



**ALINE PEREIRA MARTINS**

**ATIVIDADE BACTERICIDA DE  
ANTIMICROBIANOS NATURAIS SOBRE  
*Listeria monocytogenes* INOCULADA EM  
MORTADELA**

**LAVRAS - MG**

**2016**

**ALINE PEREIRA MARTINS**

**ATIVIDADE BACTERICIDA DE ANTIMICROBIANOS NATURAIS  
SOBRE *Listeria monocytogenes* INOCULADA EM MORTADELA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS - MG**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Martins, Aline Pereira.

Atividade bactericida de antimicrobianos naturais sobre  
*Listeria monocytogenes* inoculada em mortadela / Aline Pereira  
Martins. – Lavras: UFLA, 2016.

163 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Fibra alimentar solúvel. 2. Óleo essencial. 3. Patógeno alimentar. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**ALINE PEREIRA MARTINS**

**ATIVIDADE BACTERICIDA DE ANTIMICROBIANOS NATURAIS  
SOBRE *Listeria monocytogenes* INOCULADA EM MORTADELA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 18 de março de 2016.

Dr. Eduardo Mendes Ramos	UFLA
Dr. Alexandre Tourino Mendonça	UNINCOR
Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA
Dr. Alexandre de Paula Peres	UFLA

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2016**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, minha fonte de força, luz e fé.

Aos meus pais, Ana Maria Pereira Martins e Geraldo Gomes Martins de Souza, que sempre me apoiaram independente dos obstáculos que isso acarreta e pelo amor incondicional. Amo muito!

Às minhas irmãs, Amanda e Ana Carolina, pelo amor, companheirismo e amizade incondicional. Amo muito vocês!

Ao meu noivo Gustavo, por todo o amor, compreensão e por sempre estar ao meu lado nos bons e maus momentos. Estar ao seu lado é muito importante. Te amo!

A todos os meus familiares, os quais me apoiaram e acreditaram em mim.

À prof<sup>a</sup>. Roberta Hilsdorf Piccoli pela orientação, amizade, carinho, confiança e por ter possibilitado e auxiliado na concretização deste sonho.

Ao prof. Eduardo Mendes Ramos, pela coorientação, e à prof<sup>a</sup>. Alcinéia de Lemos Souza Ramos, que sempre me acolheram com muito carinho e contribuíram significativamente para a realização desta etapa tão importante.

Ao Ítalo pelo auxílio no processamento, pelas análises físico-químicas e pelas horas de conversa e amizade.

À Andressa por toda ajuda.

À Eliane, técnica do Laboratório de Microbiologia, pela disponibilidade, amizade e auxílio.

À Lucilene, que mais que uma secretária, se tornou uma grande amiga.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência dos Alimentos, que estiveram presentes durante essa caminhada, obrigada pelo carinho e auxílio.

A todos do Laboratório de Carnes e Derivados, pelos ensinamentos, auxílio e amizade.

Ao prof. Maurilio Lopes Martins pela orientação durante a graduação e ainda por ser o principal responsável pela minha escolha em seguir a área de Microbiologia.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), a todos os professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos que me acolheram com tanto carinho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

Enfim a todos que de alguma forma contribuíram/torceram pela realização desta etapa em minha vida.

Muito obrigada!

