínzar, M.; Rúa, J.; Caro, I.; de Castro, C.; de Arriaga, D.; García-Armesto, M. R.; del Valle, P. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control* **2012**, *26*, 555. [CrossRef]
- ³⁰ Nascimento, A. R.; Carvalho, E. P.; Neto, M. A. de A. F.; Martins, A. G. L. A.; Vieira, R. H. S. dos F. Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a bactérias isoladas de sururu, *Mytella falcata*. *Arquivos de Ciências do Mar* **2007**, *40*, 47. [CrossRef]
- ³¹ Vanderzant, C.; Splittstoesser, D. F. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, American Public Health Association: Washington D.C., 1995.
- ³² Mejlholm, O.; Dalgaard, P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*. **2002**, *34*, 27. [CrossRef] [PubMed]
- ³³ Sítio do Ministério da Agricultura e Abastecimento. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/663797/metodos-para-analise-de-pescados>>. Acesso em: 24 fevereiro 2018.
- ³⁴ Sítio do Ministério da Agricultura e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.consultaesic.cgu.gov.br/busca/dados/Lists/Pedido/Attachments/470907/RESPOSTA PEDIDO Instrucao%20Normativa%20SDA-MAPA%2020%20de%2021.7.1999.pdf>>. Acesso em: 24 fevereiro 2018.
- ³⁵ Lutz, O. A. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Disponível em <<http://www.ial.sp.gov.br/ial/publicacoes/livros/metodos-fisico-quimicos-para-analise-de-alimentos>>. Acesso em: 24 fevereiro 2018.
- ³⁶ Silva, D.; Queiroz, A.; *Análise de alimentos:(métodos químicos e biológicos)*, Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, 1981.
- ³⁷ Sítio do Ministério da Agricultura e Abastecimento. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/arquivos-metodos-da-area-poa-iaq/it-poa-248-rev03-determinacao-de-amido-e-carboidratos-totais-em-produtos-de-origem-animal-por-espectrofotometria-uv-vis.pdf>>. Acesso em: 20 abril 2015.
- ³⁸ Busatta, C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil, 2006.[Link]
- ³⁹ Sítio do Ministério da Agricultura e Abastecimento. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-185-de-13-05-1997,670.html>>. Acesso em: 14 de janeiro 2015.
- ⁴⁰ Lemos, L. C.; *Enlatamento do Sururu (Mytella falcata d'Orbigny 1846)*, EdUfma: São Luís, 1988.
- ⁴¹ Mouchrek Filho, V. E.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2000.
- ⁴² Gomes, P.; Silva, A.; Pinheiro, H.; Carvalho, L.; Lima, H.; Silva, E.; Silva, R.; Louzeiro, C.; Oliveira, M.; Filho, VEM. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do Zingiber officinale Roscoe (gingibre) frente ao mosquito *Aedes aegypti*. *Revista brasileira de plantas medicinais* **2016**, *18*, 597. [CrossRef]
- ⁴³ Chaar, J. da S.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2000.[Link]
- ⁴⁴ Barros Gomes, P. R.; Mouchrek Filho, V. E.; Ferreira Rabêlo, W.; Albuquerque do Nascimento, A.; Costa Louzeiro, H.; da Silva Lyra, W.; Fontenele, M. A. Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). *Revista Colombiana de Ciências Químico - Farmacéuticas* **2018**, *47*, 37. [CrossRef]
- ⁴⁵ Gomes, P. R. B.; De Oliveira, R. W. S.; Mouchrek Filho, V. E.; Do Nascimento, A. A.; Everton, A. P.; Louzeiro, H. C.; Reis, J. B.; Fontenele, M. A. Activity larvicide of the essential oil *Syzygium aromaticum* (carnival-of-India) in front of the mosquito *Aedes*

- aegypti (Linnaeus, 1762). *Periodico Tche Quimica*, **2018**, *15*,29. [Link]
- ⁴⁶ Gomes, P. R. B.; Silva, A. L. S.; Mouchrek, V. E.; Mouchrek, A. N.; Everton, P. C. Avaliação físico-química do óleo essencial Zingiber officinale Roscoe (Gengibre). *Revista Cubana de Farmacia* **2016**, *50*. [Link]
- ⁴⁷ Baricevic, D.; Bartol, T.; *The biological/pharmacological activity of the Origanum Genus. Oregano*, Taylor&Francis: London, 2002.
