



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS (PPGCTA)

**Conservação e condimentação de alimentos por *Ocimum gratissimum* L.
("alfavacão", "alfavaca", "alfavaca-cravo") – Labiatae (Lamiaceae).**

Marcelo Gonzalez Passos

Porto Alegre, Brasil
Fevereiro 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS (PPGCTA)

Marcelo Gonzalez Passos
(Engenheiro de Alimentos/UFRGS)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos como um dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Maria Wiest

Co-orientador: Dra. Heloisa Helena Chaves
Carvalho

Porto Alegre
Fevereiro 2008

Marcelo Gonzalez Passos
(Engenheiro de Alimentos/UFRGS)

DISSERTAÇÃO

**Conservação e condimentação de alimentos por *Ocimum gratissimum* L.
("alfavacão", "alfavaca", "alfavaca-cravo") – Labiatae (Lamiaceae).**

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:...../...../.....
Pela Comissão Examinadora:

Homologada em:/...../.....
Por:

Prof.Dr.Jose Maria Wiest
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Erna Vogt de Jong
Coordenador do Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos (PPGCTA)

Dra.Heloisa Helena Chaves Carvalho
Co-orientadora – ICTA/UFRGS

Profa.Dra. Isa Beatris Noll
PPCTA/UFRGS

Prof.Dra.Ingrid B. Inchausti de Barros
Faculdade de Agronomia/UFRGS

ADRIANO BRANDELI
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos. ICTA/UFRGS

Prof.Dr. Guiomar Pedro Bergmann
Faculdade de Veterinária/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela benção da vida.

Ao inestimável professor José Maria Wiest, por ter me ensinado, em meus momentos de angústia a olhar para as dificuldades como barreiras a serem transpostas. E também por sua visão profissional, sempre contribuindo com conhecimentos e conselhos que tornaram essa etapa mais suave e agradável.

A querida Co-orientadora Heloisa Helena Chaves Carvalho pela amizade e orientação sem as quais este trabalho não seria realizado.

Aos professores Eduardo Cesar Tondo e Erna Vogt de Jong que na coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia viabilizaram a elaboração deste trabalho.

Aos colegas de mestrado pela amizade e companheirismo nas aulas.

As bolsistas do laboratório de Laboratório de Higiene de Alimentos do ICTA pela amizade e apoio.

Aos funcionários da biblioteca e do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) pelo apoio e suporte técnico prestados.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Pedro e Vera, minha amada Marines;
meus irmãos Aramis e Fernanda,
cunhados Virna e Lucas e sobrinhos Julia
e Davi.*

Título: Conservação e condimentação de alimentos por *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) – Labiatae (Lamiaceae).

Autor: Marcelo Gonzalez Passos

Orientador: Prof. Dr. José Maria Wiest

Co-orientador: Dr. Heloisa Helena Chaves Carvalho

RESUMO

Através de Testes de Diluição em Sistema de Tubos Múltiplos determinou-se a Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB/bacteriostasia) e a Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB/bactericidia) de soluções conservantes contendo extrações etanólicas (alcooolatura/planta verde, hidroalcooolatura/planta seca) e hídricas (decoctos/planta verde ou seca) de *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) – Labiatae - (Lamiaceae), sobre inóculos padronizados de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Testou-se também, a partir da formulação de quatro bebidas, duas alcoólicas e duas não alcoólicas, com e sem açúcar respectivamente, a partir de extrato reconstituído (alcooolatura/planta verde) desta planta, em diferentes concentrações (5%, 15% e 30%), através de Testes de Suspensão em Sistema de Tubos Múltiplos, a Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB/bactericidia), sobre *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076), bem como a aceitabilidade/preferência sensorial por Escala Hedônica destes quatro produtos. Todas as diferentes formas de extração apresentaram capacidade de inibição e/ou inativação seletivas sobre os três inóculos bacterianos, tendo a forma de extração alcoólica apresentado a atividade antibacteriana mais intensa (inibição/inativação) frente aos três agentes. A bactéria mais sensível à atividade antibacteriana em todas as soluções conservantes foi *Salmonella* Enteritidis. *Staphylococcus aureus* apresentou a menor sensibilidade às formas de decoção, enquanto *Escherichia coli* apresentou a menor sensibilidade frente a forma de extração hidroalcoólica. Todas as formulações apresentaram atividade bactericida para *Salmonella* Enteritidis, diretamente proporcional às concentrações do extrato e ao tempo de exposição da bactéria às bebidas, destacando-se neste sentido a formulação não alcoólica com açúcar. Na análise sensorial a preferência aumentou com o decréscimo da concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* na formulação. A bebida não alcoólica com açúcar, na concentração de 5% de extrato, destacou-se na preferência sensorial/aceitabilidade.

Palavras-chave: atividade antibacteriana, *Ocimum gratissimum*, inibição bacteriana, inativação bacteriana por *Ocimum gratissimum*, inativação de *Salmonella* em bebidas, sensorialidade de alfavaca em bebidas.

ABSTRACT

Conservation and spicing by *Ocimum gratissimum* L. ("African basil") - Labiatae - (Lamiaceae).

Through Dilution Tests in Multiple Tubes System, the intensity of bacterial inhibition activity (IINIB/bacteriostasis) and the intensity of bacterial inactivation activity (IINAB/bactericidie) from preservatives solutions containing etanolic extractions (alcoholature/green plant, hidroalcoholature/dry plant) and hydric extractions (decoctions/green or dry plant) of *Ocimum gratissimum* L. (African basil) - Labiatae - (Lamiaceae), on standardized inocula of *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076), *Escherichia coli* (ATCC 11229) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) was determined. In the same way, the Activity Intensity of Bacterial Inactivation (IINAB/bactericidie), in four drinks formulations, two alcoholic and two no-alcoholic, with and without sugar respectively, from reconstituted extract (alcoholature/green plant) of the same plant, at different concentrations (5%, 15% and 30%), on *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) was determined by Suspension Tests in Multiple Tubes System, and the acceptability/sensory preference by Hedonic Scale of these four products. All differents extractions forms had showed selective capacity of inhibition or inactivation on the three bacterial inocula. The alcoholic extraction form presented the antibacterial activity more intense (inhibition/inactivation) against the three agents. The sensitivest bacteria by all preservatives solutions was *Salmonella* Enteritidis. *Staphylococcus aureus* showed a lower sensibility to the decoction types, while *Escherichia coli* showed a lower sensibility to the hidroalcoholic extraction. All food formulations showed bactericidal activity on *Salmonella* Enteritidis, directly proportional to the extract concentrations and the exposure time of the bacterium in beverages, pointing the not alcohol with sugar formulation. In the sensorial analysis the preference increased with the decrease of the extract concentration of *Ocimum gratissimum*. The non-alcoholic beverage with sugar, in the extract concentration of 5%, pointed in the sensorial preference// acceptability.

Keywords: antibacterial activity, *Ocimum gratissimum*, bacterial inhibition, bacterial inactivation by *Ocimum gratissimum*, inactivation of *Salmonella* in beverages, sensoriality of African basil in beverages.

LISTA DE ABREVIATURAS

IINAB Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana.

IINIB: Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana.

ATCC: American Culture Collection.

APPC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle.

BPAs: Boas Práticas Agrícolas.

DTAs: Doenças Transmissíveis por Alimentos.

BHI: Brain Heart Infusion.

ICTA: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ACFOR: Abundante, Comum, Freqüente, Ocasional e Rara.

PCA: Plate Count Agar.

DVG Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft.

ANOVA: Análise de Variância.

SBCTA: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Artigo 1

Tabela 1- Representação dos valores ordinais arbitrários de intensidade de atividade atribuídos às variáveis Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos30

Tabela 2 - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana /bacteriostasia (IINIB) e Intensidade da Atividade Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) de diferentes extratos à 50% de *Ocimum gratissimum*-("alfavacão", "alfavaca", "alfavaca-cravo") – Labiatae (Lamiaceae) - segundo diferentes tempos de exposição e a presença ou ausência de desinibidores bacterianos, observados em triplicata31

Tabela 3 – Avaliação da sensibilidade de três espécies bacterianas de interesse em alimentos frente à soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores tipo de extração, tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos.....31

Tabela 4 - Avaliação da presença ou da ausência de desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores tempo de confrontação, tipo de extração e espécie bacteriana..... 32

Tabela 5 – Avaliação da relação entre as espécies bacterianas de interesse em alimentos e os diferentes tipos de extração das soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos33

Tabela 6 - Avaliação da relação entre a sensibilidade das espécies bacterianas de interesse em alimentos à soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, na presença ou ausência de desinibidores bacterianos, independente dos fatores tempo de confrontação e tipo de extração34

Tabela 7 – Avaliação da relação entre as diferentes formas de extração das soluções conservantes de *Ocimum gratissimum* na presença ou ausência de desinibidores bacterianos, independente dos fatores tempo de confrontação e espécie bacteriana de interesse em alimentos.....35

Artigo 2

Figura 1 - Fluxograma de elaboração dos quatro tipos de bebidas (aperitivos) 45

Tabela 1 - Valores ordinais arbitrários de intensidade de atividade atribuídos a variável Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos.....47

Quadro 1 - Intensidade da Atividade Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) de diferentes concentrações de extrato reconstituído (alcoolatura/planta verde) de *Ocimum gratissimum*-("alfavacão", "alfavaca", "alfavaca-cravo") – Labiatae (Lamiaceae) sobre *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) determinada através de Teste de Suspensão, em bebidas formuladas na presença e ausência de álcool e de açúcar, respectivamente, segundo diferentes tempos de incubação e de confronto49

Tabela 2 – Avaliação da atividade antibacteriana de extrato reconstituído de *Ocimum gratissimum* sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo tempo de confrontação (exposição), independente dos fatores: tempo de incubação, concentração do extrato, presença ou ausência de álcool e presença e ausência de açúcar nas bebidas50

Tabela 3 – Avaliação da atividade antibacteriana de extrato reconstituído de *Ocimum gratissimum* sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo tempo de incubação, independente dos fatores: tempo de confrontação (exposição), concentração do extrato, presença ou ausência de álcool e presença e ausência de açúcar nas bebidas50

Tabela 4 – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo as concentrações de extrato de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores: tempo de confrontação (exposição), tempo de incubação, presença ou ausência de álcool nas bebidas e presença e ausência de açúcar nas bebidas.....51

Tabela 5 – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo a presença e ausência de álcool, independente dos fatores: tempo de confrontação (exposição), tempo de incubação, concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* e presença e ausência de açúcar nas bebidas51

Tabela 6 – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo a presença e ausência de açúcar , independente dos fatores: tempo de confrontação (exposição), tempo de incubação, concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* e presença e ausência de álcool nas bebidas52

Tabela 7 – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo a correlação entre o tempo de confrontação (exposição) e as concentrações de extrato de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores: tempo de incubação presença e ausência de açúcar nas bebidas e a presença ausência de álcool nas bebidas52

Tabela 8 - Avaliação das bebidas formuladas segundo a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* independentes da presença e ausência de açúcar e presença e ausência de álcool.....53

Tabela 9 - Avaliação das bebidas formuladas segundo a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* correlacionada com a presença e ausência de álcool, independentes da presença e ausência de açúcar54

Tabela 10 - Avaliação das bebidas formuladas segundo a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* correlacionada com a presença e ausência de açúcar, independentes do fator de presença e ausência de álcool54

Reapresentação dos Resultados e Discussão Geral

Gráfico 1- Avaliação da atividade antibacteriana de quatro formas de extração das soluções conservantes de *Ocimum gratissimum* (valores médios de triplicatas), independente dos fatores tempo de confrontação, espécie bacteriana, presença ou ausência de desinibidores bacterianos61

Gráfico 2 – Avaliação da relação entre as espécies bacterianas de interesse em alimentos e os diferentes tipos de extração das soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos62

Gráfico 3 – Avaliação da sensibilidade de três espécies bacterianas de interesse em alimentos frente à soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores tipo de extração, tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores63

Gráfico 4 – Avaliação da atividade antibacteriana de extrato de *Ocimum gratissimum* sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) relacionando a presença e ausência de açúcar nas bebidas e a presença ausência de álcool nas bebidas, independente dos fatores: tempo de exposição, tempo de incubação (confrontação) e concentração de extrato de *Ocimum gratissimum*64

Gráfico 5 – Avaliação da atividade antibacteriana das concentrações de extrato de *Ocimum gratissimum* sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo o tempo de confrontação (exposição), independente dos fatores: tempo de incubação presença e ausência de açúcar nas bebidas e a presença ausência de álcool nas bebidas.....65

Gráfico 6 - Avaliação da bebida quanto a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* independentes dos fatores de presença e ausência de açúcar e presença e ausência de álcool66

Gráfico 7 - Avaliação da bebida quanto a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* nas bebidas, segundo a presença e ausência de álcool, independente do fator presença e ausência de açúcar67

Gráfico 8 - Avaliação da a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* nas bebidas, segundo a presença e ausência de açúcar, independente do fator presença e ausência de álcool68

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
1.1 INTRODUÇÃO	14
1.2 OBJETIVO GERAL	15
CAPÍTULO 2	16
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
CAPÍTULO 3	21
Inibição e Inativação Bacterianas <i>in vitro</i> de diferentes formas de extração de <i>Ocimum gratissimum</i> L. (“Alfavacão”, “Alfavaca”, “Alfavaca-Cravo”) – <i>Labiatae</i> (<i>Lamiaceae</i>), frente a bactérias de interesse em alimentos.....	22
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODO	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
AGRADECIMENTOS	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO 4	40
Inativação bacteriana e sensorialidade em bebidas formuladas a partir de extrato reconstituído de <i>Ocimum gratissimum</i> L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) – <i>Labiatae</i> - (<i>Lamiaceae</i>).	41
CAPITULO 5	59
5. REAPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL	60
REFERÊNCIAS GERAIS	69
APÊNDICE E ANEXOS.....	73

CAPÍTULO 1

Introdução e Objetivos.

1.1 INTRODUÇÃO

A produção de alimentos que não causem doenças é um importante desafio de saúde pública; o desenvolvimento de um sistema de segurança para os produtos alimentícios é uma responsabilidade que começa na cadeia de produção chegando ao consumidor final. A adoção de estratégias tais como: Boas Práticas Agrícolas (BPAs) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) entre outras, se somam aos esforços para assegurar a inocuidade dos alimentos (TAUXE, 2002; FORSYTHE, 2002). Kaferstein e Abdussalam (1999), previram um aumento dos casos de doenças transmitidas pelos alimentos, tanto em países industrializados como em países em desenvolvimento durante os primeiros decênios do século XXI.

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com plantas utilizadas na medicina e na gastronomia tradicional, avaliando sua composição química, bem como suas atividades bactericidas e fungicidas (AHN; GRÜN; MUSTAPHA, 2007; MOREIRA *et al.*, 2005; NGUEFACK, BUDDE; JAKOBSEN, 2004; ŞAHIN *et al.*, 2004; TEPE *et al.*, 2004; JIROVETSZ *et al.*, 2003; SAĞDIÇ; ÖZCAN, 2003, HAMMER, CARSON; RILEY, 1999). Uma possível explicação para a tendência à utilização de plantas, como conservante, é sugerida por Shandamis *et al.*, (2001) que salientam a possível preferência dos consumidores por aditivos de origem natural, evitando assim os compostos sintéticos.

O *Ocimum gratissimum* L. (“Alfavacão”, “Alfavaca”, “Alfavaca-Cravo”) – *Labiatae* (*Lamiaceae*), conhecido popularmente como “alfavacão”, é uma dessas espécies estudada na busca de um composto de origem natural que iniba o crescimento de fungos e bactérias, a partir da extração de seu óleo essencial. Outro aspecto relevante, na planta, é o seu uso medicinal com ação anti-séptica pulmonar e expectorante, bem como analgésica (LORENZI; MATOS, 2002).

Estudos com *Ocimum gratissimum* L. relatam alta atividade bactericida e antifúngica demonstrando a capacidade preservativa dessas plantas na conservação de alimentos (FARIA *et al.*, 2006; NGUEFACK, BUDDE; JAKOBSEN, 2004; ORAFIDIYA *et al.*, 2001).

1.2 OBJETIVO GERAL

A partir de conhecimentos tradicionais, fundamentar o desenvolvimento de alimentos seguros e sensorialmente qualificados, pelo uso de *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) – *Labiatae* (*Lamiaceae*) como conservante antibacteriano e condimento natural.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade bacteriostática/inibição e bactericida/inativação de *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) – *Labiatae* (*Lamiaceae*) através de Testes de Diluição em Sistema de Tubos Múltiplos, em diferentes tipos de extração, a saber, extrato alcoólico (planta fresca), hidroalcoólico e decocções (planta seca e planta verde), sobre os seguintes microrganismos: *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection);
- Avaliar a atividade bactericida/inativação de *Salmonella* Enteritidis, através de Teste de Suspensão, em quatro bebidas formuladas a partir de diferentes concentrações de extrato reconstituído de *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) – *Labiatae* (*Lamiaceae*), na presença ou ausência de álcool e de açúcar, respectivamente;
- Avaliar a sensorialidade/aceitabilidade das concentrações de uso do extrato reconstituído de *Ocimum gratissimum* nas diferentes formulações alimentares sob a forma de bebidas em teste, com e sem álcool, com e sem açúcar, respectivamente.

CAPÍTULO 2

Revisão bibliográfica.

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Plantas Condimentares

As plantas condimentares conferem sabor e aroma aos alimentos, contudo diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com varias plantas, com o objetivo de avaliar a sua atividade bactericida e fungicida destas (FARIA *et al.* 2006; ŞAHIN *et al.*, 2004; NAKAMURA *et al.*, 2004; LORENZI; MATOS, 2002; SKANDAMIS; TSIGARIDA; NYCHAS, 2002; KUBO; FUJITA, 2001; ALIGIANNIS *et al.*, 2001). Shan *et al.* (2007) analisaram a atividade antibacteriana de 20 extratos de plantas condimentares sobre: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, e *Salmonella anatum*. Já Kubo *et al.* (2004) testaram o coentro como anti-salmonella sobre *S. choleraesuis*.

2.1.2 *Ocimum gratissimum*

O gênero *Ocimum* pertence à família Labiatae (*Lamiaceae*), possuindo 30 espécies de ervas que são encontradas em regiões tropicais e subtropicais. *Ocimum gratissimum* L. é uma planta que possui aroma forte e agradável popularmente chamada de “alfavacão”, “alfavaca” e “alfavaca-cravo”, com origem no oriente (LORENZI; MATOS, 2002).

Ocimum gratissimum é utilizada contra várias doenças tais como: leishmanioses, infecções do trato respiratório superior, diarreia (antidiurese), desordem gastrintestinal, febre tifóide, dor de cabeça e doenças de pele e oftalmológica, sendo muito comum na medicina caseira o uso de seu chá como carminativo, sudorífico e diurético. A planta apresenta inúmeros compostos, sendo o eugenol o composto majoritário (UEDA-NAKAMURA *et al.*, 2006; SARTORATTO *et al.* 2004; LORENZI; MATOS, 2002; ILORI *et al.* 1996).

O percentual de Eugenol pode variar em função da técnica de extração e do acesso da planta. Este composto apresenta uma série de atributos tais como: agente aromático para alimentos, anticonvulsivo, anestésico, analgésico dentário, antibactericida e fungicida (TREVISAN *et al.*, 2006; UEDA-NAKAMURA, 2006; JAY, 2005; SARTORATTO *et al.*, 2004; LORENZI; MATOS, 2002).