**ALINE PEREIRA MARTINS**

## RESUMO GERAL

Esta tese teve por proposta central avaliar a atividade antimicrobiana de quitosana e óleo essencial de *Syzygium aromaticum* adicionados em diferentes concentrações em mortadelas sobre *Listeria monocytogenes*, bem como, a incorporação de fibras ao produto cárneo, sua atividade sobre a oxidação lipídica e aceitação sensorial do produto. Para atingir tal proposta foram desenvolvidos três artigos. No primeiro, avaliou-se a concentração mínima bactericida da quitosana sobre a *Listeria monocytogenes in vitro*, bem como, a inibição deste microrganismo *in situ* e a caracterização físico-química de mortadelas acrescidas de diferentes concentrações de quitosana durante o período de armazenamento sob refrigeração. Para o pH houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao longo dos 30 dias de armazenamento para o controle e para as mortadelas contendo maiores concentrações de quitosana. O nitrito residual apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para todas as amostras em estudo. Quanto à oxidação lipídica todos os tratamentos foram afetados significativamente ( $p < 0,05$ ) ao longo do armazenamento. Os valores das quatro amostras para contagem de *Listeria monocytogenes* tanto na mortadela inteira como na mortadela fatiada foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), onde, nas amostras contendo maiores concentrações de quitosana, 2 e 3%, constatou-se uma redução de 3 ciclos logarítmicos. No segundo artigo, o objetivo foi avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações de quitosana (0, 1, 2 e 3%) nas características tecnológicas e sensoriais de mortadelas. Os índices de cor instrumental não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos, os parâmetros de dureza e mastigabilidade reduziram ( $p < 0,05$ ) com a adição crescente de quitosana na formulação. As notas hedônicas das amostras situaram-se entre 6 e 8 (gostei ligeiramente e gostei muito). Pelo CATA, as amostras mais aceitas foram as que continham 2 e 3% de quitosana, sugerindo que o controle apresentou “cor rosa clara”, “sabor de carne”, “sabor salgado”, “sabor residual de gordura”, “gosto de ranço” e a amostra com 3% de quitosana “sabor característico de mortadela”. Já no terceiro artigo, o alvo foi avaliar o efeito sinérgico de quitosana e óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, com redução de nitrito de sódio sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 inoculados em mortadela, bem como sua atividade sobre a oxidação lipídica do produto, onde, foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). A concentração de quitosana influenciou os valores do pH para as mortadelas em estudo, tanto no primeiro dia de armazenamento quanto após os trinta dias. Para o nitrito residual observou-se, claramente, uma menor redução da concentração quando em maiores concentrações de quitosana. Pode-se observar que as maiores concentrações do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* apresentou ação antioxidante, na análise de TBARs. As maiores concentrações de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e quitosana influenciaram a contagem de *Listeria*

*monocytogenes* dos tratamentos, tanto no primeiro dia de armazenamento quanto após os trinta dias. Portanto, os resultados desta tese permitem concluir que existe viabilidade tecnológica, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana, em relação a um patógeno de grande interesse na indústria cárnea, na adição de quitosana e óleo essencial em produtos cárneos, conseguindo obter, ainda, um produto fontes de fibras.

**Palavras-chave:** Fibra alimentar solúvel. Óleo essencial. Patógeno alimentar.

## GENERAL ABSTRACT

This thesis was a central proposal to evaluate the antimicrobial activity of chitosan and essential oil of *Syzygium aromaticum* added at different concentrations in mortadella on *Listeria monocytogenes*, as well as the incorporation of fiber to the meat product, its activity on lipid oxidation and sensory acceptance of the product. To achieve such proposal three articles were developed. At first, it was evaluated the minimum bactericidal concentration of chitosan on *Listeria monocytogenes* in vitro and the inhibition of this microorganism in situ and physico-chemical characterization of mortadella with different concentrations of chitosan during refrigerated storage. There was no significant difference ( $p < 0.05$ ) in the pH throughout the 30 days of storage both for control and for mortadella containing higher concentrations of chitosan. The residual nitrite showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) for all analyzed samples. The lipid oxidation of all treatments were significantly affected ( $P < 0.05$ ) during storage. The values of the four samples for enumeration of *Listeria monocytogenes* in both whole and sliced mortadella were significantly different ( $p < 0.05$ ) where, in the samples containing higher concentrations (2 and 3%) of chitosan, it was found a reduction of 3 logarithmic cycles. In the second article, the objective was to evaluate the effects of adding different concentrations of chitosan (0, 1, 2 and 3%) in technological and sensory characteristics of mortadella. The instrumental color indices did not differ ( $P > 0.05$ ) among treatments, the parameters of hardness and chewiness reduced ( $p < 0.05$ ) with the increasing addition of chitosan in the formulation. The samples' hedonic notes were between 6 and 8 ('slightly liked' and 'enjoyed'). At CATA, the most accepted samples were those that contained 2 to 3% of chitosan, suggesting that control presented "light pink color", "meat flavor", "salty", "aftertaste of fat", "stale taste" and the sample with 3% chitosan presented "characteristic flavor of mortadella". In the third article, the aim was to evaluate the synergistic effect of chitosan and essential oil of *Syzygium aromaticum*, with reduction of sodium nitrite on *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 inoculated in mortadella and its activity on lipid oxidation of the product, which was used the Central Composite Design (CCD). The concentration of chitosan influenced the pH values in the studied mortadella, both on the first day of storage and after thirty days. For residual nitrite there was clearly a smaller reduction of the residual nitrite concentration when in higher concentrations of chitosan. It can be seen that the highest concentrations of *Syzygium aromaticum* essential oil presented antioxidant in TBARS analysis. The highest concentrations of essential oil of *Syzygium aromaticum* and chitosan influenced the counting of *Listeria monocytogenes* among the treatments in both the first day of storage and after thirty days. Therefore, with the results of