- ⁴⁸ Sivropoulou, A.; Papanikolaou, E.; Nikolaou, C.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, **1996**, *44*, 1202. [Link]
- ⁴⁹ D'Antuono, L. F.; Galletti, G. C.; Bocchini, P. Variability of Essential Oil Content and Composition of Origanum vulgare L. Populations from a North Mediterranean Area (Liguria Region, Northern Italy). *Annals of Botany* **2000**, *86*, 471. [CrossRef]
- ⁵⁰ Şahin, F.; Güllüce, M.; Daferera, D.; Sökmen, A.; Sökmen, M.; Polissiou, M.; Agar, G.; Özer, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of Origanum vulgare ssp. vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food control* **2004**, *15*, 549. [CrossRef]
- ⁵¹ Sartoratto, A.; Machado, A. L. M.; Delarmelina, C.; Figueira, G. M.; Duarte, M. C. T.; Rehder, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* **2004**, *35*, 275. [CrossRef]
- ⁵² Kokkini, S.; Karousou, R.; Dardioti, A.; Krigas, N.; Lanaras, T. Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 883. [CrossRef]
- ⁵³ Russo, A.; Formisano, C.; Rigano, D.; Senatore, F.; Delfino, S.; Cardile, V.; Rosselli, S.; Bruno, M. Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (Salvia officinalis L.) grown in different environmental conditions. *Food and Chemical Toxicology* **2013**, *55*, 42. [PubMed]
- ⁵⁴ Hussain, A. I.; Anwar, F.; Sherazi, S. T. H.; Przybylski, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (Ocimum basilicum) essential oils depends on seasonal variations. *Food chemistry* **2008**, *108*, 986. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁵ Jordán, M. J.; Lax, V.; Rota, M. C.; Lorán, S.; Sotomayor, J. A. Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of Rosmarinus officinalis L essential oil and its polyphenolic extract. *Industrial crops and products* **2013**, *48*, 144. [CrossRef]
- ⁵⁶ Gamiz-Gracia, L.; De Castro, M. L. Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta* **2000**, *51*, 1179. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁷ Dalgaard, P.; *Freshness, quality and safety in seafoods* Teagasc, The National Food Centre: Dublin, 2000.
- ⁵⁸ Helander, I. M.; Alakomi, H.-L.; Latva-Kala, K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E. J.; Gorris, L. G.; von Wright, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry* **1998**, *46*, 3590. [CrossRef]
- ⁵⁹ Ultee, A.; Kets, E.; Smid, E. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus. *Applied and environmental microbiology* **1999**, *65*, 4606. [PubMed]
- ⁶⁰ Ultee, A.; Bennik, M. H. J.; Moezelaar, R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen Bacillus cereus. *Applied Environmental Microbiology* **2002**, *68*, 1561. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶¹ Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology* **2004**, *94*, 223. [CrossRef] [PubMed]

- ⁶² Pol, I. E.; Mastwujk, H. C.; Slump, R. A.; Popa, M. E.; Smid, E. J. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment, and carvacrol. *Journal of Food Protection* **2001**, *64*, 1012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶³ Gutierrez, J.; Barry-Ryan, C.; Bourke, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology* **2008**, *124*, 91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁴ Skandamis, P. N.; Nychas, G. J. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology* **2001**, *91*, 1011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁵ Solomakos, N.; Govaris, A.; Koidis, P.; Botsoglou, N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology* **2008**, *25*, 120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁶ Busatta, C.; Vidal, R. S.; Popiolski, A. S.; Mossi, A. J.; Dariva, C.; Rodrigues, M. R. A.; Corazza, F. C.; Corazza, M. L.; Vladimir Oliveira, J.; Cansian, R. L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology* **2008**, *25*, 207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁷ Ouattara, B.; Sabato, S.; Lacroix, M. Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp (*Penaeus* spp.). *International Journal of Food Microbiology* **2001**, *68*, 1. [[CrossRef](#)]