O óleo essencial é uma mistura complexa de compostos naturais de metabólitos secundários voláteis isolados de plantas e tempero que no *Ocimum*

gratissimum pode chegar a 3,5% de rendimento (TREVISAN *et al.*, 2006). Os compostos majoritários encontrados nas folhas de *Ocimum gratissimum* são: eugenol, 1,8-cineol, b-cariofileno, (Z)-ocimeno sendo adequados para a elaboração de licores e sucedâneo de cravo-da-índia (SANTORO *et al* 2007; SARTORATTO *et. al*, 2004; LORENZI; MATOS, 2002).

Em estudo preliminar, Souto *et al* (2006) testaram três espécies de *Ocimum*, incluindo *Ocimum gratissimum*, avaliando a atividade antibacteriana (IINIB e IINAB) a partir de extrato hidroalcoólico destas plantas, sobre os seguintes agentes zoonóticos transmissíveis por alimentos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Salmonella Enteritidis* (ATCC 11076). As extrações das diferentes plantas apresentaram capacidade de inativação e/ou de inibição seletivas sobre os diferentes inóculos bacterianos estudados, permitindo antever sua aplicação prática em formulações alimentares.

A utilização de óleos essenciais de plantas como redutor de microrganismos patogênicos na conservação de alimentos vem crescendo devido o interesse de substituir compostos químicos sintéticos por substâncias naturais. Estes compostos podem ser responsáveis por atributos carcinogênicos e teratogênicos como também por toxicidade residual (MOREIRA *et. al.*, 2005). Outro fator relevante para a busca por conservantes naturais é que muitos microrganismos patogênicos adquirem resistência aos antibióticos havendo a necessidade de se encontrar substitutos (SARTORATTO *et al.*, 2004). Muitos estudos vem sendo realizados para avaliar a atividade antimicrobiana e antifúngica de plantas medicinais (CHAH *et al.*, 2006; FARIA *et al.*, 2006;). *Ocimum gratissimum* por sua vez apresenta também esta propriedade conservante devido a substâncias encontradas em seu óleo essenciais tais como: cimen-8-ol, eugenol e trans-cariofileno entre outros (SARTORATTO *et al.*, 2004; NGUEFACK *et al.*, 2004.; NAKAMURA *et al.*, 1999; ILORI *et al.*, 1996).

2.1.3 Microrganismos x alimentos

Os alimentos são fonte de nutrientes para os microrganismos que necessitam destes para seu crescimento. Os microrganismos mais comuns em alimentos são as bactérias e fungos. O leite é um meio ideal para o crescimento de bactérias, sua flora intrínseca varia de 10^2 - 10^4 UFC/mL. As carnes são altamente perecíveis

apresentando como um dos componentes mais abundantes as proteínas. A elevada atividade de água, juntamente com o conteúdo protéico, favorecem o crescimento da maioria dos microrganismos nas carnes. Nos vegetais a flora microbiana reflete a qualidade sanitária das etapas de processamento e as condições microbiológicas do produto fresco (GUENTZE *et al.*, 2008; JAY, 2005; FORSYTHE, 2002; MARRIOTT, 1997).

As doenças de origem alimentar são um problema para a saúde pública e para a economia de países industrializados e em desenvolvimento. A vigilância epidemiológica tem revelado um constante aumento de doenças transmitidas por alimentos, sendo registrado inúmeros surtos com efeitos danosos (KAFERSTEIN; ABDUSSALAM, 1999).

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. São bacilos gram-negativos, móveis (com algumas poucas exceções), anaeróbios facultativos. Os sintomas característicos de doenças de origem alimentar causadas por *Salmonella* incluem diarreia, náuseas, dor abdominal, febre branda e calafrio (ACHA; SZYFRES, 2003). A Salmonelose é uma das mais freqüentes doenças transmitidas por alimentos e existem mais de 2500 sorovares de *Salmonella*, todos considerados patogênicos (KUBO *et al.*, 2004). Segundo Nadvorny; Figueiredo e Schmidt, (2004) a *Salmonella sp.* foi o agente prevalente nos surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) investigados no estado do Rio Grande do Sul, em 2000, chegando a 74,7% dos casos ocorridos. Jansen, Frank e Stark, (2007) relatam que no período dos anos de 2001 a 2005 ocorreram cinco grandes surtos de salmonelose na Alemanha envolvendo carne suína. A *Salmonella* também pode estar presente em alimentos de origem vegetal como espinafre e alface (GUENTZE *et al.*, 2008).

A *Salmonella* Enteritidis é atualmente um sorotipo predominantemente causador de infecções alimentares, estando envolvida em surtos com alimentos congelados à base de ovos (HOLTBY *et al.*, 2006). Ela foi a causadora de 70% dos casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) no Japão no período de 1996 a 1999 (OSAKA *et al.*, 1999). Somente na prefeitura de Shiga, no Japão, ocorreram três surtos nesse período (MATSUNE *et al.*, 2001). No ano de 2004, na Áustria, em 83% dos casos registrados de salmonelose estavam relacionados a *Salmonella* Enteritidis (MUCH *et al.* 2005).

Escherichia coli forma parte da família *Enterobacteriaceae*. Ela é um componente normal da flora do intestino grosso de animais de sangue quente, incluindo o homem. *E. coli* é um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo. Classificam-se em diferentes sorotipos apresentando mais de 170 sorogrupos. O período de incubação da doença no homem é de 2 a 9 dias. A doença pode manifestar-se por diarreia ou até uma colite hemorrágica severa, com fortes dores abdominais, com pouca ou nenhuma febre. Os alimentos relacionados à enfermidade são carne picada insuficientemente cozida, leite cru, sanduíches frios e batata crua (ACHA, SZYFRES 2003; FORSYTHE, 2002).

Mora *et al.* (2007) isolaram *E. coli* O157 de carne crua, queijo e vegetais frescos. *E. coli* O157 foi suspeita de 14 surtos de DTA's ligados a produtos cárneos e de laticínios na Escócia no período de 1994 a 2003 (STRACHAN *et al.*, 2006). Guentze *et al.*, op.cit. desenvolveram pesquisa para reduzir o conteúdo de *E. coli* O157:H7 da superfície de alfaces e espinafres.

Staphylococcus aureus causa intoxicação alimentar por uma enterotoxina pré-formada no alimento. A grande maioria dos surtos se devem a cepa de *S. aureus* coagulase-positivas. O gênero *Staphylococcus* consta de bactérias gram-positivas em forma de cocos, agrupados em cacho. A bactéria não é muito resistente ao calor, porém a sua enterotoxina é resistente ao calor. O período de incubação da doença no homem é curto, geralmente de três horas depois da ingestão do alimento. Os sintomas principais são náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia. Os estafilococos podem contaminar, mesmo em pequenas quantidades, quase todos os alimentos de origem animal ou, naqueles diretamente manipulados (ACHA; SZYFRES, 2003; JAY, 2005). Pesquisas relatam surto de *Staphylococcus aureus* causado por manipulação inadequada na preparação de alimentos em restaurantes, bem como presença de enterotoxina estafilococia nesse tipo de estabelecimento (CARMO. *et al.*, 2003; SORIANO *et al.* 2002). Leite e produtos derivados podem apresentar presença de enterotoxina de *Staphylococcus aureus* (MORANDI *et al.*, 2007; CARMO *et al.*, 2002).

CAPÍTULO 3

Artigo: Inibição e inativação bacterianas *in vitro* de diferentes formas de extração de *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) – Labiatae (Lamiaceae), frente a bactérias de interesse em alimentos.

Submetido à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais (RBPM).

Inibição e Inativação Bacterianas *in vitro* de diferentes formas de extração de *Ocimum gratissimum* L. (“Alfavacão”, “Alfavaca”, “Alfavaca-Cravo”) – *Labiatae* (*Lamiaceae*), frente a bactérias de interesse em alimentos.

PASSOS, M.G.¹; CARVALHO, H.¹; WIEST, J.M.^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. * Correspondência: J.M.Wiest – ICTA/UFRGS, Campus do Vale, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15090, CEP 91505-970, Porto Alegre – RS/Brasil. E-mail: jmwiest@ufrgs.br

RESUMO: Através de Testes de Diluição em Sistema de Tubos Múltiplos determinou-se a Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB/bacteriostasia) e a Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB/bactericidia) de soluções conservantes contendo extratos etanólicas (alcooolatura/planta *in natura*, hidroalcooolatura/planta seca) e hídricas (decoctos /planta *in natura* ou seca) de *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) – *Labiatae* - (*Lamiaceae*), sobre inóculos padronizados de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Todas as diferentes formas de extração apresentaram capacidade de inibição e/ou inativação seletivas sobre os inóculos bacterianos, tendo a forma de extração alcoólica apresentado a atividade antibacteriana mais intensa (inibição/inativação) frente aos três agentes. A bactéria mais sensível à atividade antibacteriana em todas as soluções conservantes foi *Salmonella* Enteritidis. *Staphylococcus aureus* apresentou a menor sensibilidade às

formas de decocção, enquanto *Escherichia coli* apresentou a menor sensibilidade frente a forma de extração hidroalcoólica.

Palavras-chave: *Ocimum gratissimum*, atividade antibacteriana, inibição bacteriana, inativação bacteriana.

ABSTRACT: Through of Dilution Tests in Multiple Tubes System it was determined the intensity of bacterial inhibition activity (IINIB/bacteriostasy) and the intensity of bacterial inactivation activity (IINAB/bactericidie) from solutions containing etanolic extractions (alcoholature/plant *in nature*, hidroalcoholature/ dry plant) and hydric extractions (decoctions/*in natura* or dry plant) of *Ocimum gratissimum* L. ("Alfavacão", "Alfavaca", "African basil") - Labiatae - (Lamiaceae), on standardized inocula of *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076), *Escherichia coli* (ATCC 11229) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). All different extractions forms had showed seclotive capacity of inhibition or inactivation on the bacterial inocula,. The alcoholic extraction form presented the antibacterial activity more intense (inhibition/ inactivation) against three agents. The sensitivest bacteria by all preservatives solutions was *Salmonella* Enteritidis. *Staphylococcus aureus* showed a lower sensibility to the decoction types, while *Escherichia coli* showed a *lower* sensibility to the hydroalcoholic extraction.

Keywords: *Ocimum gratissimum*, antibacterial activity, bacterial inhibition, bacterial inactivation.

INTRODUÇÃO

Os recursos naturais renováveis representados pelas plantas medicinais, condimentares e aromáticas, participam do cotidiano das ações de saúde e de alimentação, através de seus inúmeros princípios ativos e biocomplexos extraídos de diferentes modos e processos incluindo os decoctos, os infusos, os macerados, as tinturas, as alcoolaturas, envolvendo diferentes solventes, permitindo o estudo dos extratos na condição de droga crua ou purificada, partindo-se de plantas *in natura* ou verdes ou plantas desidratadas, entre outros processos (Sullivan, 1997).

O gênero *Ocimum* pertence à família *Labiatae (Lamiaceae)*, abrangendo trinta espécies que são encontradas em regiões tropicais e subtropicais. *Ocimum gratissimum L.* é uma planta que possui aroma forte e agradável, popularmente chamado de “alfavacão”, “alfavaca” ou “alfavaca-cravo”, com origem no oriente, subespontâneo em todo o Brasil e do qual existem diversos quimiotipos. Várias espécies de *Ocimum* são plantas classicamente fornecedoras de óleos essenciais, largamente utilizados como temperos de pratos especiais e como aromatizantes de licores e de perfumes finos (Lorenzi & Matos, 2002).

Medicinalmente, *Ocimum gratissimum* é utilizado frente a várias doenças tais como: leishmanioses, infecções do trato respiratório superior, diarreia/antidiurese, desordem gastrointestinal, febre tifóide, dor de cabeça, doenças de pele e oftamológicas, sendo muito comum na medicina caseira o uso de seu chá como carminativo, sudorífico e diurético. A planta apresenta inúmeros compostos, sendo o eugenol o composto majoritário (Ueda-Nakamura *et al.*, 2006; Sartoratto *et al.* 2004; Lorenzi & Matos, 2002; Ilori *et al.* 1996).

A utilização de óleos essenciais de plantas como redutor de microrganismos patogênicos para a conservação de alimentos vem crescendo devido ao interesse

em substituir compostos químicos sintéticos por substâncias naturais. Estes compostos podem ser responsáveis por atributos carcinogênicos, teratogênicos e também apresentar toxicidade residual (Moreira *et al.*, 2005). Outro fator relevante para a busca por conservantes naturais é que muitos microrganismos patogênicos adquirem resistência aos antibióticos, havendo a necessidade de serem substituídos por produtos de origem natural (Sartoratto *et al.*, 2004). Estudos vêm sendo realizados para avaliar a atividade antimicrobiana e antifúngica de plantas medicinais (Chah *et al.*, 2006; Faria *et al.*, 2006). *Ocimum gratissimum*, por sua vez, apresenta esta propriedade conservante devido às substâncias encontradas em seu óleo essencial tais como: cimen-8-ol, eugenol e trans-cariofileno, entre outras (Sartoratto *et al.*, 2004; Nguetack, 2004; Nakamura *et al.*, 1999; Ilori *et al.*, 1996). Orafidiya *et al.*, (2002) descrevem atividade antibacteriana em formulações com óleo essencial de *Ocimum gratissimum* utilizadas como antissépticas no tratamento de feridas ou lesões com solução de continuidade. Oussou *et al.*, (2004) testaram óleo essencial do gênero *Ocimum*, entre estes *O. gratissimum*, frente a 14 bactérias diferentes originárias da Costa do Marfim demonstrando atividade bacteriostática e bactericida relevantes nesta planta.

Eugenol é o composto químico em maior percentual no óleo essencial da planta *Ocimum gratissimum*, podendo este valor variar em função da técnica de extração e do acesso. Este composto apresenta uma série de atributos farmacológicos tais como: agente aromático para alimentos, anticonvulsivo, anestésico, analgésico dentário, antibactericida e fungicida (Ueda-Nakamura, 2006; Sartoratto *et al.*, 2004; Lorenzi & Matos; 2002).

Este trabalho tem como objetivo determinar *in vitro* a atividade antibacteriana de extratos etanólicos (alcooolatura/planta verde e hidroalcooolatura/planta seca, com

evaporação do etanol em sistema rota-vapor com reconstituição hídrica posterior sob condições de assepsia) e extratos hídricos (decoctos de planta verde e seca, idem quanto à reconstituição) de um acesso de *Ocimum gratissimum*, constituído de um “pool” de exemplares subespontâneos, originários do Município de Eldorado do Sul/RS, frente a agentes bacterianos padrões internacionais de interesse em alimentos, respectivamente *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Salmonella Enteritidis* (ATCC 11076), atividade esta expressa como IINIB (Intensidade de Inativação Bacteriana/bacteriostasia) e como IINAB (intensidade de Inativação Bacteriana/bactericidia), relacionando-a, outrossim, com o tempo de confrontação bactérias *versus* diferentes extratos. Em síntese, manipulam-se as variáveis: bactérias, os diferentes tipos de extração, os tempos de confrontação e a presença ou ausência de desinibidores bacterianos, permanecendo constante em 50% a concentração final de uso dos diferentes extratos nas denominadas soluções conservantes.

MATERIAL E MÉTODO

A planta *Ocimum gratissimum* foi colhida em propriedade agroecológica familiar em Parque Eldorado, Município de Eldorado do Sul, região metropolitana de Porto Alegre, RS/Brasil, Depressão Central (coordenadas de 30° 05' S e 51° 40' W), constituindo um “pool” de partes vegetativas e reprodutivas de exemplares subespontâneos, ruderais. Segundo a escala ACFOR de Kent & Coker (1992), nesta propriedade *Ocimum gratissimum* se classificou na categoria de “freqüente”. Aplicando a escala de sociabilidade de Braun-Blanquet (1979) a planta se apresentava em pequenos grumos ou tufos de indivíduos não cultivados.

O material foi herborizado segundo Ming (1996) e catalogado pela bióloga Sílvia Marodin (CRBio/RS nº 17268), sendo a duplicata botânica incorporada ao Herbário do Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, recebendo número de registro 150160.

Talos, folhas e flores da planta foram submetidos aos processos de extração alcoólica (alcoólatura/planta *in natura*), extração hidroalcoólica (hidroalcoólatura/planta seca) e decoção (planta seca e *in natura*) para obtenção das soluções conservantes ou antibacterianas, segundo Farmacopéia (1959). As amostras vegetais recém colhidas foram trituradas grosseiramente e colocadas em álcool etílico, de cereais (Farmaquímica, Porto Alegre/RS/BR) a 96 °GL, na proporção de 400 g de planta para 1000 mL de álcool, na extração alcoólica. O extrato hidroalcoólico foi elaborado a partir de planta seca, colocado em álcool etílico, de cereais, a 70 °GL, na proporção de 100 g de planta para 1000 mL de álcool. Após um período de quinze dias, ambos os extratos foram submetidos à destilação fracionada sob pressão reduzida em sistema rota vapor, desprezando-se a porção alcoólica e reidratando-se o extrato resultante com água destilada estéril, reconstituindo-se as concentrações iniciais da planta. O decocto de planta seca foi preparado a partir da planta desidratada na proporção de 100 g de planta para 1000 mL de água destilada estéril, mantido sob fervura durante 20 minutos em aquecedor com refluxo repondo-se o volume inicial. Já o decocto de planta *in natura* foi realizado no momento da chegada da planta ao Laboratório de Higiene, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo realizado na proporção de 400 g da planta para 1000 mL de água destilada estéril. Para viabilizar a extração hidroalcoólica e o decocto de planta seca, parte da planta foi pesada e colocada em estufa com circulação de ar forçada e

temperatura constante de 40 °C, procedendo-se varias pesagens até a estabilização de seu peso. Para o controle permanente da assepsia destes procedimentos de extração e reconstituição, determinou-se a esterilidade de todos as soluções conservantes ou antibacterianas, retirando-se alíquota de 5 mL, semeada em tubos de Caldo BHI (Brain Hearth Infusion, ACUMEDIA, Maryland/Baltimore/USA), incubados aeróbiamente à 37 °C por até 48 horas, confirmando-se por plaqueamento em Agar Nutriente (Nutrient Agar, ACUMEDIA, Maryland/Baltimore/USA).

Foram utilizadas amostras de inóculos padrões American Culture Colletion (ATCC), para a avaliação da atividade antibacteriana (IINIB/bacteriostasia e IINAB/bactericidia) dos diferentes extratos de plantas tendo sido estas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Salmonella Enteritidis* (ATCC 11076), provenientes da coleção-bacterioteca do Laboratório de Higiene de Alimentos do ICTA/UFRGS. Os inóculos foram reativados em meio de cultura BHI à 37 °C por um período de 18 a 24 horas de incubação aeróbia, com o objetivo de atingir uma concentração $\geq 1,0 \times 10^8$ UFC/mL para confrontação com os diferentes extratos de *O. gratissimum*, através de diluições seriais logarítmicas (Avancini, 2002). A avaliação da concentração inicial foi realizada através da técnica da microgota segundo Romeiro (2007) e a contagem de microrganismos viáveis foi concretizada em placas de Petri contendo meio de cultura PCA (Plate Count Agar, HIMEDIA, Mumbai/Índia). Foram realizadas diluições seriadas, a partir do inóculo inicial, transferindo-se 1 mL deste para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (BIOBRÁS, Montes Claros/MG/BR) para obter a diluição 10^{-1} , e assim sucessivamente até a diluição 10^{-12} . De cada diluição foram transferidas três gotas para placas de Petri utilizando micropipetas de 15 μ L e a leitura realizada em

24 horas de incubação aeróbia à 37 °C. O valor final considerado constituiu-se da média das contagens das gotas triplicadas, avaliadas biometricamente segundo Cavalli-Sforza (1974).