this thesis it can be concluded that there is technological feasibility, antioxidant activity and antimicrobial activity against a pathogen of great interest in the meat industry, in the addition of chitosan and essential oil in meat products, obtaining also a product source of fibers.

**Keywords:** Soluble dietary fiber. Essential oil. Food pathogen.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

- Figura 1** Eletromicrografias de transmissão dos estágios do ciclo de vida intracelular de *Listeria monocytogenes*. (1) A penetração no epitélio intestinal ocorre pela atuação de duas proteínas de superfície: internalina A (InIA) e internalina B (InIB). (2) A bactéria é fagocitada por macrófagos do hospedeiro. (3) A lise da membrana fagocítica ocorre pela atuação da listeriolisina O (LLO) e de fosfolipases C (PLCs). (4) A bactéria ganha acesso ao citoplasma celular. (5) O movimento inter e intracelular ocorre pela polimerização de uma cauda de actina no citoplasma do hospedeiro, pela ação da proteína de superfície ActA. A bactéria se dissemina pela corrente sanguínea, ganhando acesso a diferentes órgãos..... 25
- Figura 2** Estrutura química da quitina e da quitosana..... 32
- Figura 3** Localidades e mecanismos de ação de componentes dos óleos essenciais em células bacterianas. Danos à membrana citoplasmática e proteínas de membrana; efluxo de constituintes intracelulares; coagulação do citoplasma e depleção da força próton motiva..... 47

### SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

#### ARTIGO 1

- Figura 1** Alterações nos valores de pH durante o tempo de armazenamento de mortadelas elaborados com diferentes concentrações de quitosana. Q0: controle; Q1: amostra elaborada com adição de 1% de quitosana; Q2: amostra elaborada com adição de 2% de quitosana; Q3: amostra elaborada com adição de 3% de quitosana..... 81
- Figura 2** Alterações nos valores de Nitrito durante o tempo de armazenamento de mortadelas elaborados com diferentes concentrações de quitosana. Q0: controle; Q1: amostra elaborada com adição de 1% de quitosana; Q2: amostra elaborada com adição de 2% de quitosana; Q3: amostra elaborada com adição de 3% de quitosana..... 82

<b>Figura 3</b>	Alterações nos valores de TBARs durante o tempo de armazenamento de mortadelas elaborados com diferentes concentrações de quitosana. Q0: controle; Q1: amostra elaborada com adição de 1% de quitosana; Q2: amostra elaborada com adição de 2% de quitosana; Q3: amostra elaborada com adição de 3% de quitosana.....	84
<b>Figura 4</b>	Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> na mortadela inteira (A) e na mortadela fatiada (B) durante o tempo de armazenamento de mortadelas elaborados com diferentes concentrações de quitosana. Q0: controle; Q1: amostra elaborada com adição de 1% de quitosana; Q2: amostra elaborada com adição de 2% de quitosana; Q3: amostra elaborada com adição de 3% de quitosana.....	85
<b>ARTIGO 2</b>		
<b>Figura 1</b>	Análise de componentes principais (PCA) das médias das análises de caracterização tecnológica das amostras de mortadela. Q0: amostras controle; Q1: amostras elaboradas com 1% de quitosana; Q2: amostras com 2% de quitosana; e Q3: amostras com 3% de quitosana.....	110
<b>Figura 2</b>	Mapa de preferência interno (MPI) para aparência, sabor, textura e impressão global das amostras de mortadela e Tri-plot (PARAFAC) para aparência, sabor e textura das amostras de mortadela com base nas pontuações dos consumidores no teste de aceitação. Q0: amostras controle; Q1: amostras elaboradas com 1% de quitosana; Q2: amostras com 2% de quitosana; e Q3: amostras com 3% de quitosana.....	114
<b>Figura 3</b>	Mapa de preferência externo (MPE) obtido a partir dos termos sensoriais do questionário Check-all-that-apply (CATA) na matriz de correlação com impressão de impressão geral do consumidor para as amostras de mortadela. Q0: amostras controle; Q1: amostras elaboradas com 1% de quitosana; Q2: amostras com 2% de quitosana; e Q3: amostras com 3% de quitosana.....	116
<b>Figura 4</b>	Análise de componentes principais (PCA) das médias da análise instrumental de cor (CIELAB) e dos termos sensoriais para a cor do questionário Check-all-that-apply (CATA) para as amostras de mortadela. Q0: amostras controle; Q1: amostras elaboradas com 1% de quitosana; Q2: amostras com 2% de quitosana; e Q3: amostras com 3% de quitosana.. L*: luminosidade; a*: índice de cor vermelha; b*: índice de cor amarela; C*: índice de saturação; h*: ângulo de tonalidade.....	118

<b>Figura 5</b>	Análise de componentes principais (PCA) das médias da análise perfil de textura (TPA) e dos termos sensoriais para a textura do questionário Check-all-that-apply (CATA) para as amostras de mortadela. Q0: amostras controle; Q1: amostras elaboradas com 1% de quitosana; Q2: amostras com 2% de quitosana; e Q3: amostras com 3% de quitosana.....	119
-----------------	---	-----

### **ARTIGO 3**

<b>Figura 1</b>	Superfície de resposta para o pH das mortadelas acrescidas de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, armazenadas a 7 °C por 24 horas (A) e por 30 dias (B).....	144
<b>Figura 2</b>	Superfície de resposta para o nitrito residual das mortadelas acrescidas de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, armazenadas a 7 °C por 24 horas (A) e por 30 dias (B).....	148
<b>Figura 3</b>	Superfície de resposta para o TBARs das mortadelas acrescidas de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, armazenadas a 7 °C por 24 horas (A) e por 30 dias (B).....	152
<b>Figura 4</b>	Superfície de resposta para a enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> das mortadelas acrescidas de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, armazenadas a 7 °C por 24 horas (A) e por 30 dias (B).....	155

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 2

<b>Tabela 1</b>	Termos sugeridos para cada atributo sensorial durante a primeira fase das questões do Check-all-that-apply (CATA).....	103
<b>Tabela 2</b>	Médias <sup>1</sup> ( $\pm$ desvio padrão) das características tecnológicas das amostras de mortadelas.....	107
<b>Tabela 3</b>	Médias <sup>1</sup> ( $\pm$ desvio padrão) das notas <sup>2</sup> do teste de aceitação para as amostras de mortadelas.....	112

### ARTIGO 3

<b>Tabela 1</b>	Delineamento fatorial completo para mortadelas contendo quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia.....	137
<b>Tabela 2</b>	Constituintes químicos do óleo essencial de cravo-da-índia ( <i>Syzygium aromaticum</i> ) e seus respectivos teores.....	138
<b>Tabela 3</b>	Coefficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o pH em mortadela adicionada de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, no tempo zero e tempo trinta.....	142
<b>Tabela 4</b>	Modelo ajustado para os coeficientes significativos para o pH no tempo zero e tempo trinta.....	143
<b>Tabela 5</b>	Coefficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o nitrito residual em mortadela adicionada de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, no tempo zero e tempo trinta.....	145
<b>Tabela 6</b>	Modelo ajustado para os coeficientes significativos para o nitrito residual no tempo zero e tempo trinta.....	146
<b>Tabela 7</b>	Coefficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o TBARs em mortadela adicionada de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, no tempo zero e tempo trinta.....	149
<b>Tabela 8</b>	Modelo ajustado para os coeficientes significativos para o pH no tempo zero e tempo trinta.....	150
<b>Tabela 9</b>	Coefficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para a enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> em mortadela adicionada de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, no tempo zero e tempo trinta.....	153
<b>Tabela 10</b>	Modelo ajustado para os coeficientes significativos para o pH no tempo zero e tempo trinta.....	154