Para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos de *Ocimum gratissimum*, lida como Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB), utilizou-se o Teste de Diluição segundo Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft/Sociedade Alemã de Medicina Veterinária (DVG, 1980), com base na Técnica do Sistema de Tubos Múltiplos, modificada por Avancini (2002), confrontando-se os quatro diferentes extratos com 12 diluições seriais logarítmicas (10^{-1} a 10^{-12} UFC/mL) dos diferentes inóculos bacterianos.

Entende-se por IINIB/bacteriostasia, o resultado do confronto da bactéria com a solução antibacteriana em meio específico, e por IINAB/bactericidia, o mesmo resultado, porém sob a influência dos desinibidores bacterianos acrescentados ao BHI (DVG, 1980; Andrade & Macedo, 1996; Reybrouck, 1979, Reybrouck, 1998). Estes valores são, segundo Avancini (2002), representações da atividade biológica inibitória/bacteriostasia ou inativadora/bactericidia de diferentes soluções antibacterianas sobre os microrganismos.

Os resultados de Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) foram representados por variáveis ordinais arbitrárias, que assumiram valores de 12 a 0, sendo que o valor de 12 (doze) representa atividade máxima e 0 (zero) a não-atividade, como demonstra a Tabela 1 a seguir.

TABELA 1 – Representação dos valores ordinais arbitrários de intensidade de atividade atribuídos às variáveis Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericida (IINAB) e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos.

12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0	Variáveis ordinárias de intensidade de atividade
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	n.a	UFC/mL – diluições de inóculo inibidas ou inativadas
10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	n.a	UFC/mL – doses infectantes inibidas ou inativadas

n.a: ausência de atividade antibacteriana;
UFC/mL: unidades formadoras de colônias por mL.

Os resultados da avaliação da atividade antibacteriana (IINIB e IINAB) das diferentes soluções conservantes extraídas de *Ocimum gratissimum* foram tratados através do programa de análises estatísticas Sisvar 5.0. Os resultados foram avaliados através da Análise de Variância (Anova) e teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade antibacteriana das quatro formas de extração de *Ocimum gratissimum* à 50%, independentes dos fatores tempo de confrontação, espécies bacteriana e presença ou ausência de desinibidores bacterianos, encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2 - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade da Atividade Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) de diferentes extratos à 50% de *Ocimum gratissimum* (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) – Labiatae (Lamiaceae) - segundo diferentes tempos de exposição e a presença ou ausência de desinibidores bacterianos, observados em triplicata.

Tipo de Extrato	Tempos (h)	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Salmonella Enteritidis</i>				<i>Escherichia coli</i>									
		IINIB		IINAB		IINIB		IINAB		IINIB		IINAB							
Alcoolatura	24	3	3	3	2	2	2	11	11	11	8	8	8	11	11	11	4	4	4
	48	3	3	3	2	2	2	12	12	12	8	8	8	12	12	12	2	2	2
	72	2	2	2	2	2	2	12	12	12	8	8	8	12	12	12	2	2	2
	144	1	1	1	2	2	2	12	12	12	8	8	8	12	12	12	2	2	2
Hidroalcoolatura	24	2	2	2	0	0	0	6	6	6	0	0	0	3	3	3	0	0	0
	48	2	2	2	0	0	0	8	8	8	0	0	0	2	2	2	0	0	0
	72	2	2	2	0	0	0	8	8	8	0	0	0	2	2	2	0	0	0
	144	3	3	3	0	0	0	7	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Decocto Verde	24	0	0	0	0	0	0	4	4	4	1	1	1	3	3	3	1	1	1
	48	0	0	0	0	0	0	4	4	4	1	1	1	0	0	0	1	1	1
	72	0	0	0	0	0	0	3	3	3	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	144	0	0	0	0	0	0	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Decocto Seco	24	2	2	2	0	0	0	3	3	3	2	2	2	2	2	2	0	0	0
	48	1	1	1	0	0	0	3	3	3	2	2	2	2	2	2	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	3	3	3	2	2	2	1	1	1	0	0	0
	144	0	0	0	0	0	0	3	3	3	2	2	2	0	0	0	0	0	0

Quando avaliada a sensibilidade das três espécies bacterianas frente a soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, independentemente das demais variáveis manipuladas, houve diferença significativa entre as bactérias, como mostra a Tabela 3. A bactéria que apresentou maior sensibilidade à atividade antibacteriana foi *Salmonella* Enteritidis, bem superior às demais, seguida de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

TABELA 3 – Avaliação da sensibilidade de três espécies bacterianas de interesse em alimentos frente à soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores tipo de extração, tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos.

Espécies bacterianas	Número Arbitrário
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0,91 ^a
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	2,34 ^b
<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 11076)	4,50 ^c

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

Quando avaliados os dois tratamentos com desinibidores/bactericidia (IINAB) e sem desinibidores/bacteriostasia (IINIB), independentemente das demais variáveis

manipuladas, observou-se diferenças significativas como mostra a Tabela 4. O tratamento IINIB (bacteriostasia/inibição pela ausência de desinibidores) apresenta resultado superior ao de IINAB (bactericidia/inativação pela presença de desinibidores), ou seja, a ação bacteriostática das soluções conservantes de *Ocimum gratissimum* é superior a ação bactericida. Souza (2005), Girolometto (2005) e Carvalho (2005) testando outras plantas e aplicando a mesma metodologia também obtiveram resultados superiores para IINIB em relação ao IINAB.

TABELA 4 - Avaliação da presença ou da ausência de desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores tempo de confrontação, tipo de extração e espécie bacteriana.

Tratamentos com presença ou ausência de desinibidores	Número Arbitrário
IINAB / bactericidia (presença dos desinibidores bacterianos)	1,31 ^a
IINIB / bacteriostasia (ausência de desinibidores bacterianos)	3,85 ^b

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

A Tabela 5 avalia a atividade antibacteriana dos extratos de *Ocimum gratissimum* obtidos a partir de diferentes tipos de extração sobre as principais bactérias causadoras de toxinfecções alimentares. Dentre estas *Staphylococcus aureus* apresentou diferença significativa em todos os tipos de extração. A maior atividade antibacteriana sobre esta bactéria foi obtida na forma de extração alcoólica, seguido da forma hidroalcoólica e da decocção de planta seca, sendo que a atividade antiestafilocócica do extrato obtido através da decocção de planta *in natura* foi nula. *Salmonella* Enteritidis apresenta diferença significativa entre todos os tipos de extração, sendo que a atividade mais intensa foi observada na forma alcoólica. Já as atividades dos extratos obtidos por hidroalcoolatura e decocção de planta seca sobre *Escherichia coli* não apresentam diferença significativa. Observa-se, novamente, maior ação antiescherichia no extrato obtido por alcoolatura.

TABELA 5 – Avaliação da relação entre as espécies bacterianas de interesse em alimentos e os diferentes tipos de extração de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos.

Tipos de Extração	Espécies bacterianas		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Escherichia coli</i>
Decocto com planta verde	0,00 ^{aA}	2,00 ^{aB}	0,75 ^{aC}
Decocto com planta seca	0,38 ^{bA}	2,50 ^{bB}	0,63 ^{abB}
Hidroalcoolatura (planta seca)	1,13 ^{cA}	3,63 ^{cB}	0,88 ^{bC}
Alcoolatura (planta verde)	2,13 ^{dA}	9,88 ^{dB}	7,13 ^{cC}

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tipos de extração e letras maiúsculas diferentes sobrescritas (^A) na mesma linha indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quando avaliadas as quatro formas de extração (Tabela 5), independentemente das demais variáveis manipuladas, estas apresentam diferenças significativas entre si. A extração alcoólica apresenta valor bem superior aos demais tipos de extração, seguido pela hidroalcoolatura, pelo decocto de planta seca e pelo decocto de planta *in natura*. Souza (2005) e Girolometto (2005), embora testando outras plantas, com a mesma metodologia, também obtiveram resultados superiores para a forma de extração alcoólica e inferiores para os decoctos. Uma hipótese para estas diferenças pode estar relacionada à perda de componentes como óleos essenciais, mais especificamente o eugenol, cimen-8-ol e trans-cariofileno, nas extrações por decocção, quando se utilizam temperaturas mais elevadas (ebulição) são utilizadas, em comparação com a hidroalcoolatura e alcoolatura.

Quando avaliada à ação antibacteriana individualmente, relacionada a cada tipo de extração, sobre as três diferentes bactérias, houve diferença significativa em todos os tipos de extração. *Salmonella* Enteritidis apresenta a maior sensibilidade antibacteriana em relação a todos os diferentes tipos de extração. *Staphylococcus*

aureus apresenta a menor sensibilidade à extração alcoólica, à decocção da planta verde e da planta seca. Já na forma de extração hidroalcoólica, a menor sensibilidade antibacteriana é demonstrada por *Escherichia coli*.

Em números absolutos, os três maiores valores de sensibilidade antibacteriana são encontrados, em ordem decrescente, nas formas de extração alcoólica atuando sobre a *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli*, bem como na forma de extração hidroalcoólica atuando sobre a *Salmonella* Enteritidis, embora menor.

A Tabela 6 avalia a presença ou ausência de desinibidores atuando sobre as diferentes bactérias. Os resultados apresentam uma maior atividade bactericida (IINAB, com desinibidor) na *Salmonella* Enteritidis, seguida de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo que todos os valores são diferentes significativamente entre si. Já a maior atividade bacteriostática (IINIB, sem desinibidor) é observada na *Salmonella* Enteritidis, seguida de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo que todos os valores são diferentes significativamente entre si. Nos resultados obtidos destaca-se, novamente, como na Tabela 4, que a ação bacteriostática é maior que a bactericida (IINIB>IINAB).

TABELA 6 - Avaliação da relação entre a sensibilidade das espécies bacterianas de interesse em alimentos e as soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, na presença ou ausência de desinibidores bacterianos, independente dos fatores tempo de confrontação e tipo de extração.

Bactérias	Tratamentos com presença ou ausência de desinibidores	
	IINAB	IINIB
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,50 ^{aA}	1,31 ^{aB}
<i>Escherichia coli</i>	0,81 ^{bA}	3,88 ^{bB}
<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,63 ^{cA}	6,38 ^{cB}

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas e letras maiúsculas diferentes sobrescritas (^A) na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos com presença e ausência de desinibidor bacteriano, para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

Outros autores descrevem atividade bactericida usando a planta *Ocimum gratissimum* sobre as mesmas três bactérias, porém com outras técnicas de

avaliação de sensibilidade antimicrobiana. Sartorrato *et al.* (2004) e Nguetack *et al.* (2004.) observaram atividade bactericida frente *Staphylococcus aureus*. Por sua vez, Nakamura *et al.* (1999) também descreveram atividade bactericida significativa sobre *Staphylococcus aureus*, porém menor frente a *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli*.

A Tabela 7 avalia os tipos de tratamento com e sem desinibidor, mostrando a atuação destes (IINIB/bacteriostasia e IINAB/bactericidia) relacionando-os às diferentes formas de extração, independentemente dos demais fatores. Os resultados mostram que a forma de extração alcoólica produz extratos de *Ocimum gratissimum* com maior atividade bactericida (IINAB, com desinibidor), enquanto que o extrato obtido por hidroalcoólatura apresenta atividade nula, sendo que todos os valores são diferentes significativamente entre si. A maior atividade bacteriostática (IINIB, sem desinibidor) é observada também na forma de extração alcoólica, seguida da hidroalcoólica, da decocção de planta seca e da decocção de planta *in natura*, sendo que todos os valores foram diferentes significativamente entre si. Quando avaliadas individualmente para cada tipo de extrato, as atividades bactericida (IINAB, com desinibidor) e bacteriostática (IINIB, sem desinibidor), apresentam sempre diferenças significativas.

Tabela 7 – Avaliação da relação entre as diferentes formas de extração das soluções conservantes de *Ocimum gratissimum* na presença ou ausência de desinibidores bacterianos, independente dos fatores tempo de confrontação e espécie bacteriana de interesse em alimentos.

Tipos de Extração	Tratamento com presença ou ausência de desinibidores	
	IINAB	IINIB
Decocto com planta verde	0,42 ^{bA*}	1,42 ^{aB*}
Decocto com planta seca	0,67 ^{cA}	1,67 ^{bB}
Hidroalcoólatura (planta seca)	0,00 ^{aA}	3,75 ^{cB}
Alcoólatura (planta verde)	4,17 ^{dA}	8,58 ^{dB}

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as diferentes formas de extração e letras maiúsculas diferentes sobrescritas (^A) na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos com presença e ausência de desinibidor bacteriano para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

Em síntese, todos os extratos de *Ocimum gratissimum* originados das diferentes tipos de extração, apresentam capacidade de inibição e/ou inativação seletivas *in vitro* sobre os três inóculos bacterianos de interesse em alimentos estudados, tendo a forma de extração alcoólica (etanol evaporado em sistema de rota-vapor com reconstituição hídrica sob assepsia) apresentado atividade antibacteriana mais intensa (inibição/inativação) frente aos três agentes. A bactéria mais sensível à atividade antibacteriana de todos os extratos é *Salmonella* Enteritidis. *Staphylococcus aureus* apresenta a menor sensibilidade às formas de decocção, enquanto que *Escherichia coli* apresenta menor sensibilidade ao extrato de *Ocimum gratissimum* obtido por extração hidroalcoólica. Os resultados *in vitro* sugerem a perspectiva da continuidade de estudos objetivando a aplicação de diferentes métodos de obtenção de extrato de *Ocimum gratissimum*, tanto para serem utilizados como solução conservante como condimentos alimentares, com perspectiva de qualidade, segurança e sensorialidade alimentar.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo apoio e financiamento continuados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, N.J. DE; MACÊDO, J.A.B. DE. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela. 1996. 182p.

AVANCINI, C. A. M. **Desinfecção em saúde e produção animal: bacteriostasia e bacteriocidia de *Baccharis trimera* (Less) D. C. — Compositae — (“carqueja”) frente a microrganismos entéricos e cutâneos**. 1995. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias, UFRGS, Porto. Alegre, 1995.

AVANCINI, C. A. M. **Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas do Sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hypericum caprifoliatum*- Cham e Schlecht. Hypericaceae (Guttiferae) — (“escadinha”/”sinapismo”) para uso**

como desinfetante e antisséptico. 2002. 309p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias, UFRGS. Porto Alegre, 2002.

BRAUN-BLANQUET, J. **Fitossociologia: bases para el estudio de las comunidades vegetales.** . 1.ed. Madrid: Ed. M. Blume Ediciones, 1979. 820p.

CHAH, K.F., *et al.* Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p.164–167, 2006.

CAVALLI-SFORZA, L. **Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistic (Biometria: fundamentos de estatística viológica-médica).** Stuttgart: Gustav Fisher V. 1974. p.201-204.

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

DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft). **Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin. (Normas para o teste de desinfetantes químicos para a medicina veterinária).** Giessen, 1980. In: SCHLIESSER, Th.; STRAUCH, D. **Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft. (Desinfecção aplicada à Produção Animal, a Frigoríficos e Laticínios).** Stuttgart: Enke Verlag, 1981. 455p.

FARIA, T.J., *et al.* Antifungal Activity of Essential Oil Isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against Phytopathogenic Fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49 (6), p.867-871, 2006.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2 ed. São Paulo: Sinqueira, 1959. 532p.

GIROLOMETTO, G. **Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. (“erva mate”) frente a bactérias zoonóticas em saúde e produção Animal.** 2005. 71p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ILORI, M.O., *et al.* Antidiarrhoeal Activities of *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). **Journal Of Diarrhoeal Diseases Research**, v.14, p.283-285, 1996.

KENT, M.; COKER, P. **Vegetation description and analysis: a practical approach.** . London: Blackwell, 1992. 363p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa SP: Instituto Plantarum, 2002. 544p.

MING, L.C. **Coleta de plantas medicinais**. In DI STASI, L.C. **Plantas medicinais arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. Editora da UNESP. SP, 1996. p.69-86.

MOREIRA, M.R., *et al.* Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT- Food Science and Technology**, v.38, p.565–570, 2005.

NAKAMURA, C.V., *et al.* Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n.5, p.675-678, 1999.

NGUEFACK, J.; *et al.* Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.329–334, 2004.

ORAFIDIYA, A.O., *et al.* The formulation of an effective topical antibacterial product containing *Ocimum gratissimum* leaf essential oil. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 12, n. 1, p.16-21, 2002.

OUSSOU, K.R., *et al.* Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. **Chimie**, v. 7,, p.1081-1086, 2004.

REYBROUCK, G. Efficacy of inactivators against 14 disinfectant substances. **Bakteriologie und Hygiene. Zentralblatt: Abt. Orig. b.**, Stuttgart. V.68, p. 480-92, 1979.

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.41, p.269-72, 1998.

ROMEIRO, R.S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Disciplina FIP- 640. Bactérias Fitopatogênicas, Roteiro das aulas práticas, Aula 08 Unidade 09 Técnica da microgota. Disponível em <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>>. Acesso em: 23 mar. 2007.

SARTORATTO, A., *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.275-280, 2004.

SISVAR 5.0. **Softwares Downloads**. Disponível em <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/softwares.htm>>. Acesso em: 23 set. 2007.

SOUZA, A.A. **Aspectos etnobiológicos e avaliação da atividade antibacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. - Verbenaceae - (“garupa”, “erva santa”) sobre agentes de importância em saúde e produção animal**. 2005. 87p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SULLIVAN, K. **The complete family guide to natural home remedies**. Boston, Massachusetts: ELEMENT, 1997. 256p.

UEDA-NAKAMURA, T., *et al.* Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v.55 p. 99–105, 2006.

Capítulo 4

Artigo: Inativação bacteriana e sensorialidade em bebidas formuladas a partir de extrato reconstituído de *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) – Labiatae - (Lamiaceae).

Submetido a Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA).

Inativação bacteriana e sensorialidade em bebidas formuladas a partir de extrato reconstituído de *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) – Labiatae - (Lamiaceae).

PASSOS, M.G.¹; CARVALHO, H.H.¹; WIEST, J.M.^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/ RS, Brasil. *Correspondência: J.M.Wiest – ICTA/UFRGS, Campus do Vale, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15090, CEP 91505-970, Porto Alegre – RS / Brasil. E-mail: jmwiest@ufrgs.br

RESUMO: A partir da formulação de quatro bebidas, duas alcoólicas e duas não alcoólicas, com e sem açúcar respectivamente, a partir de extrato reconstituído (alcoholatura/planta verde) de *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) – Labiatae - (Lamiaceae) em diferentes concentrações (5%, 15% e 30%), foi determinada, através de Testes de Suspensão em Sistema de Tubos Múltiplos, a Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB/bactericida), sobre *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076), bem como a aceitabilidade/preferência sensorial por Escala Hedônica destes quatro produtos. Todas as formulações apresentaram atividade bactericida para *Salmonella* Enteritidis, diretamente proporcional às concentrações do extrato e ao tempo de exposição da bactéria às bebidas, destacando-se neste sentido a formulação não alcoólica com açúcar. Na análise sensorial a preferência aumentou com o decréscimo da concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* na formulação. A bebida não alcoólica com açúcar, na concentração de 5% de extrato, destacou-se na preferência sensorial/aceitabilidade.

Palavras-chave: análise sensorial, alfavaca, *Salmonella* Enteritidis.

ABSTRACT: From four drinks formulation, two alcoholic and two no-alcoholic, with and without sugar respectively; from reconstituted extract (alcoholature/green plant) of *Ocimum gratissimum* L. (African basil) - Labiatae - (Lamiaceae) at different concentrations (5%, 15% and 30%) was determined by Suspension Tests in

Multiple Tubes System the Activity Intensity of Bacterial Inactivation (IINAB/bactericidie) on *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) and the acceptability/sensory preference by Hedonic Scale of these four products. All formulations showed bactericidal activity on *Salmonella* Enteritidis, directly proportional to the extract concentrations and the exposure time of the bacterium in beverages, pointing the not alcohol with sugar formulation. In the sensorial analysis the preference increased with the decrease of the extract concentration of *Ocimum gratissimum*. The no-alcoholic beverage with sugar, in the extract concentration of 5%, pointed in the sensorial preference//acceptability.

Keywords: sensorial analisys, alfavaca, *Salmonella* Enteritidis.

1. INTRODUÇÃO

A busca por alimentos seguros livre de microrganismos patogênicos e degradadores, tem sido uma preocupação de Órgãos Governamentais e dos consumidores. Neste sentido, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com plantas utilizadas na medicina popular e na gastronomia tradicional, avaliando suas atividades bactericidas e fungicidas (AHN; GRÜN; MUSTAPHA, 2007; MOREIRA *et al*, 2005; NGUEFACK *et al*. 2004; ŞAHIN *et al.*, 2004; TEPE *et al.*, 2004; JIROVETSZ *et al*, 2003; SAĞDIÇ; ÖZCAN, 2003, HAMMER, CARSON; RILEY, 1999).

O gênero *Ocimum* pertence à família Labiatae (Lamiaceae), possuindo 30 espécies de ervas que são encontradas em regiões tropicais e subtropicais. *Ocimum gratissimum* L. é uma planta que possui aroma forte e agradável popularmente chamado de “alfavacão”, “alfavaca” e “alfavaca-cravo” com origem no oriente, subespontâneo em todo o Brasil e do qual existem diversos quimiotipos. Várias espécies de *Ocimum* são plantas classicamente fornecedoras de óleos essenciais, largamente utilizados como temperos de pratos especiais e aromatizantes de licores e de perfumes finos (LORENZI; MATOS, 2002).

Diferentes autores comparam as atividades bactericida e fungicida de plantas com indicativo medicinal ou condimentar, incluindo *Ocimum gratissimum* (FARIA *et al.*, 2006; NGUEFACK, BUDDE; JAKOBSEN, 2004; NAKAMURA *et al.*, 2004;

SARTORATTO *et al.*, 2004; ORAFIDIYA *et al.*, 2001; NAKAMURA *et al.*, 1999). Chah (2006) avaliou as propriedades antibacterianas e cicatrizantes de plantas medicinais, sobre *Staphylococcus aureus* e *E. coli*. Nguefack *et al.* (2004) testaram a atividade antifúngica sobre agentes degradantes e produtores de micotoxina, sugerindo o uso de *Ocimum gratissimum*, na formulação de bebidas não alcoólicas.

Segundo a normatização brasileira de bebidas, um dos tipos referidos, que pode ser alcoólico ou não, é o aperitivo a base de plantas. A legislação, ainda refere, que aperitivo é uma bebida com graduação alcoólica de meio a cinquenta e quatro por cento em volume, a vinte graus Celsius, contendo princípios amargos ou aromáticos, com características aperitivas ou estimulantes do apetite, obtidas a partir de extratos de um ou mais vegetais, ou parte dos mesmos. Ao aperitivo poderá ser adicionado açúcares, bem como substâncias saborizantes, aromatizantes, corantes e outros aditivos permitidos. O aperitivo cujo sabor seja predominantemente amargo se denominará de: "*Fernet*" , "*Bitter*", amargo ou amaro (BRASIL, 1994).

Este trabalho tem como objetivo avaliar a Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB/bactericidia) de bebidas alcoólica e não alcoólica, na presença ou ausência de açúcar respectivamente, formuladas a partir de extrato reconstituído de *Ocimum gratissimum* (alcoholatura/planta verde) sobre *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076), bem como determinar, através de análise sensorial, a aceitabilidade/preferência destes produtos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta da planta e elaboração do extrato reconstituído

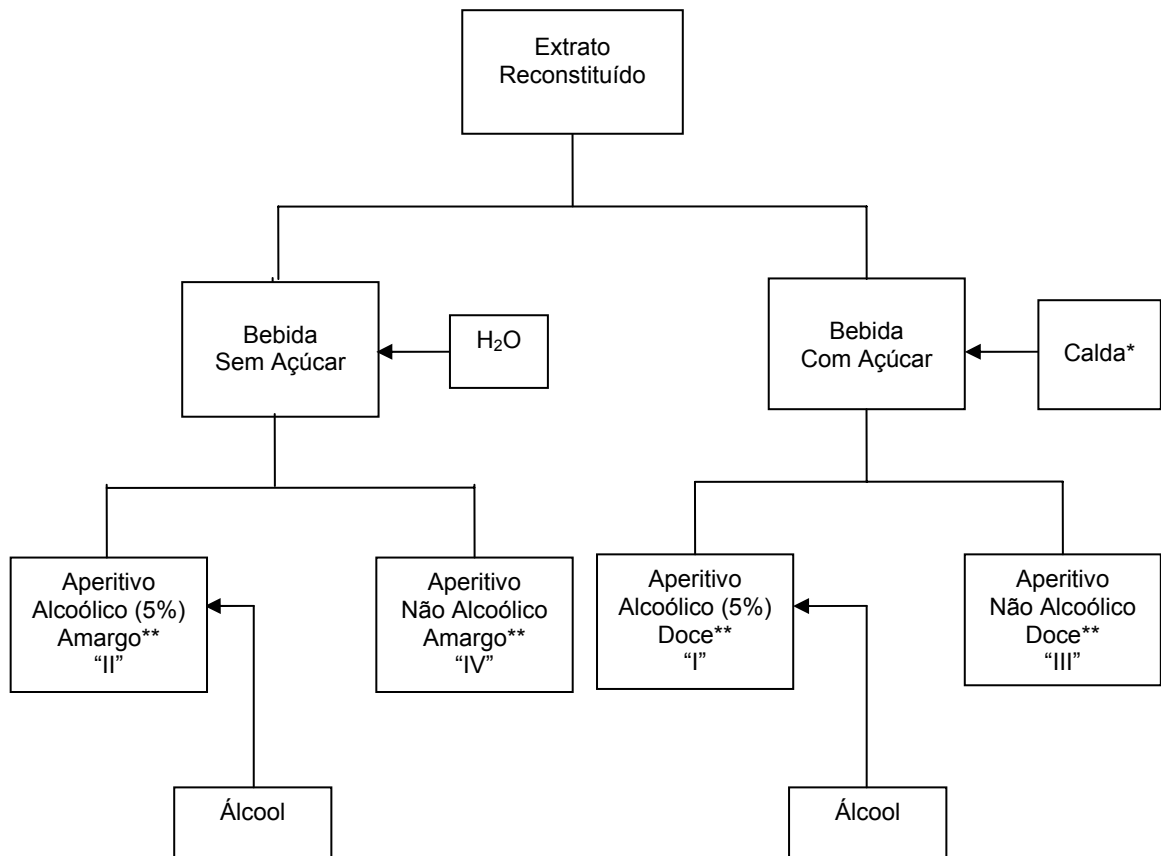
A planta *Ocimum gratissimum* foi acessada em propriedade agroecológica familiar em Parque Eldorado, Município de Eldorado do Sul, região metropolitana de Porto Alegre RS/Brasil (coordenadas de 30° 05' S e 51° 40' W), constituindo-se de um "pool" de partes vegetativas e reprodutivas de exemplares subespontâneos e ruderais. Nesta propriedade, segundo a escala ACFOR de Kent e Coker (1992), *Ocimum gratissimum* se classifica na categoria de "freqüente". Aplicando-se a escala de sociabilidade de Braun-Blanquet (1979) a planta se apresentava em pequenos grumos ou tufos de indivíduos não cultivados.

O material colhido foi herborizado segundo Ming (1996) e catalogado pela bióloga Silvia Marodin (CRBio/RS nº 17268), sendo a duplicata botânica incorporada ao Herbário do Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, recebendo número de registro 150160.

Talos, folhas e flores da planta foram submetidos ao processo de extração alcoólica (alcoholatura/planta fresca), para obtenção do extrato reconstituído, segundo Farmacopéia (1959). As amostras vegetais recém colhidas foram trituradas grosseiramente e colocadas em álcool etílico, de cereais, a 96 °GL, na proporção de 400 g de planta para 1000 ml de álcool. Após um período de quinze dias, o extrato alcoólico foi submetido à destilação fracionada sob pressão reduzida em sistema rotavapor, desprezando-se a porção alcoólica e reidratando-se o extrato resultante com água destilada estéril, reconstituindo-se as concentrações iniciais da planta, sendo esta solução utilizada como base para formulação das bebidas.

2.2 Preparação das bebidas

As bebidas foram formuladas a partir do extrato reconstituído da planta *Ocimum gratissimum* nas concentrações de 5%, 15% e 30%. Para cada uma das concentrações de extrato foram preparados quatro tipos de formulações (Figura 1), a saber: bebida alcoólica com presença de açúcar (aperitivo doce/ "I"); bebida alcoólica com ausência de açúcar (aperitivo amargo/ "II"), bebida não alcoólica com presença de açúcar (aperitivo doce/ "III") e bebida não alcoólica com ausência de açúcar (aperitivo amargo/ "IV").



* Calda na proporção de 1:1 de açúcar e água destilada, autoclavada durante 15min a 121°C.

** Cada bebida foi preparada em três concentrações de extrato reconstituído (5, 15 e 30%).

Figura 1- Fluxograma de elaboração dos quatro tipos de bebidas (aperitivos)

Foi realizado ensaio preliminar para a determinação de teor alcoólico utilizado nas bebidas que não interferisse na atividade bactericida posteriormente testada. As concentrações avaliadas foram elaboradas com álcool etílico, de cereais, a 96 °GL, em água destilada estéril, nas graduações alcoólicas, (%/V) à 20° C de: 0,0 (branco); 0,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0; 45,0; 50,0 e 54,0. Em 5mL de cada uma destas concentrações foi inoculado 500 µL de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) com $1,27 \times 10^9$ UFC/mL. Após 24hs de exposição em incubação aeróbia à 37 °C foram transferidas alíquotas de cada concentração testada, através da técnica de microgota (ROMEIRO, 2007), para placas de Petri contendo meio de cultura "Plate Count Agar" (PCA®), efetivando-se avaliação final de crescimento bacteriano, novamente após 24 horas de incubação aeróbia à 37 °C. Este procedimento foi repetido para os tempos de exposição de 48, 72 e 144

horas. A graduação alcoólica definida pelo teste como inócua ao crescimento de *Salmonella* foi de 5%/V, sendo adotada como constante na formulação das bebidas em estudo.

2.3 Inóculo bacteriano

Para o desenvolvimento do Teste de Suspensão foi utilizada amostra padrão American Type Culture Collection (ATCC) de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076), proveniente da coleção-bacterioteca do Laboratório de Higiene de Alimentos do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A amostra foi reativada em meio de cultura "Brain Heart Infusion" (BHI OXOID®) à 37°C por um período de 18 a 24 horas de incubação aeróbia, com o objetivo de atingir uma concentração $\geq 1,0 \times 10^8$ UFC/mL, através de diluições seriais logarítmicas (AVANCINI, 2002). A avaliação da concentração inicial foi realizada através da técnica da microgota (ROMEIRO, 2007) e a contagem de microrganismos viáveis concretizada em placas de Petri contendo meio de cultura "Plate Count Agar" (PCA®). Foram realizadas diluições seriadas, a partir do inóculo, transferindo-se 1 ml deste para tubos de ensaio contendo 9 ml de água peptonada 0,1% para obter a diluição 10^{-1} . Este procedimento foi realizado sucessivamente até a diluição 10^{-8} para definir a melhor diluição de contagem. Para cada diluição foram transferidas três gotas das suspensões para as placas utilizando micropipetas de 15 μ L e a leitura realizada em 24 horas de incubação aeróbia à 37°C. O valor final considerado como UFC/mL constituiu a média das contagens das gotas triplicadas, avaliadas biometricamente segundo Cavalli-Sforza (1974).

2.4 Teste de Suspensão

Para avaliação da intensidade da atividade antibacteriana presente nos quatro tipos de bebidas formuladas com extrato reconstituído de *Ocimum gratissimum*, lida como Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB), utilizou-se o Teste de Suspensão, segundo Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG, 1980), com base na Técnica do Sistema de Tubos Múltiplos, modificada por Avancini (2002), acrescido dos desinibidores bacterianos segundo DVG (1980), Andrade e Macedo (1996), Reybrouck (1979; 1998), buscando desta maneira garantir a preditividade dos resultados de isolamentos negativos

interpretados como bactericidia verdadeira (CORTES, 1993). O controle permanente da assepsia destes procedimentos de montagem do Sistema de Tubos Múltiplos realizou-se por autoclavagem. Todas as formulações, a partir do extrato reconstituído da planta (em concentrações de 5%, 15% e 30%), foram confrontadas com oito diluições seriais logarítmicas (10^1 a 10^8 UFC/mL) do inóculo de *Salmonella* ativada a partir da bacterioteca. A sensibilidade ou resistência das diferentes diluições de *Salmonella* confrontadas com o extrato reconstituído em suas diferentes concentrações nas bebidas formuladas foi verificado através da presença ou ausência de bactérias viáveis em alíquotas transferidas de todos os tubos do Teste de Suspensão, por alça bacteriológica calibrada (0,05 ml), após 24, 48, 72 e 144 horas de incubação aeróbia à 37 °C dos diferentes Testes de Suspensão, a tubos de ensaio, contendo 5 mL de meio de cultura “Brain Heart Infusion” (BHI OXOID®) e incubadas por sua vez, durante 24 horas em aerobiose à 37° C, efetivando-se, finalmente, a avaliação de crescimento bacteriano ou de bactericidia/inativação.

Os resultados do confronto de *Salmonella* com as diferentes formulações de bebidas foram representados por variáveis ordinais arbitrárias (Tabela 1), que assumiram valores de 8 (oito) a 0 (zero), indicando a intensidade da atividade de inativação bacteriana das bebidas.

TABELA 1 - Valores ordinais arbitrários de intensidade de atividade atribuídos a variável Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos.

8	7	6	5	4	3	2	1	0	Variáveis ordinárias de intensidade de atividade
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	n.a	UFC/mL – diluições de inóculo
10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0	n.a	inativadas UFC/mL – doses infectantes inativadas

2.5 Análise sensorial

Para a análise sensorial foi utilizada a escala hedônica para avaliação de preferência e aceitabilidade das bebidas (aperitivos) por 27 provadores não treinados (DUTCOSKY, 1996). Para tal foi utilizada a escala de 09 (nove) pontos, variando do “desgosto muitíssimo” ao “gosto muitíssimo”. A escala Hedônica foi aplicada em dias diferentes agrupando as bebidas com açúcar e em açúcar, com o

objetivo que os provadores não favorecessem, uma bebida em detrimento a outra e para evitar também a fadiga sensorial dos provadores.

2.6 Análise estatística

Os resultados do teste de escala Hedônica e do teste de suspensão foram tratados através do programa de análises estatísticas Sisvar 5.0, sendo realizadas a Análise de Variância (Anova) e teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Inativação de *Salmonella* através do Teste de Suspensão

O Quadro 1 demonstra a síntese dos resultados da atividade antibacteriana de extratos reconstituídos (alcoolatura/planta verde) de *Ocimum gratissimum*, em quatro formulações de bebidas com a presença e ausência de álcool e a presença e ausência de açúcar, respectivamente, sobre *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076, relacionando os seguintes fatores: tempo de confrontação (exposição) da bactéria na bebida (5, 15, 30 e 60 min), tempo de incubação (24, 48, 72 e 144 horas), concentração final do extrato reconstituído.

	Bebidas	Extrato 30%				Extrato 15%				Extrato 5%			
		Alcoólica	Alcoólica	Não Alcoólica	Não Alcoólica	Alcoólica	Alcoólica	Não Alcoólica	Não Alcoólica	Alcoólica	Alcoólica	Não Alcoólica	Não Alcoólica
Tempo de Incubação (h)	Tempo de confronto (min)	Com Açúcar	Sem Açúcar	Com Açúcar	Sem Açúcar	Com Açúcar	Sem Açúcar	Com Açúcar	Sem Açúcar	Com Açúcar	Sem Açúcar	Com Açúcar	Sem Açúcar
24	5	4	0	5	0	0	0	2	2	0	0	1	1
	15	6	4	5	6	0	3	2	2	0	0	1	1
	30	6	5	6	6	3	3	2	2	2	0	1	0
	60	7	6	7	7	4	3	2	2	2	1	1	0
48	5	4	0	5	0	0	0	2	2	0	0	0	0
	15	6	4	5	6	0	3	2	2	0	0	0	0
	30	6	5	6	6	2	3	2	2	0	0	0	0
	60	7	6	7	7	2	3	2	2	0	1	0	0
72	5	4	0	5	0	0	0	2	2	0	0	0	0
	15	6	4	5	6	0	3	2	2	0	0	0	0
	30	6	5	6	6	2	3	2	2	0	0	0	0
	60	7	6	7	7	2	3	2	2	0	1	0	0
144	5	4	0	5	0	0	0	2	2	0	0	0	0
	15	6	4	5	6	0	3	2	2	0	0	0	0
	30	6	5	6	6	2	3	2	2	0	0	0	0
	60	7	6	7	7	2	3	2	2	0	1	0	0

Quadro 1 - Intensidade da Atividade Inativação Bacteriana/bactericida (IINAB) de diferentes concentrações de extrato reconstituído (alcoólatura/planta verde) de *Ocimum gratissimum*-("alfavacão", "alfavaca", "alfavaca-cravo") – Labiatae (Lamiaceae) sobre *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) determinada através de Teste de Suspensão, em bebidas formuladas na presença e ausência de álcool e de açúcar, respectivamente, segundo diferentes tempos de incubação e de confronto.

Quando avaliados os tempos de exposição da bactéria nas bebidas, independentemente das demais variáveis manipuladas (Tabela 2), estes apresentaram diferenças significativas entre si. Nesta Tabela, o tempo de exposição de 60 minutos apresentou valor superior aos demais tempos, seguido de 30, 15 e 5 minutos. A atividade antibacteriana apresentou-se diretamente proporcional ao tempo de exposição ou contato ao extrato da planta. Autores como Sartorato *et al.* (2004), Nakamura *et al.* (1999) e Akinyemi *et al.* (2004) também descrevem atividade bactericida de extratos de *Ocimum gratissimum* sobre *S. Enteritidis*, porém utilizando diferentes técnicas de avaliação.

Tabela 2 – Avaliação da atividade antibacteriana de extrato reconstituído de *Ocimum gratissimum* sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo tempo de confrontação (exposição), independente dos fatores: tempo de incubação, concentração do extrato, presença ou ausência de álcool e presença e ausência de açúcar nas bebidas.

Tempo de confrontação (min)	Número Arbitrário
5	1,13 ^{a*}
15	2,38 ^b
30	2,75 ^c
60	3,19 ^d

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tempos de confrontação (exposição) para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

A Tabela 3 apresenta a avaliação dos tempos de incubação da bactéria nas bebidas, independentemente das demais variáveis manipuladas, estes não apresentaram diferenças significativas entre si. O tempo de incubação de 24 horas apresentou valor superior aos demais tempos, sendo que os restantes apresentaram mesmo valor.

Tabela 3 – Avaliação da atividade antibacteriana de extrato reconstituído de *Ocimum gratissimum* sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo tempo de incubação, independente dos fatores: tempo de confrontação (exposição), concentração do extrato, presença ou ausência de álcool e presença e ausência de açúcar nas bebidas.