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	18
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	21
<b>2.1</b>	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	21
<b>2.1.1</b>	Características do microrganismo.....	21
<b>2.1.2</b>	Ciclo intracelular de infecção.....	22
<b>2.1.3</b>	A importância da <i>Listeria monocytogenes</i> em produtos cárneos.....	25
<b>2.2</b>	Produtos funcionais.....	29
<b>2.2.1</b>	Fibras alimentares.....	29
<b>2.2.2</b>	Utilização de fibras alimentares em produtos cárneos.....	31
<b>2.3</b>	Quitosana.....	32
<b>2.3.1</b>	Aplicações industriais da quitosana.....	34
<b>2.3.1.1</b>	Atividade antimicrobiana da quitosana.....	35
<b>2.3.1.2</b>	Atividade antioxidante da quitosana.....	37
<b>2.4</b>	Nitrito/Nitrato em produtos cárneos curados.....	37
<b>2.5</b>	Óleos essenciais.....	41
<b>2.5.1</b>	Óleos essenciais em alimentos.....	44
<b>2.5.2</b>	Atividade antimicrobiana de óleos essenciais.....	46
<b>2.6</b>	Matriz alimentar: mortadela.....	50
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52
	<b>SEGUNDA PARTE</b> .....	68
	<b>ARTIGO 1 - INIBIÇÃO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> POR QUITOSANA ADICIONADA EM MORTADELA INTEIRA E FATIADA</b> .....	68
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	72
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	74
<b>2.1</b>	Padronização, estocagem e preparo dos inóculos das células vegetativas.....	74
<b>2.2</b>	Concentração mínima bactericida (CMB) da quitosana sobre a <i>Listeria monocytogenes in vitro</i> .....	75
<b>2.3</b>	Elaboração das mortadelas.....	75
<b>2.4</b>	Preparo das amostras.....	76
<b>2.5</b>	Caracterização das mortadelas.....	77
<b>2.6</b>	Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> nas mortadelas inteiras e fatiadas.....	77
<b>2.7</b>	Análises estatísticas.....	78

3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	79
3.1	<b>Concentração mínima bactericida (CMB) da quitosana sobre a <i>Listeria monocytogenes in vitro</i></b> .....	79
3.2	<b>Caracterização das mortadelas</b> .....	79
3.3	<b>Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i></b> .....	84
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	88
	<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	89
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	90
	<b>ARTIGO 2 - Caracterização tecnológica e sensorial de mortadelas formuladas com quitosana</b> .....	94
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	97
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	100
2.1	<b>Elaboração das mortadelas</b> .....	100
2.2	<b>Caracterização das mortadelas</b> .....	101
2.3	<b>Análise sensorial</b> .....	102
2.4	<b>Análises estatísticas</b> .....	104
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	106
3.1	<b>Caracterização das mortadelas</b> .....	106
3.2	<b>Análise sensorial</b> .....	111
3.2.1	<b>Teste de aceitação</b> .....	111
3.2.2	<b>Check-all-that-apply (CATA)</b> .....	115
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	121
	<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	121
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	122
	<b>ARTIGO 3 - Atividade antibacteriana in vitro e in situ de antimicrobianos naturais sobre <i>Listeria monocytogenes</i></b> .....	127
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	130
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	132
2.1	<b>Padronização, estocagem e preparo dos inóculos das células vegetativas</b> .....	132
2.2	<b>Avaliação quantitativa dos constituintes do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (Cravo-da-índia)</b> .....	133
2.3	<b>Concentração mínima bactericida (CMB) da quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia sobre a <i>Listeria monocytogenes in vitro</i></b> .....	133
2.4	<b>Elaboração das mortadelas</b> .....	134
2.5	<b>Preparo das amostras</b> .....	135
2.6	<b>Caracterização das mortadelas</b> .....	135
2.7	<b>Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> nas mortadelas</b> .....	136

2.8	Análises estatísticas.....	137
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	138
3.1	Caracterização química do óleo essencial.....	138
3.2	Concentração Mínima Bactericida (CMB) da quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia sobre a <i>Listeria monocytogenes in vitro</i> .....	140
3.3	Caracterização das mortadelas.....	142
3.4	Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> nas mortadelas.....	153
4	<b>CONCLUSÃO.....</b>	158
	<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	158
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	159

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos, os consumidores tem aumentado a exigência por alimentos seguros e mais naturais, estão cada dia mais preocupados com os danos relacionados às doenças transmitidas por alimentos de origem microbiana, bem como, os efeitos colaterais relacionados ao uso de aditivos artificiais em alimentos, particularmente em produtos cárneos. Neste contexto, surgem os antimicrobianos naturais, tais como quitosana e óleos essenciais, como alternativa de substituição parcial ou total destes conservadores químicos sintéticos em alimentos.