Tempo de incubação (h)	Número Arbitrário
72 *	2,29 ^a
114	2,29 ^a
48	2,29 ^a
24	2,56 ^a

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tempos de incubação para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

Quando avaliadas as diferentes concentrações de *Ocimum gratissimum* nas bebidas, independentemente das demais variáveis manipuladas, estas apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 4). A concentração de 30% apresentou valor bem superior as demais concentrações, seguida de 15% e 5%. À medida que aumentou a concentração de extrato aumentou a atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis. Estes resultados encontram-se em concordância com trabalhos de outros pesquisadores com a planta em questão (Sartorrato *et al.*, 2004; Akinyemi *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 1999).

Tabela 4 – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo as concentrações de extrato de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores: tempo de confrontação (exposição), tempo de incubação, presença ou ausência de álcool nas bebidas e presença e ausência de açúcar nas bebidas.

Concentrações de extrato de <i>Ocimum gratissimum</i>	Número Arbitrário
5 *	0,22 ^a
15 *	1,86 ^b
30 *	5,00 ^c

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre concentrações de extrato de *Ocimum gratissimum* para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

Avaliando os tipos de bebidas quanto à presença e ausência de álcool, independentemente das demais variáveis manipuladas, estas apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 5). A bebida não alcoólica apresentou valor superior à bebida alcoólica. Estes resultados reforçam a não interveniência antibacteriana do álcool presente em duas das formulações estudadas, conforme já fora determinado em testes anteriores.

Tabela 5 – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo a presença e ausência de álcool, independente dos fatores: tempo de confrontação (exposição), tempo de incubação, concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* e presença e ausência de açúcar nas bebidas.

Presença e ausência de álcool	Número Arbitrário
Alcoólica *	2,24 ^a
Não Alcoólica	2,48 ^b

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as bebidas alcoólica e não alcoólica para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

Na Tabela 6, quando avaliados os tipos de bebidas quanto à presença e ausência de açúcar, independentemente das demais variáveis manipuladas, estas apresentaram diferenças significativas entre si. A bebida com açúcar apresentou valor superior à bebida sem açúcar. Uma possível hipótese para esta observação poderia ser a interveniência da pressão osmótica mais elevada contribuindo com a atividade bactericida, embora o açúcar, por sua vez, como matéria orgânica, funcione potencialmente como protetor bacteriano diminuindo a eficácia de soluções antimicrobianas em geral segundo Schliesser e Strauch (1981).

Tabela 6 – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo a presença e ausência de açúcar, independente dos fatores: tempo de confratação (exposição), tempo de incubação, concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* e presença e ausência de álcool nas bebidas.

Presença e ausência de açúcar	Número Arbitrário
SEM *	2,19 ^a
COM	2,53 ^b

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as bebidas com e sem açúcar para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

Ao analisar a concentração de 5% de extrato da planta não foi observada diferença significativa entre os tempos de exposição (Tabela 7). Na concentração de 15% de extrato não houve diferenças significativas entre os tempos de exposição de 15 e 30 min e entre 30 e 60 min. Já na concentração de 30% de extrato não houve diferenças significativas entre os tempos de exposição de 15 e 30 min. Quando avaliadas as concentrações de extrato, individualmente em cada um dos tempos de exposição, houve diferenças significativas em todos eles. Os resultados são superiores a medida que aumentam os tempos de exposição e as concentrações de extrato de *Ocimum gratissimum*.

Tabela 7 – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo a correlação entre o tempo de confratação (exposição) e as concentrações de extrato de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores: tempo de incubação presença e ausência de açúcar nas bebidas e a presença ausência de álcool nas bebidas.

Tempo de confratação *	Concentrações de extrato **		
	5%	15%	30%
5	0,13 ^{aA}	1,00 ^{aB}	2,25 ^{aC}
15	0,13 ^{aA}	1,75 ^{bB}	5,25 ^{bC}
30	0,19 ^{aA}	2,31 ^{bcB}	5,75 ^{bC}
60	0,44 ^{aA}	2,38 ^{cB}	6,75 ^{cC}

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos de confratação e letras maiúsculas diferentes sobrescritas (^A) na mesma linha indicam diferenças significativas entre as diferentes concentrações de extrato de *Ocimum gratissimum* para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

3.2 Análise sensorial

Quando avaliadas as bebidas quanto a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum*, independentemente dos outros fatores, estas apresentaram diferenças significativas (Tabela 8). A concentração de extrato preferida foi a de 5% recebendo a avaliação da escala hedônica de “não desgostei nem gostei”. A concentração de 15% de extrato apresentou avaliação de “desgostei ligeiramente” e 30% de “desgostei moderadamente”.

Estes resultados podem ser explicados pela ação da bebida amarga que possivelmente reduza a media de aceitabilidade das bebidas de forma geral.

Tabela 8 - Avaliação das bebidas formuladas segundo a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* independentes da presença e ausência de açúcar e presença e ausência de álcool.

Concentração de Extrato	Aceitabilidade
30%	3,60 ^a
15%	4,51 ^b
5%	5,40 ^c

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as concentrações de extrato de *Ocimum gratissimum* para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

A análise das bebidas quanto à presença e ausência de álcool em relação às diferentes concentrações de extrato de *Ocimum gratissimum* descritas na Tabela 9, apresentou diferenças significativas nas bebidas não alcoólicas, quando comparadas somente às diferentes concentrações de extrato. A bebida não alcoólica com concentração de 5% foi superior na aceitabilidade (escala hedônica nas categorias “não desgostei nem gostei”), seguida de 15% (“desgostei ligeiramente”) e 30% (“desgostei moderadamente”). Já nas bebidas alcoólicas as concentrações de 15% e 30% de extratos não apresentaram diferenças significativas. A bebida alcoólica com concentração de 5% foi superior na aceitabilidade (“não desgostei nem gostei”), seguida de 15% (“desgostei ligeiramente”) e 30% (“desgostei moderadamente”). Quando comparadas às bebidas alcoólicas e não alcoólicas em cada concentração de extrato individualmente, observou-se, na concentração de 5% diferença significativa, enquanto que nas concentrações de 15% e 30% não houve diferença.

Tabela 9 - Avaliação das bebidas formuladas segundo a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* correlacionada com a presença e ausência de álcool, independentes da presença e ausência de açúcar.

Concentração de extrato (%)	Bebida	
	Alcoólica	Não Alcoólica
30	3,67 ^a	3,54 ^a
15	4,39 ^{ab}	4,63 ^b
5	5,06 ^{b*}	5,74 ^{c*}

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os diferentes concentrações de extrato reconstituído de *Ocimum gratissimum* nas bebidas e letras maiúsculas diferentes sobrescritas (^A) na mesma linha indicam diferenças significativas entre as diferentes bebidas: alcoólicas e não alcoólicas para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

A análise das bebidas quanto à presença e ausência de açúcar em relação às diferentes concentrações de extrato de *Ocimum gratissimum* (Tabela 10) apresentou diferenças significativas nas bebidas com açúcar, quando comparadas somente as diferentes concentrações de extrato. A bebida açucarada com concentração de 5% foi superior na aceitabilidade (“gostei ligeiramente”), seguida de 15% (“não desgostei nem gostei”) e 30% (“desgostei ligeiramente”). Já nas bebidas sem açúcar as concentrações de 15% e 5% de extratos não apresentaram diferenças significativas. A bebida não açucarada com concentração de 5% foi superior na aceitabilidade (“não desgostei nem gostei”), seguida de 15% (“desgostei ligeiramente”) e 30% (“desgostei moderadamente”). Quando comparadas as bebidas com e sem açúcar, segundo cada concentração de extrato, individualmente, observaram-se diferenças significativas em todos os extratos. As bebidas com açúcar em comparação às sem açúcar obtiveram valores numéricos de aceitabilidade superiores em todas as concentrações.

Tabela 10 - Avaliação das bebidas formuladas segundo a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* correlacionada com a presença e ausência de açúcar, independentes do fator de presença e ausência de álcool.

Concentração de extrato (%)	Açúcar	
	COM	SEM
30	4,09 ^{a*}	3,11 ^{a*}
15	4,93 ^{b*}	4,09 ^{b*}
5	5,96 ^{c*}	4,83 ^{b*}

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as diferentes concentrações de extratos reconstituído de *Ocimum gratissimum* nas bebidas e letras maiúsculas diferentes sobrescritas (^A) na mesma linha indicam diferenças significativas entre as diferentes bebidas: com presença e ausência de açúcar para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

4. CONCLUSÕES

Todas as bebidas apresentaram atividade bactericida frente *Salmonella* Enteritidis. A ação anti-salmonela aumentou à medida que aumentaram as concentrações de extrato da planta na bebida e o tempo de exposição da bactéria à bebida. A bebida não alcoólica com a presença de açúcar apresentou a maior atividade bactericida sobre *Salmonella* Enteritidis. Na análise sensorial a preferência às bebidas cresceu com o decréscimo da concentração de extrato de *Ocimum gratissimum*. A bebida preferencial foi a que apresentou 5% de concentração de extrato, não alcoólica e com presença de açúcar.

Os resultados indicam perspectivas de aplicação de extratos reconstituídos de *Ocimum gratissimum* no desenvolvimento de alimentos, pela sua ação bactericida e suas propriedades sensoriais. Dentre as bebidas destaca-se a formulação sem álcool, licorosa, potencialmente direcionável à faixa de população abstêmia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, J.; GRÜN, I.U.; MUSTAPHA, A. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. **Food Microbiology**, London, v.24, p.7–14, feb. 2007.

AKINYEMI, K.O., *et al.* Screening of some medicinal plants for anti salmonella activity. **J. Herb Pharmacother**, v. 5, n. 1: p.45-60, 2004.

ANDRADE, N.J. DE; MACÊDO, J.A.B.DE. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela. 1996. 182p.

AVANCINI, C. A. M. **Desinfecção em saúde e produção animal: bacteriostasia e bacteriocidia de *Baccharis trimera* (Less) D. C. — Compositae — (“carqueja”) frente a microrganismos entéricos e cutâneos**. 1995. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias, UFRGS, Porto. Alegre, 1995.

AVANCINI, C. A. M. **Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas do Sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hypericum caprifoliatum*- Cham e Schlecht. Hypericaceae (Guttiferae) — (“escadinha”/“sinapismo”) para uso como desinfetante e antisséptico**. Porto. Alegre, 2002. 309p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária, UFRGS.

BRASIL. Lei n. 8918, de 14 de julho de 1994. Regulamento técnico princípios gerais para a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Intersectorial de Bebidas e

dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 jul. 1994, Seção 1, p. 10661.

BRAUN-BLANQUET, J. **Fitossociologia: bases para el estudio de las comunidades vegetales**. . 1.ed. Madrid: Ed. M. Blume Ediciones, 1979. 820p.

CAVALLI-SFORZA, L. **Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistic**.(Biometria: fundamentos de estatística bilógico-médica). Stuttgart: Gustav Fisher V., p.201-204., 1974.

CHAH, K.F., *et al.* Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p.164–167, 2006.

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em Análise de Alimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 212p., 2001.

CORTES, J.de A. **Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais**. São Paulo: Varela. 227p., 1993.

DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft). **Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin. (Normas para avaliação de desinfetantes químicos para a medicina veterinária)** Giessen, 1980. In: SCHLIESSER, T.; STRAUCH, D.. **Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft.(Desinfecção em produção animal, frigoríficos e laticínios)**. Stuttgart: Enke Verlag, 1981. 455p.

DUTCOSKY, S.D. **Análise sensorial de alimentos**, Curitiba: Editora Champagnat, 123p.,1996.

FARIA, T.J., *et al.* Antifungal Activity of Essential Oil Isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against Phytopathogenic Fungi. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, Curitiba, v.49, n. 6, p. 867-871, nov. 2006.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil: código farmacêutico brasileiro. 2ªed. São Paulo: Sinqueira, p.,1959.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 86, p.985–990, 1999.

JIROVETZ, L., *et al.* Chemotaxonomical analysis of the essential oil aroma compounds of four different *Ocimum* species from southern India. **European Food Research and Technology**, Berlin, v.217, n. 2, p.120-124, aug. 2003.

KENT, M.; COKER, P. **Vegetation description and analysis: a practical approach**. London: Blackwell, 1992. 363p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa SP: Instituto Plantarum, 2002. 544p.

MING, L.C. **Coleta de plantas medicinais**. In DI STASI, L.C. Plantas medicinais arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar. Editora da UNESP. SP, 1996. p.69-86.

MOREIRA, M.R., *et al.* Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT - Food Science and Technology**, Davis v.38, p.565–570, Aug. 2005.

NAKAMURA, C.V., *et al.* Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p.675-678, 1999.

NAKAMURA, C.V., *et al.* In vitro activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. **Research in Microbiology**, Paris, v.155, p.579–586, sep. 2004.

NGUEFACK, J., *et al.* Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.94, p.329–334, aug. 2004.

NGUEFACK, J.; BUDDE, B.B.; JAKOBSEN, M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. **Letters in Applied Microbiology**, Cardiff, v.39, n. 5, p.395–400, jun. 2004.

ORAFIDIYA, L.O., *et al.* The formulation of an effective topical antibacterial product containing *Ocimum gratissimum* leaf essential oil. **International Journal of Pharmaceutics**, London, v.224, p.177–183, aug. 2001.

REYBROUCK, G. Efficacy of inactivators against 14 disinfectant substances. **Bakteriologie und Hygiene. Zentralblatt: Abt. Orig. b.**, Stuttgart. V.68, p. 480-92, 1979.

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.41, p.269-72, 1998.

ROMEIRO, R.S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Disciplina FIP- 640. Bactérias Fitopatogênicas, Roteiro das aulas práticas, Aula 08 Unidade 09 Técnica da microgota. Disponível em <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>>. Acesso em: 23 mar. 2007.

SCHLIESSER, T.; STRAUCH, D. **Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft**. Stuttgart: Enke Verlag, 1981. 455p.

SAĞDIÇ, O.; ÖZCAN, M. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. **Food Control**, Oxford, v.14, p.141–143, apr. 2003.

ŞAHİN, F., *et al.* Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, Oxford, v.15, p.549–557, Oct. 2004.

SARTORATTO, A., *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, p.275-280, 2004.

TEPE, B., *et al.* Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). **Food Chemistry**, Oxford, v.84, p.519–525, mar. 2004.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo financiamento continuado.

Capítulo 5

Discussão Geral.

5. REAPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL

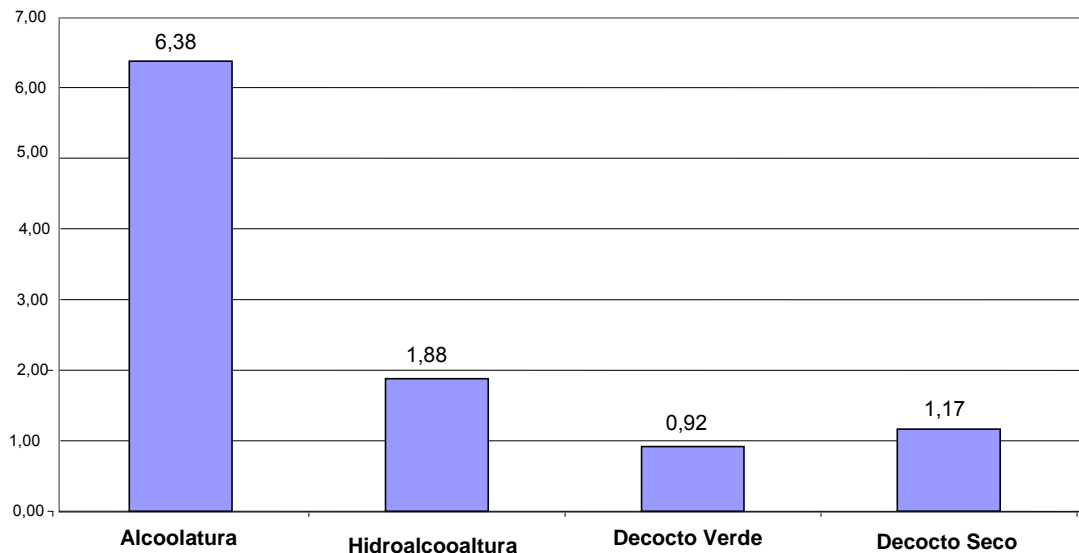
Neste capítulo, os resultados gerais constantes dos artigos I e II, serão reapresentados sob a forma de gráficos, ensejando a discussão geral.

5.1 Teste “*in vitro*”

O Gráfico 1 apresenta o resultado da avaliação da atividade antibacteriana de quatro formas de extrações das soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*. Todas as soluções conservantes originadas das diferentes formas de extração, apresentam capacidade de inibição e/ou inativação seletivas *in vitro* sobre os três inóculos bacterianos de interesse em alimentos estudados, tendo a forma de extração alcoólica (etanol evaporado em sistema de rota-vapor com reconstituição hídrica sob assepsia) apresentado atividade antibacteriana mais intensa (inibição/inativação) frente aos três agentes (*Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli* e *Salmonella Enteritidis*).

Gráfico 1- Avaliação da atividade antibacteriana de quatro formas de extração das soluções conservantes de *Ocimum gratissimum* (valores médios de triplicatas), independente dos fatores tempo de confrontação, espécie bacteriana, presença ou ausência de desinibidores bacterianos.

Valor dos Nº Arbitrários

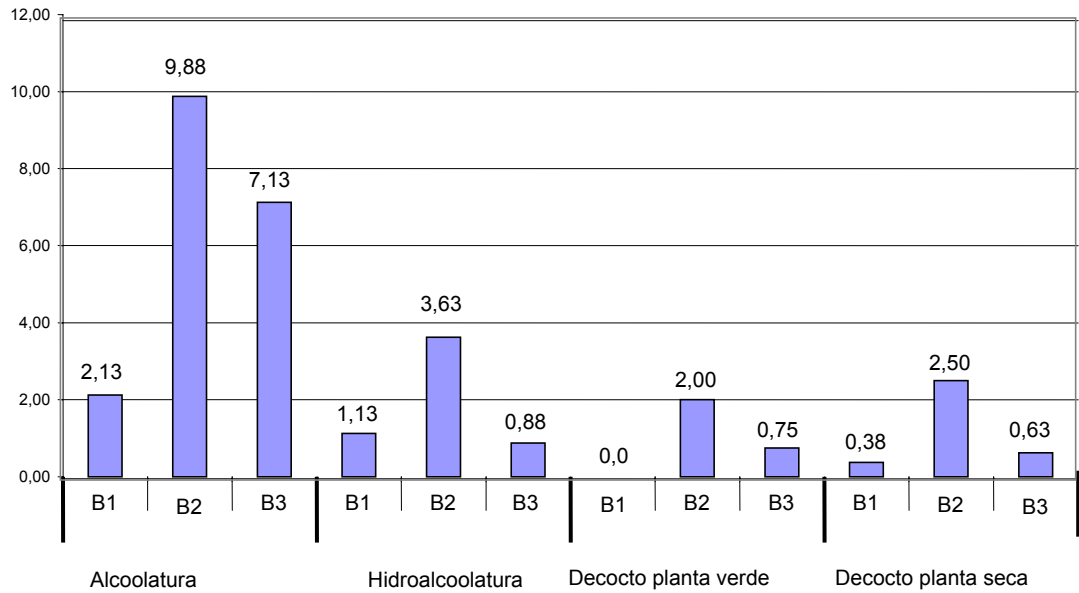


TIPOS DE EXTRAÇÃO

O Gráfico 2 apresenta a avaliação da relação entre as espécies bacterianas e os diferentes tipos de extração das soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*. Já o Gráfico 3 apresenta avaliação da sensibilidade das três espécies bacterianas frente à soluções conservantes. Baseado nestes gráficos a bactéria mais sensível à atividade antibacteriana em todas as soluções conservantes é *Salmonella* Enteritidis. *Staphylococcus aureus* apresenta a menor sensibilidade às formas de decocção, enquanto *Escherichia coli* apresenta frente a forma de extração hidroalcoólica.

Gráfico 2 – Avaliação da relação entre as espécies bacterianas de interesse em alimentos e os diferentes tipos de extração das soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos.

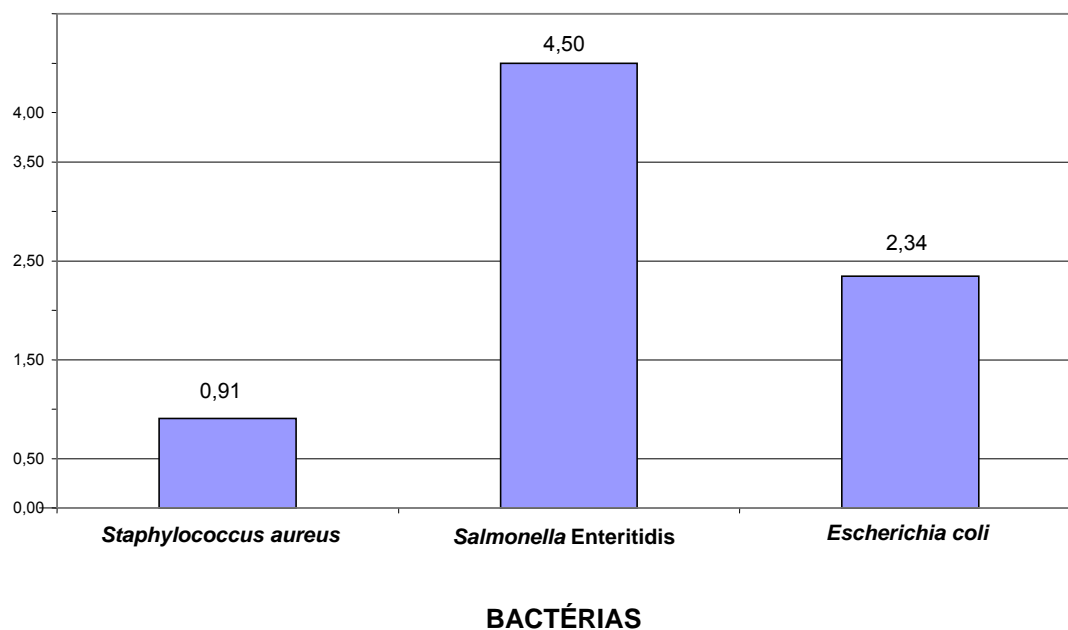
Valor dos Nº Arbitrários



EXTRATO/BACTÉRIAS

B1 = *S. aureus*, B2 = *Salmonella* Enteritidis e B3 = *Escherichia coli*.

Gráfico 3 – Avaliação da sensibilidade de três espécies bacterianas de interesse em alimentos frente à soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores tipo de extração, tempo de confrontação, presença ou ausência de desinfetantes **Valor dos Nº Arbitrários**

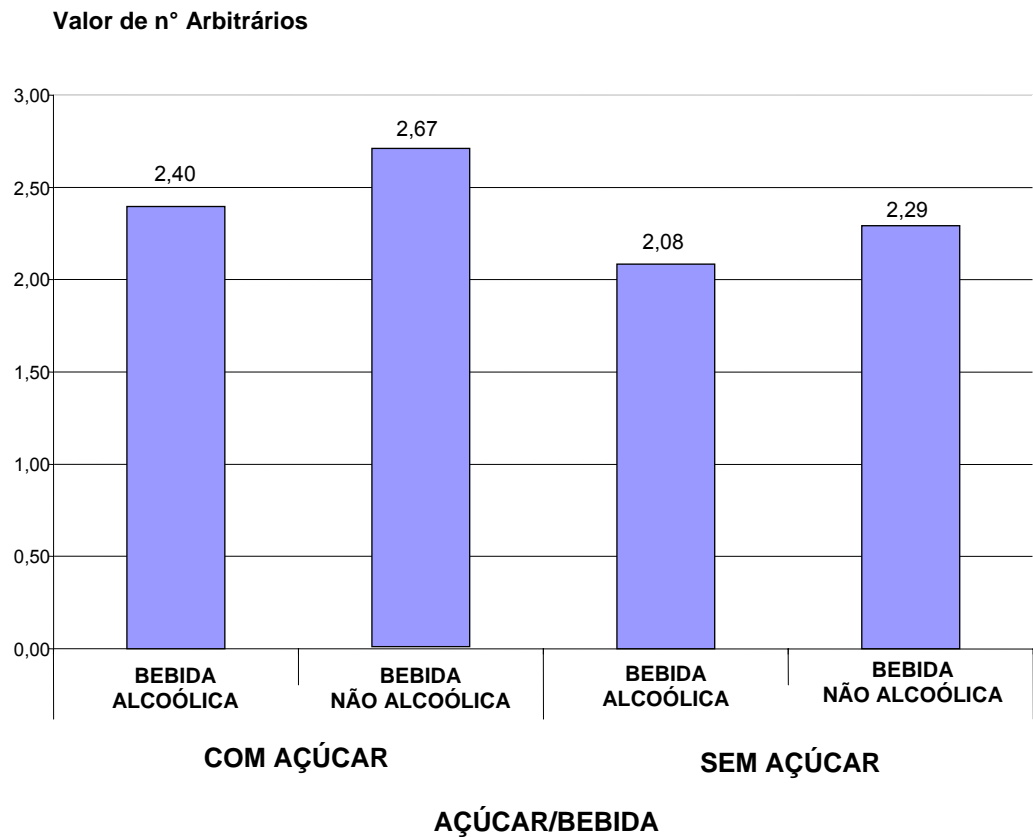


Os resultados do teste “*in vitro*” definem a solução conservante de alcoolatura e a *Salmonella Enteritidis* como as escolhidas para prosseguimento dos testes de suspensão e a análise sensorial. A alcoolatura foi preferida por apresentar a maior ação antibacteriana e a *Salmonella Enteritidis* por apresentar maior sensibilidade frente as soluções conservantes.

5.2 Teste de Suspensão nas bebidas desenvolvidas

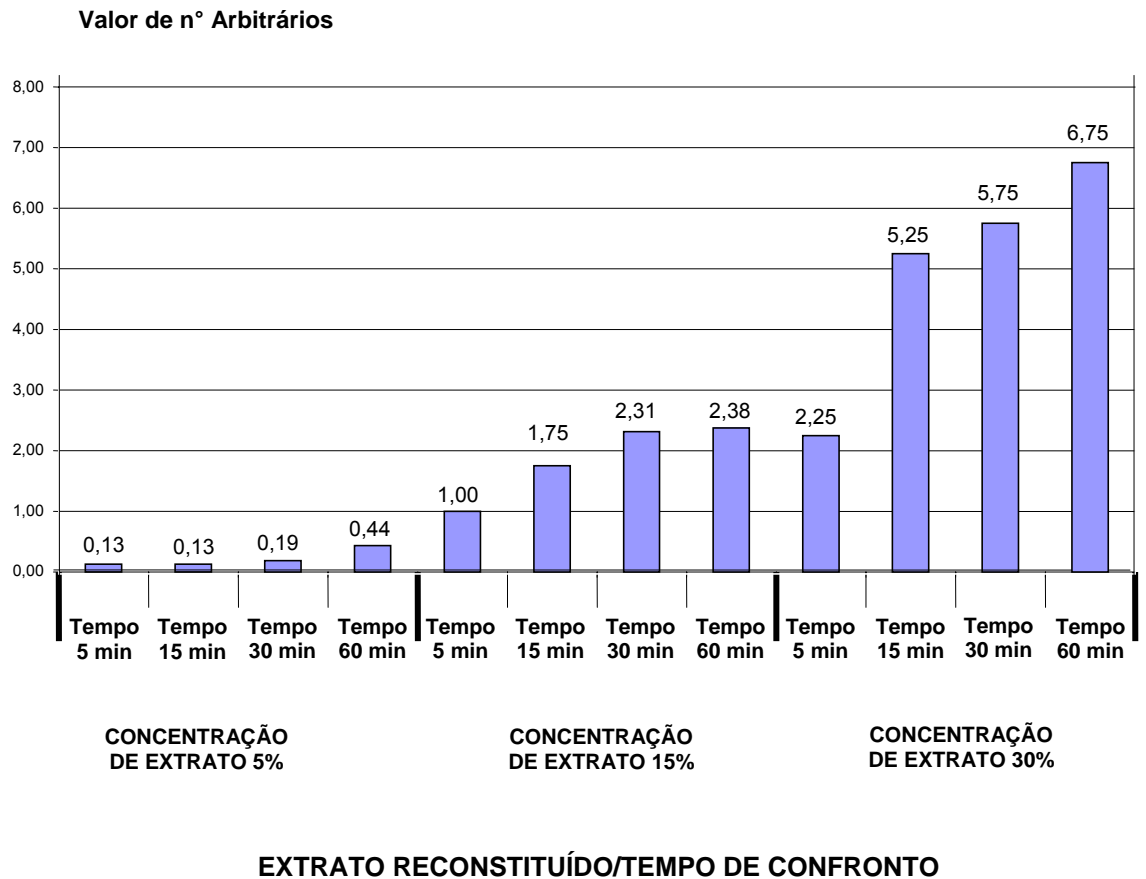
Todas as bebidas apresentaram atividade bactericida para a *Salmonella Enteritidis* como mostra o Gráfico 4, que avalia a atividade antibacteriana sobre a *Salmonella Enteritidis*, relacionando a presença e ausência de açúcar, bem como a presença ou ausência de álcool nas bebidas, independente dos outros fatores. Baseado neste Gráfico, também se conclui que a bebida não alcoólica com presença de açúcar apresenta a maior atividade bactericida sobre a *Salmonella Enteritidis*.

Gráfico 4 – Avaliação da atividade antibacteriana de extrato de *Ocimum gratissimum* sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) relacionando a presença e ausência de açúcar nas bebidas e a presença ausência de álcool nas bebidas, independente dos fatores: tempo de exposição, tempo de incubação (confrontação) e concentração de extrato de *Ocimum gratissimum*



A ação anti-salmonella aumentou à medida que aumentaram as concentrações de extrato da planta na bebida e o tempo de exposição da bactéria com a bebida, como mostra o Gráfico 5, que avalia a atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis relacionando ao tempo de confrontação (exposição) e as concentrações de extrato de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores: tempo de incubação, presença e ausência de açúcar nas bebidas e a presença ausência de álcool nas bebidas.

Gráfico 5 – Avaliação da atividade antibacteriana das concentrações de extrato de *Ocimum gratissimum* sobre a *Salmonella Enteritidis* (ATCC 11076) segundo o tempo de confrontação (exposição), independente dos fatores: tempo de incubação presença e ausência de açúcar nas bebidas e a presença ausência de álcool nas bebidas.

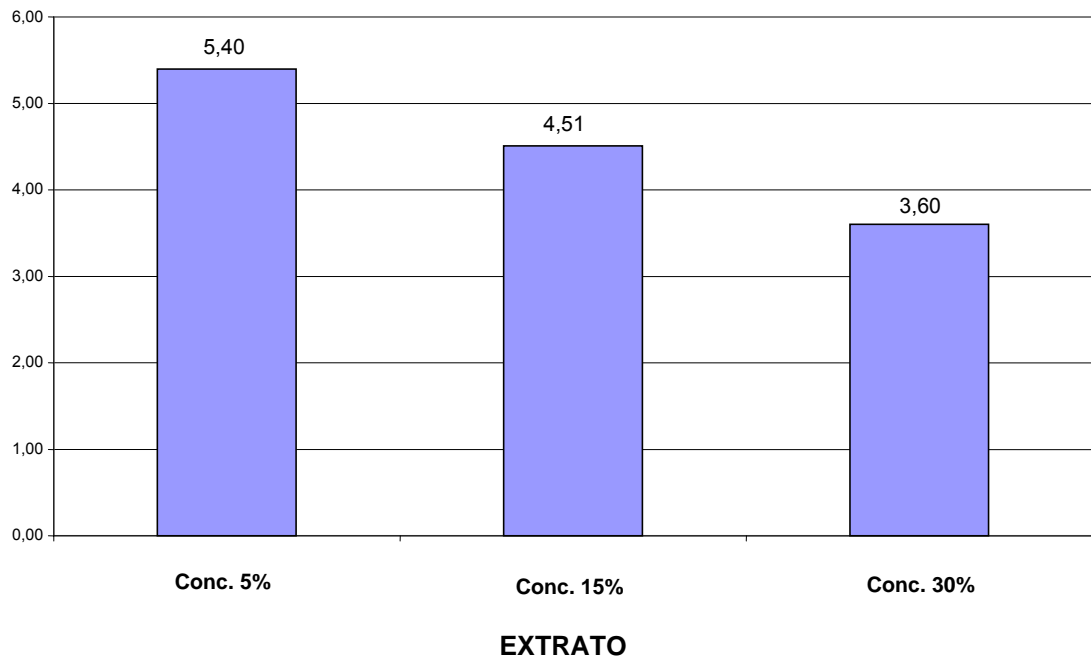


5.3 Análise Sensorial

Análise sensorial demonstra que a preferência às bebidas diminui com o aumento da concentração de extrato de *Ocimum gratissimum*, como mostra o Gráfico 6, ao avaliar a bebida quanto à concentração de extrato de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores: presença e ausência de açúcar e presença e ausência de álcool.

Gráfico 6 - Avaliação da bebida quanto a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* independentes dos fatores de presença e ausência de açúcar e presença e ausência de álcool.

Aceitabilidade



A bebida preferencial foi a que apresenta 5% de concentração de extrato reconstituído, sendo esta não alcoólica e com presença de açúcar. Estas conclusões se baseiam no resultado apresentado no Gráfico 7, que relaciona a concentração de extrato reconstituído da planta nas bebidas e a presença e ausência de álcool, bem como o resultado do Gráfico 8, que relaciona a concentração de extrato reconstituído da planta nas bebidas e a presença e ausência de açúcar.

Gráfico 7 - Avaliação da bebida quanto a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* nas bebidas, segundo a presença e ausência de álcool, independente do fator presença e ausência de açúcar.

Aceitabilidade

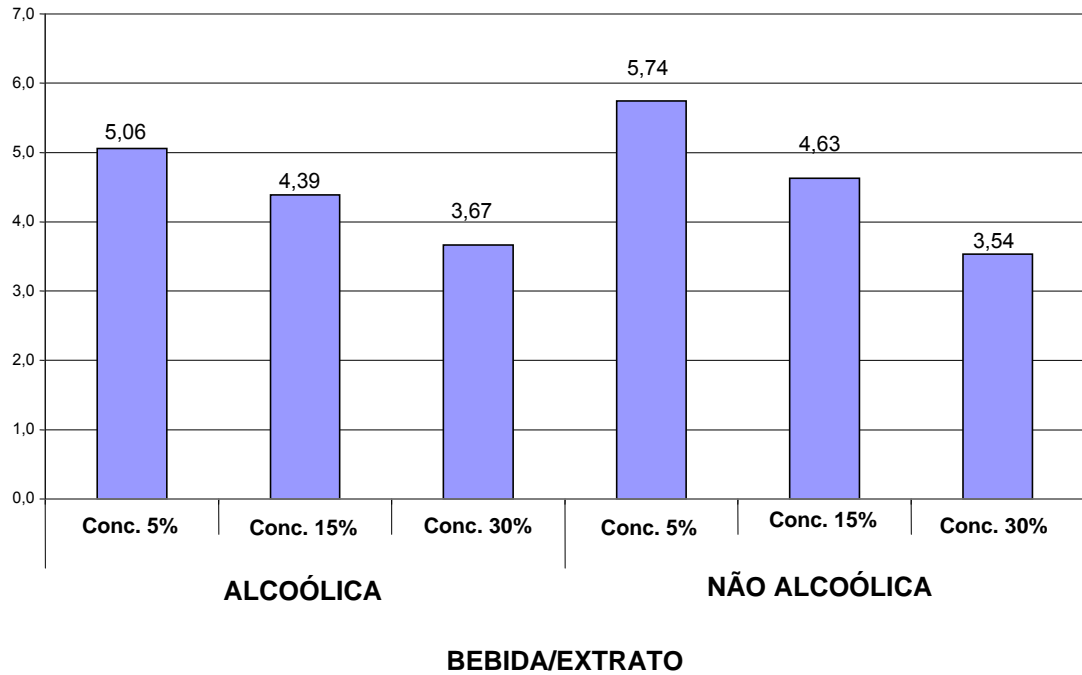
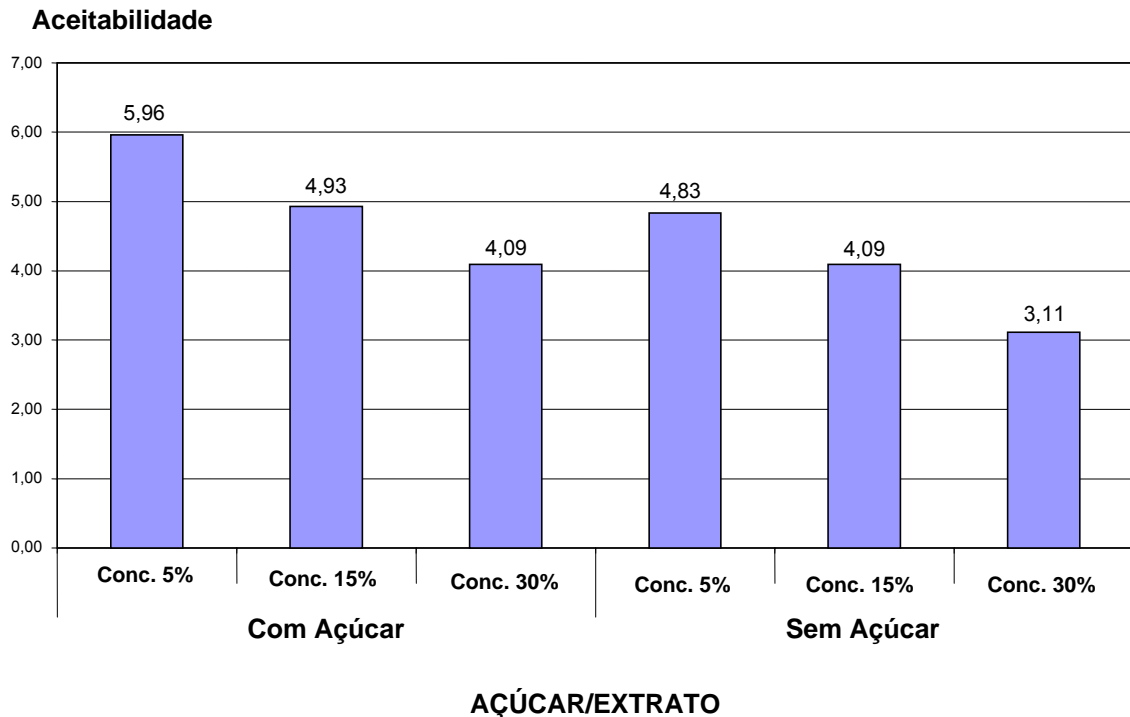


Gráfico 8 - Avaliação da a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* nas bebidas, segundo a presença e ausência de açúcar, independente do fator presença e ausência de álcool.



Os resultados deste trabalho indicam uma perspectiva de ampliação dos estudos com a planta *Ocimum gratissimum*, no desenvolvimento de novas formulações alimentícias, pela sua ação bactericida e suas propriedades sensoriais. Uma alternativa interessante é o desenvolvimento de bebidas não alcoólicas que podem ser direcionadas a uma faixa da população que não pode fazer uso de álcool. Outra conclusão importante é a ação antibacteriana comprovada no teste “*in vitro*” e no teste de suspensão, mesmo com um inóculo desafio elevado (concentração $\geq 10^8$ UFC/mL das bactérias avaliadas).

REFERÊNCIAS GERAIS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. v. 1

AHN, J.; GRÜN, I.U.; MUSTAPHA, A. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. **Food Microbiology**, London, v.24, p.7–14, feb. 2007.

ALIGIANNIS, N., *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.49, n. 9, p. 4168-4170, aug. 2001.

CHAH, K.F., *et al.* Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden v.104, p.164–167, mar. 2006.

CARMO, L.S. *et al.* Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and rawmilk in Brazil. **Food Microbiology**, London, v.19, p.9-14, 2002.

CARMO, L.S. *et al.* An Outbreak of Staphylococcal food poisoning in the municipality of Passos, MG, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.46, n. 4, p.581-586, dec. 2003.

FARIA, T.J. *et al.* Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, Curitiba, v.49, n. 6, p. 867-871, nov. 2006.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 424p 2002.

GUENTZE, J.L. *et al.* Reduction of bacteria on spinach, lettuce, and surfaces in food service areas using neutral electrolyzed oxidizing water. **Food Microbiology**, London, v.25, p..36–41, 2008.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 86, p.985–990, 1999.

HOLTBY, I. *et al.* Two separate outbreaks of Salmonella enteritidis phage type 14b food poisoning linked to the consumption of the same type of frozen food. **Public Health**, Berlin, v.120, p.817–823, 2006.

ILORI, M.O. *et al.* Antidiarrhoeal activities of *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). **Journal Of Diarrhoeal Diseases Research**, Dhaka.14, p.283-285, 1996.

JANSEN, A.; FRANK, C.; STARK, K. Pork and pork products as a source for human salmonellosis in Germany. **Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, Berlin, v.120, p.340-346 jul./aug. 2007.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 711p.

JIROVETZ, L. *et al.* Chemotaxonomical analysis of the essential oil aroma compounds of four different *Ocimum* species from southern India. **European Food Research and Technology**, Berlin, v.217, n. 2, p.120-124, aug.2003

KAFERSTEIN, F.; ABDUSSALAM, M. Food safety in the 21st century. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva v.77, n.4, p.347-351, 1999.

KUBO, I.; FUJITA, K. Natural anti-*Salmonella* agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n.12, p.5750 -5754, dec. 2001.

KUBO I. *et al.* Antibacterial activity of coriander volatile compounds against *Salmonella choleraesuis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.52, n.11, p.3329–3332, jun. 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa SP: Instituto Plantarum, 2002. 544p.

MARRIOTT, N.G. **Essentials of food sanitation**. New York: Chapman & Hall, 1997. 355p.

MATSUNE, W., *et al.* Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* isolates resistance to ampicillin and streptomycin from three outbreaks of food poisoning in Shiga Prefecture. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tokio, v.54, n.3, p.111-113, jun. 2001.

MORA, A., *et al.* Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Peru). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.114, p.204–210, mar. 2007.

MORANDI, S., *et al.* Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**, Geneva, v.124, p.66–72, mar. 2007.

MOREIRA, M.R., *et al.* Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT - Food Science and Technology**, Davis v.38, p.565–570, Aug. 2005.

MUCH, P., *et al.* An Austrian outbreak of *Salmonella* Enteritidis phage type 36 in 2004. **Wien Klin Wochenschr**, Berlin, v.117, n.17, p.599–603. 2005.

NADVORNY A., FIGUEIREDO D.M.S.; SCHMIDT V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul, em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.32, n. 1, p.47-51, 2004.

NAKAMURA, C.V. *et al.* Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, São Paulo, v. 94, n. 5, p.675-678, 1999.

NAKAMURA, C.V. *et al.* *In vitro* activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. **Research in Microbiology**, Paris, v.155, p.579–586, sep. 2004.

NGUEFACK, J. *et al.* Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.94, p.329–334, aug. 2004.

NGUEFACK, J.; BUDDE, B.B.; JAKOBSEN, M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. **Letters in Applied Microbiology**, Cardiff, v.39, n. 5, p.395–400, jun. 2004.

ORAFIDIYA, L.O., *et al.* The formulation of an effective topical antibacterial product containing *Ocimum gratissimum* leaf essential oil. **International Journal of Pharmaceutics**, London, v.224, p.177–183, aug. 2001.

SAĞDIÇ, O.; ÖZCAN, M. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. **Food Control**, Oxford, v.14, p.141–143, apr. 2003.

ŞAHİN, F. *et al.* Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, Oxford, v.15, p.549–557, Oct. 2004.

SARTORATTO, A., *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, p.275-280, 2004.

SANTORO, G.F. *et al.* Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**, Berlin, v.100, p.783-790, 2007.

SHAN, B., *et al.* The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.117, p.112–119, jun. 2007.

SKANDAMIS, P. *et al.* E. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *E. coli* O157:H7. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, v.13, p.55–65, 2001.

SKANDAMIS, P; TSIGARIDA, E.; NYCHAS, G-J.E. The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. **Food Microbiology**, London v.19, p.97-103, feb. 2002.

SORIANO, J.M. *et al.* Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.13, p.60–67, 2002.

SOUTO, S.A. *et al.* Atividade Antibacteriana *In Vitro* de plantas condimentares do gênero *Ocimum* - Labiatae (*O. selloi* Benth. - Anis Verde; *O. Basilicum* L. - Manjeriçã; *O. gratissimum* L. — Erva Cravo, Alfavaca) frente a zoonoses transmissíveis por alimentos. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/UFRGS, 18, 2006, Porto Alegre. **Livro de Resumo**. Porto Alegre: UFRGS, 2006, p. 185, Vol. 1. Ref. Nº 182.

STRACHAN, N.J.C. *et al.* Escherichia coli O157: Burger bug or environmental pathogen? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.112, n.2, p.129–137, 2006.

TAUXE, R.V. Surveillance and investigation of foodborne diseases; roles for public health in meeting objectives for food safety. **Food Control**, Kidlington Oxford, v.13, p.363-369, sep./oct. 2002.

TEPE, B., *et al.* Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). **Food Chemistry**, Oxford, v.84, p.519–525, mar. 2004.

TREVISAN, M.T.S. *et al.* Characterization of the Volatile Pattern and Antioxidant capacity of essential oils from different species of the Genus *Ocimum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., Washington, v. 54, p.4378-4382, may. 2006.

UEDA-NAKAMURA, T. *et al.* Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, Kyoto, v.55, p.99–105, jun. 2006.

APÊNDICE E ANEXOS

APÊNDICE A –Tabela e gráficos do Teste “*in vitro*”.

Tabela A - Análise de Variância do Teste “*in vitro*”.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ESTRATO	3,0	1415750000,0	471916667,0	8526315,0	0,0
BACTERIA	2,0	628187500,0	314093750,0	5674862,0	0,0
MEIO	1,0	465125000,0	465125000,0	8403607,0	0,0
TEMPO	3,0	12250000,0	4083333,0	73775,0	0,0
ESTRATO*BACTERIA	6,0	337562500,0	56260417,0	1016480,0	0,0
ESTRATO*MEIO	3,0	175125000,0	58375000,0	1054685,0	0,0
ESTRATO*TEMPO	9,0	6000000,0	0.666667	12045,0	0,0
BACTERIA*MEIO	2,0	113312500,0	56656250,0	1023632,0	0,0
BACTERIA*TEMPO	6,0	11562500,0	1927083,0	34817,0	0,0
MEIO*TEMPO	3,0	2625000,0	0.87500	15809,0	0,0
ESTRATO*BACTERIA*MEIO	6,0	281437500,0	46906250,0	847475,0	0,0
ESTRATO*BACTERIA*TEMPO	18,0	16687500,0	0.927083	16750,0	0,0
BACTERIA*MEIO*TEMPO	6,0	5437500,0	0.90625	16374,0	0,0
ESTRATO*BACTERIA*MEIO	18,0	25812500,0	1434028,0	25909,0	
ERRO	201,0	11125000,0	0.055348		
Total Corrigido	287,0				
CV (%)	9,11				
Média Geral	25.83		Número de observações:	288	
	3.333				

Tabela B – Avaliação da atividade antibacteriana de quatro tipos de extração em soluções conservantes de *Ocimum gratissimum* (valores médios de triplicatas), independente dos fatores tempo de confrontação, espécie bacteriana, presença ou ausência de desinibidores bacterianos.

Tipos de Extração:	Número Arbitrário
Decocto a partir de planta verde **	0,92 ^a *
Decocto a partir de planta seca **	1,17 ^b
Hidroalcooolatura (a partir de planta seca) ***	1,88 ^c
Alcooolatura(a partir de planta verde) ***	6,38 ^d

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre entre os tipos de extração para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

(**) : - soluções conservantes reconstituídas sob assepsia, a partir de extratos hídricos;

(***) : - etanol evaporado nas soluções conservantes em sistema rota-vapor, com reconstituição hídrica sob assepsia, a partir de extrações hidroetanólica e etanólica ;

Gráfico A - Avaliação da presença ou da ausência de desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores tempo de confrontação, tipo de extração e espécie bacteriana

Valor dos N° Arbitrários

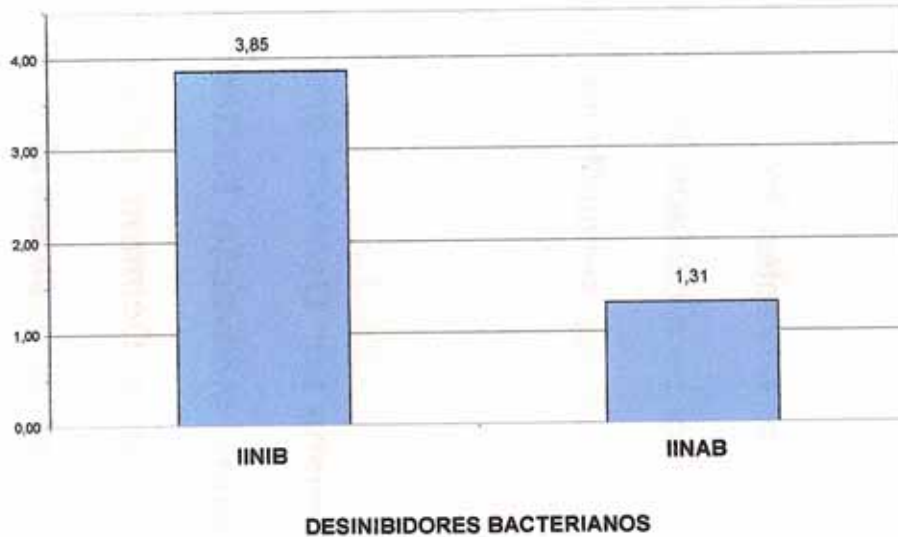
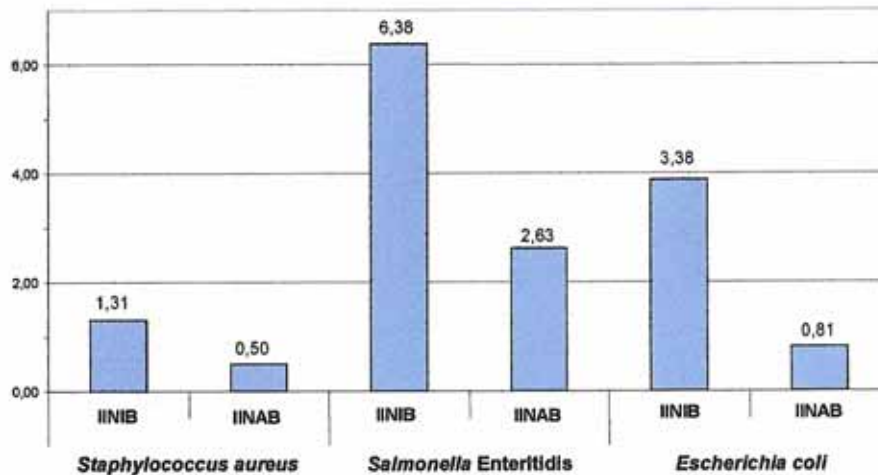


Gráfico B - Avaliação da relação entre a sensibilidade das espécies bacterianas de interesse em alimentos à soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, na presença ou ausência de desinibidores bacterianos, independente dos fatores tempo de confrontação e tipo de extração.

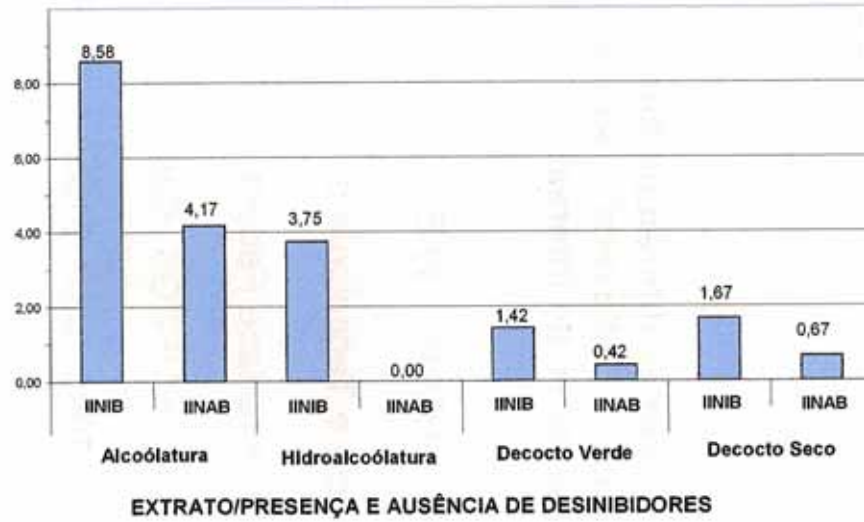
Valor dos N° Arbitrários



BACTÉRIAS/PRESENÇA E AUSÊNCIA DE DESINIBIDORES

Gráfico C – Avaliação da relação entre as diferentes formas de extração das soluções conservantes de *Ocimum gratissimum* na presença ou ausência de desinfetores bacterianos, independente dos fatores tempo de confrontação e espécie bacteriana de interesse em alimentos.

Valor dos N° Arbitrarios



APÊNDICE B – Tabelas e gráficos do Teste de Suspensão

Tabela A – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) relacionando a presença e ausência de álcool com a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores: tempo de exposição, tempo de incubação (confrontação) e presença e ausência de açúcar nas bebidas.

Concentração de extrato (%)*	Bebida **	
	Alcoólica	Não Alcoólica
5	0,25 ^{aA}	0,19 ^{aA}
15	1,72 ^{bA}	2,00 ^{bA}
30	4,75 ^{cA}	5,25 ^{cB}

(*): - A análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$): letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as diferentes concentrações de extração de *Ocimum gratissimum*.

(**): - A análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$): letras maiúsculas diferentes sobrescritas (^A) na mesma linha indicam diferenças significativas entre as bebidas com presença e ausência de álcool.

Tabela A – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) relacionando a presença e ausência de álcool com a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores: tempo de exposição, tempo de incubação (confrontação) e presença e ausência de açúcar nas bebidas.

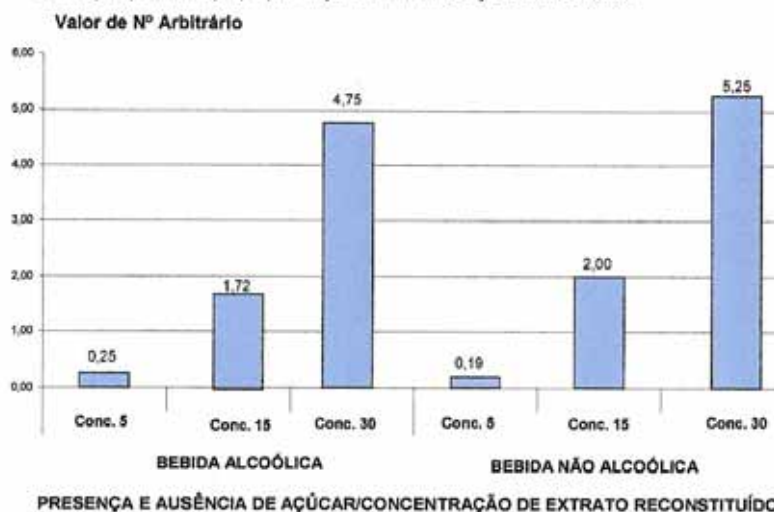


Tabela B – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) relacionando o tempo de exposição e a presença e ausência de álcool nas bebidas, independente dos fatores: tempo de incubação (confrontação), presença e ausência de açúcar nas bebidas e concentrações de extrato de *Ocimum gratissimum*.

Tempo de exposição *	Bebidas **	
	ALCOÓLICA	NÃO ALCOÓLICA
5	0,67 ^{aA}	1,58 ^{aB}
15	2,17 ^{bA}	2,58 ^{bB}
30	2,79 ^{cA}	2,71 ^{bcA}
60	3,33 ^{dA}	3,04 ^{bA}

(*): - A análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$): letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos de exposição.

(**): - A análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$): letras maiúsculas diferentes sobrescritas (^A) na mesma linha indicam diferenças significativas entre as diferentes bebidas com presença e ausência de álcool.

Gráfico B – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) relacionando o tempo de exposição e a presença e ausência de álcool nas bebidas, independente dos fatores: tempo de incubação, presença e ausência de açúcar nas bebidas e concentrações de extrato de *Ocimum gratissimum*.

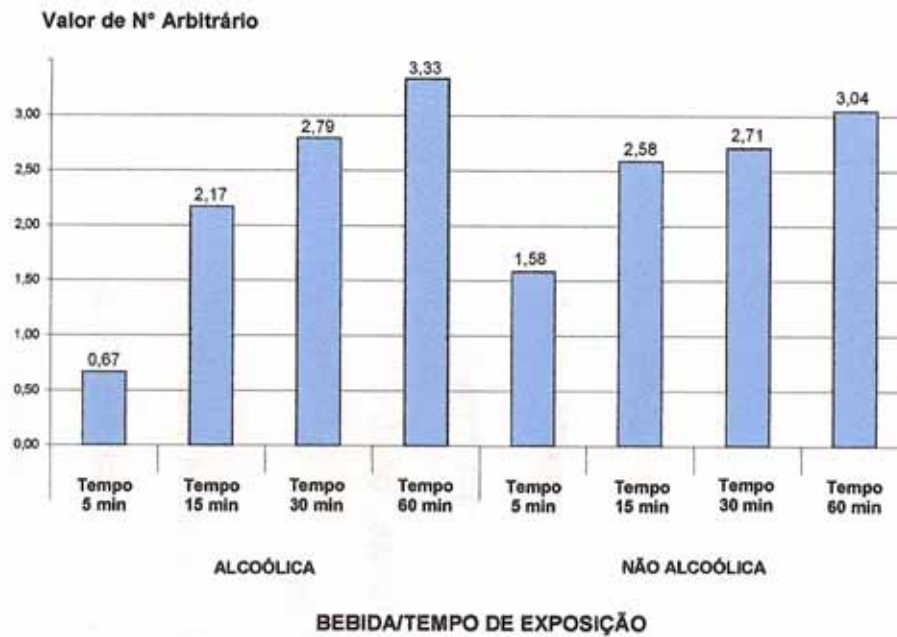


Tabela C – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) relacionando a presença e ausência de açúcar com a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores: tempo de exposição, tempo de incubação (confrontação) e presença e ausência de álcool nas bebidas.

Concentração de extrato (%)*	Açúcar **	
	COM	SEM
5	0,25 ^{aA}	0,19 ^{aA*}
15	1,59 ^{bA}	2,13 ^{bB}
30	5,75 ^{cA}	4,25 ^{cB}

(*): - A análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$): letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as diferentes concentrações de extração de *Ocimum gratissimum*.

(**): - A análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$): letras maiúsculas diferentes sobrescritas (^A) na mesma linha indicam diferenças significativas entre as bebidas com presença e ausência de açúcar.

Gráfico C – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) relacionando a presença e ausência de açúcar com a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores: tempo de exposição, tempo de incubação (confrontação) e presença e ausência de álcool nas bebidas.

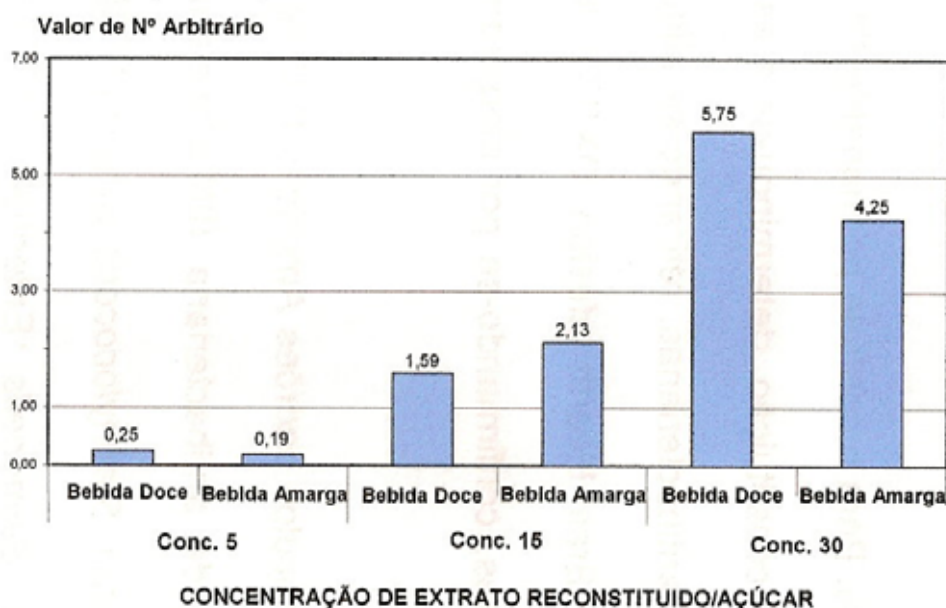


Tabela D – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) relacionando a presença e ausência de açúcar nas bebidas e a presença ausência de álcool nas bebidas, independente dos fatores: tempo de exposição, tempo de incubação (confrontação) e concentração de extrato de *Ocimum gratissimum*.

Presença ou ausência de Açúcar*	Bebida**	
	Alcoólica	Não Alcoólica
SEM	2,08 ^{aA}	2,29 ^{aA}
COM	2,40 ^{bA}	2,67 ^{bB}

(*): - A análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$): letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as diferentes bebidas com presença e ausência de açúcar.

(**): - A análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$): letras maiúsculas diferentes sobrescritas (^A) na mesma linha indicam diferenças significativas entre as bebidas com presença e ausência de álcool.

Tabela E – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) relacionando o tempo de exposição e a presença e ausência de açúcar nas bebidas, independente dos fatores: tempo de incubação (confrontação), presença e ausência de álcool nas bebidas e concentrações de extrato de *Ocimum gratissimum*.

Tempo de exposição*	Presença e ausência de açúcar**	
	COM	SEM
5	1,88 ^{aA}	0,38 ^{aB}
15	2,21 ^{aA}	2,54 ^{bA}
30	2,83 ^{bA}	2,67 ^{bCA}
60	3,20 ^{bA}	3,17 ^{cA}

(*): - A análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$): letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos de exposição.

(**): - A análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$): letras maiúsculas diferentes sobrescritas (^A) na mesma linha indicam diferenças significativas entre as diferentes bebidas com presença e ausência de açúcar.

Gráfico D– Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo o tempo de confrontação (exposição), independente dos fatores: tempo de incubação, concentração de extrato de *Ocimum gratissimum*, presença ou ausência de álcool nas bebidas e presença e ausência de açúcar nas bebidas.

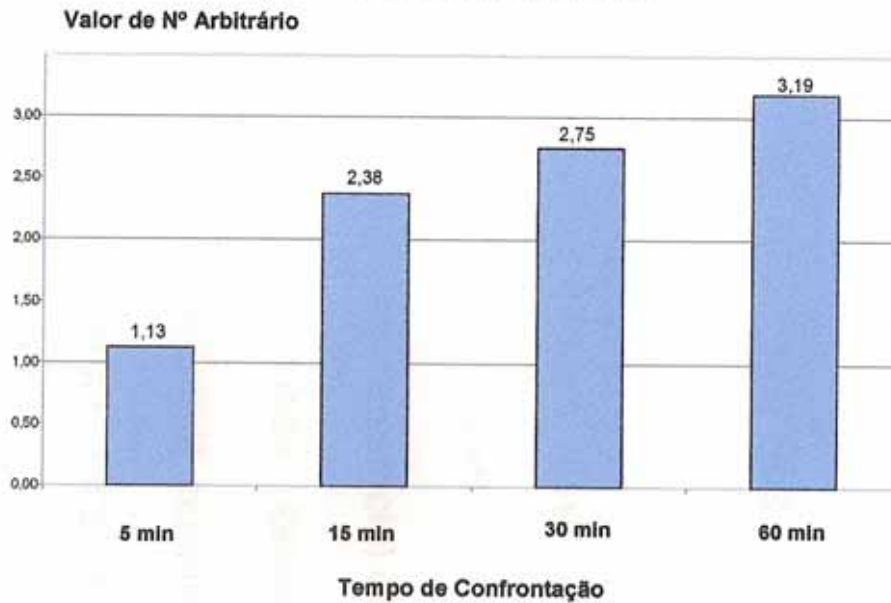


Gráfico E – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo a presença e ausência de álcool, independente dos fatores: tempo de confrontação (exposição), tempo de incubação, concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* e presença e ausência de açúcar nas bebidas.



Gráfico F – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo a presença e ausência de açúcar, independente dos fatores: tempo de confrontação (exposição), tempo de incubação, concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* e presença e ausência de álcool nas bebidas

Valor de N° Arbitrário

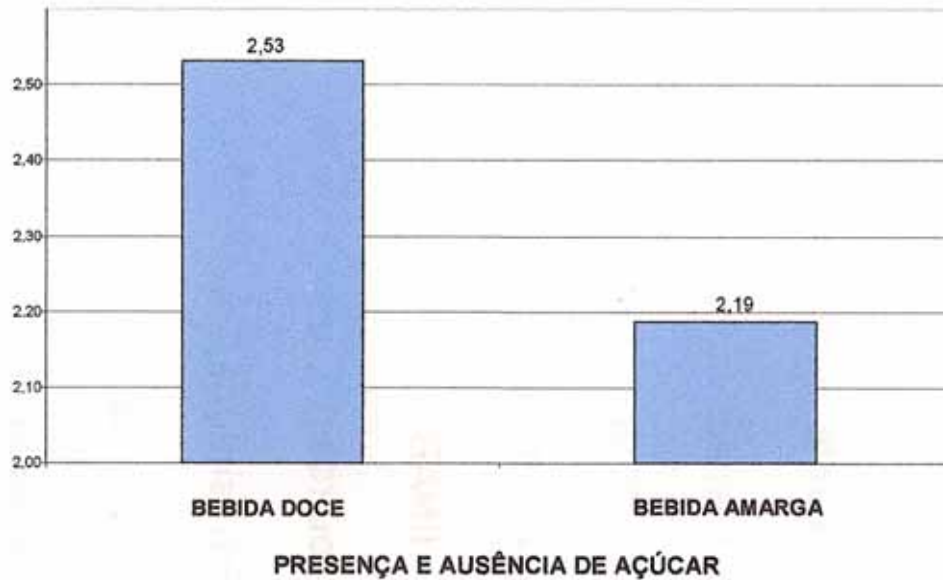


Gráfico G – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo a concentração de extrato de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores: tempo de confrontação (exposição), tempo de incubação, presença ou ausência de álcool nas bebidas e presença e ausência de açúcar nas bebidas.

Valor de N° Arbitrário

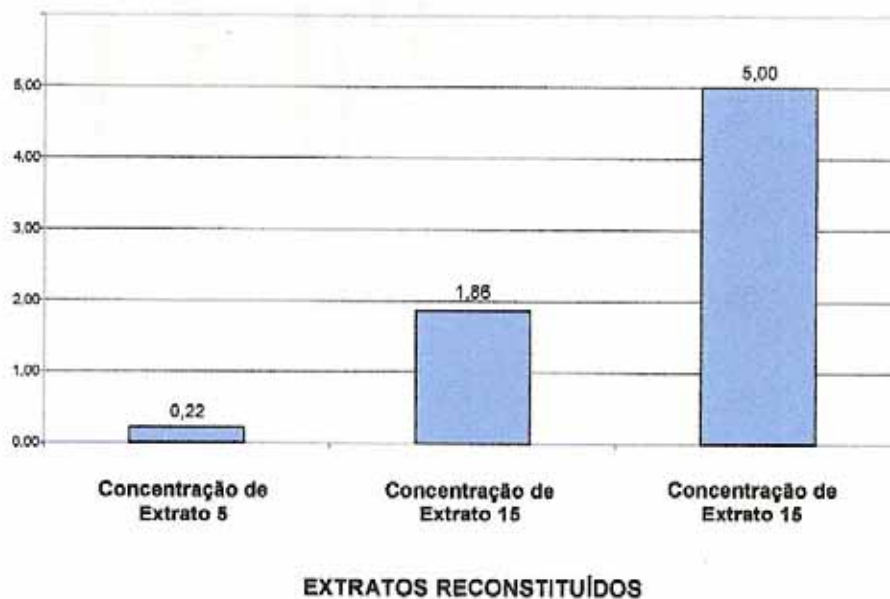
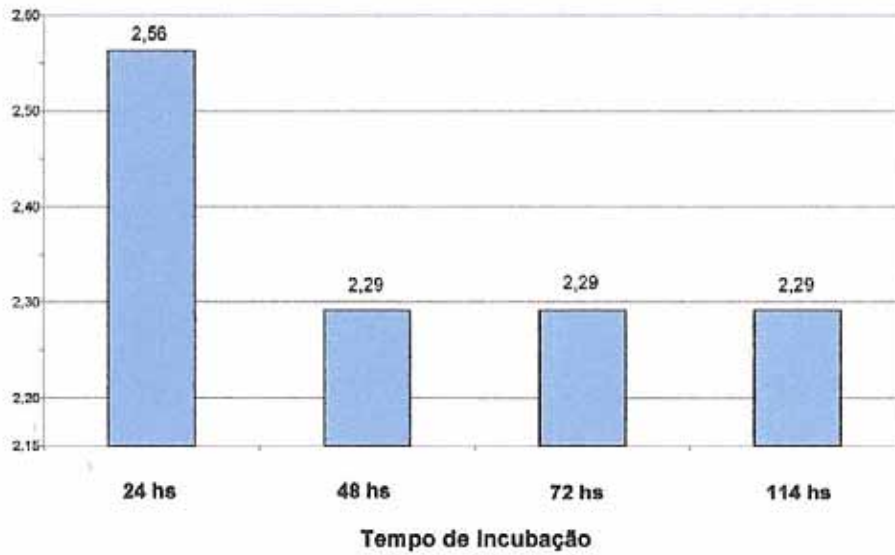


Gráfico H – Avaliação da atividade antibacteriana sobre a *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) segundo o tempo de incubação, independente dos fatores: tempo de confrontação (exposição), concentração de extrato de *Ocimum gratissimum*, presença ou ausência de álcool nas bebidas e presença e ausência de açúcar nas bebidas.

Valor de N° Arbitrário



APÊNDICE C – Tabelas e gráficos da análise sensorial

Tabela A- Avaliação da bebida quanto à presença e ausência de açúcar e de álcool independentes da concentração de extrato de *Ocimum gratissimum*.

Bebida	Açúcar	
	COM	SEM
Alcoólica	5,01 ^{a*}	3,73 ^{a*}
Não Alcoólica	4,98 ^{a*}	4,30 ^{b*}

(*): - A análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$): letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as diferentes formas de extração.

(**): - A análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$): letras maiúsculas diferentes sobrescritas (^A) na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos com presença e ausência de desinfetante bacteriano.

Gráfico A - Avaliação da bebida quanto à presença e ausência de açúcar e de álcool independentes da concentração de extrato de *Ocimum gratissimum*



Tabela B – Avaliação da bebida quanto à presença e ausência de açúcar independentes dos fatores de concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* e presença e ausência de álcool.

Açúcar	Aceitabilidade
SEM	4,01 ^a
COM	4,99 ^b

(*): - A análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$): letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tipos de extrato;

(**): - soluções conservantes reconstituídas sob assepsia, a partir de extratos hídricos;

(***): - etanol evaporado nas soluções conservantes em sistema rota-vapor, com reconstituição hídrica sob assepsia, a partir de extrações hidroetanólica e etanólica ;

Gráfico B – Avaliação da bebida quanto à presença e ausência de açúcar independentes dos fatores de concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* e presença e ausência de álcool.

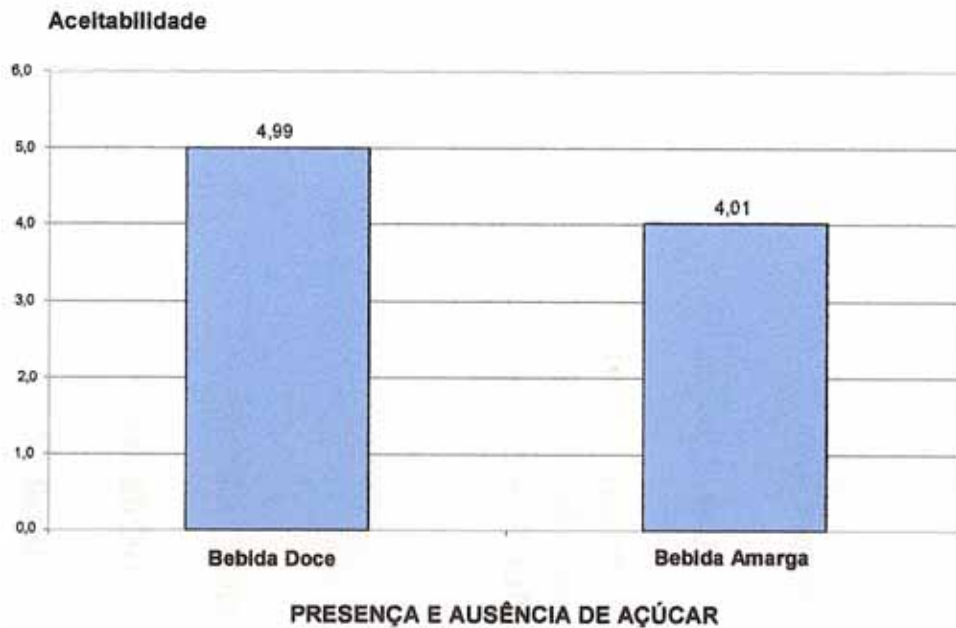


Tabela C – Avaliação da bebida quanto à presença e ausência de álcool independentes dos fatores de concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* e presença e ausência de açúcar.

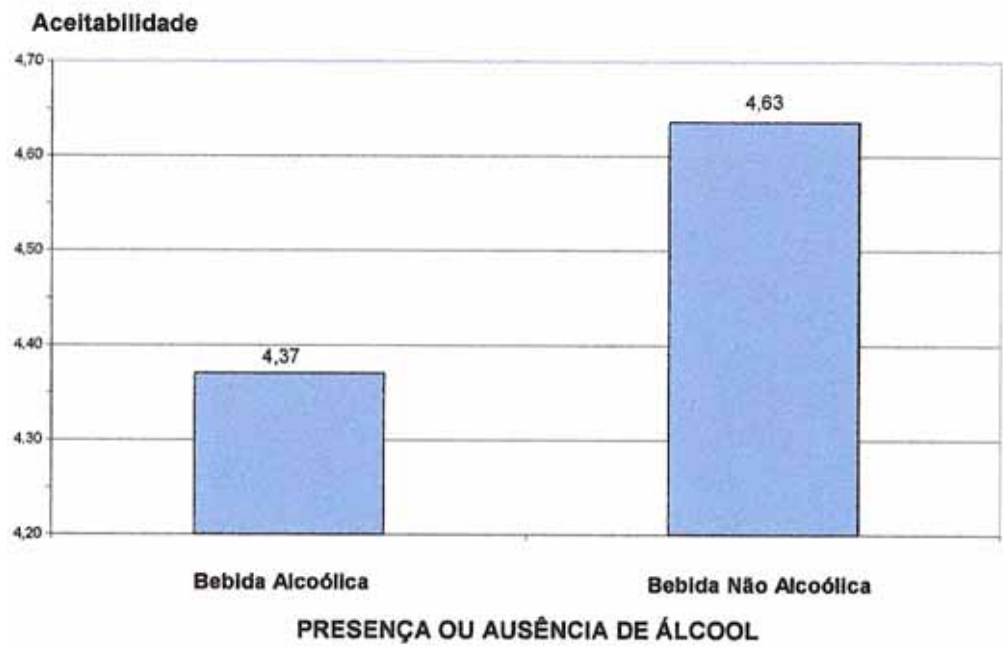
Bebidas	Aceitabilidade
Alcoólica	4,37 ^a
Não Alcoólica	4,64 ^a

(*): - A análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$): letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tipos de extrato;

(**): - soluções conservantes reconstituídas sob assepsia, a partir de extratos hídricos;

(***): - etanol evaporado nas soluções conservantes em sistema rota-vapor, com reconstituição hídrica sob assepsia, a partir de extrações hidroetanólica e etanólica ;

Gráfico C – Avaliação da bebida quanto à presença e ausência de álcool independentes dos fatores de concentração de extrato de *Ocimum gratissimum* e presença e ausência de açúcar.



**ANEXO A – Laudo da Identificação Botânica – *Ocimum gratissimum* L.
(Lamiaceae)**

QUADRO 1. Espécie botânica: A- americana-cultivada, 1 — introduzida de outros continentes, N — nativa do Estado do Rio Grande do Sul.

Família botânica	Nome científico	Nome popular	Hábito	Habitat	Origem	N° ICN
LAMIACEAE	<i>Ocimum gratissimum</i> L.	alfavaca-cravo, alfavacão	arbustivo	ruderal	1 (Eurásia)	150160

Fonte: Marodin (2007)

- MATERIAL EXAMINADO:

Nome científico: *Ocimum gratissimum* L.

Material examinado: BRASIL. Rio Grande do Sul: **Dom Pedro de Alcântara**, Sede do Município, 24.V.1997, S.M.Marodin 125 (ICN); **Porto Alegre**, Bairro Ponta Grossa, 9.I.2003, G.S.Vendruscolo 151 (ICN); **Santa Cruz do Sul**, 1996, D.S.Oliveira s/n° (ICN 112286).



Silvia Maria Marodin

(Bióloga, mestre em Botânica, área de taxonomia)