A quitosana apresenta atividade antimicrobiana comprovada contra inúmeros microrganismos patogênicos. O seu mecanismo de ação sobre os microrganismos não está completamente elucidado, mas propostas são sugeridas. Alguns pesquisadores correlacionam a atividade antimicrobiana da quitosana à formação de complexos polieletrólíticos, uma vez que seus grupos amínicos protonados provavelmente se ligam seletivamente à superfície negativamente carregada dos microrganismos, o que interfere na atividade celular e na permeabilidade da membrana e resulta na perda de componentes intracelulares com consequente inibição microbiana (TSAI, 2004; YADAV; BHISE, 2004).

Quando combinados os antimicrobianos naturais, como quitosana e óleos essenciais, ambos com atividade antimicrobiana comprovada, pode ocorrer um sinergismo entre estes. Com isso, há a possibilidade da redução do conservador químico sintético utilizado na cura de produtos cárneos: o nitrito.

Os óleos essenciais são frações líquidas, voláteis e odoríferas obtidas a partir do metabolismo secundário de espécimes vegetais. São misturas naturais complexas que podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações

variáveis. São caracterizados por dois ou três compostos majoritários presentes em concentrações relativamente elevadas (20-70%) existindo outros componentes presentes em concentrações vestigiais (traços) (BAKKALI et al., 2008).

Neste contexto a quitosana e óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) surgem como potenciais antimicrobianos contra microrganismos patogênicos causadores de surtos devido à ingestão de produtos cárneos. Dentre os diversos microrganismos contaminantes destes produtos, a *Listeria monocytogenes* figura como uma ameaça à saúde do consumidor e como preocupação para a indústria de cárneos prontos para o consumo, sendo tal fato relacionado à sua elevada resistência fisiológica e capacidade de sobrevivência e multiplicação em alimentos armazenados sob refrigeração.

Além de ser uma substância com atividade antimicrobiana, a quitosana ainda apresenta características funcionais. Esta é uma fibra natural de origem animal, que apresenta propriedades benéficas superiores a outras fibras dietéticas, tanto sintéticas quanto naturais. Extraída do exoesqueleto de crustáceos e com estrutura química semelhante à celulose, pode atuar como um alimento funcional, reduzindo a absorção das gorduras no intestino e promovendo a redução da concentração de colesterol sérico.

Uma deficiência observada nos produtos cárneos é que estes não apresentam fibras em sua composição centesimal, por outro lado, esta deficiência propicia uma gama de pesquisas para a incorporação destas, como, por exemplo, a adição de quitosana, fato altamente interessante tanto para a comunidade científica, quanto para os consumidores, especialmente no setor dos embutidos.

O mercado de embutidos cárneos tem apresentado significativa expansão e alta competitividade na última década, uma vez que, o consumo destes produtos tornou-se parte do hábito alimentar de uma parcela considerável dos consumidores brasileiros. Um exemplo é a mortadela, um produto cárneo emulsionado, embutido e curado que é consumido por todas as classes sociais,

fornecendo fonte de proteína de origem animal a uma população que não possui condições econômicas para suprir a quantidade proteica recomendada.

Desta forma, este trabalho teve por proposta central avaliar a atividade antimicrobiana de quitosana e óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) adicionados em diferentes concentrações em mortadelas sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, bem como, a incorporação de fibras ao produto cárneo, sua atividade sobre a oxidação lipídica e aceitação sensorial do produto.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Listeria monocytogenes*

#### 2.1.1 Características do microrganismo

*Listeria* foi o nome dado em homenagem a Lord Lister, cirurgião e pesquisador inglês que demonstrou em 1865, que o ácido carbólico (fenol) era efetivo agente antisséptico. *Listeria monocytogenes* foi descrita pela primeira vez em 1926 por Murray, que estudava cobaias de laboratórios, que apresentavam monocitose, porém foi na década de 80 que a listeriose ficou mais conhecida, devido a diversos surtos que ocorreram na América do Norte e Europa, pelo consumo de alimentos contaminados (FARBER; PETERKIN, 1991).

São reconhecidas seis espécies de *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi*, sendo a principal espécie patogênica a *L. monocytogenes* (GERMANO; GERMANO, 2001; JAY, 2005).

*Listeria monocytogenes* pode ser isolada do solo, água, silagem, plantas e outras fontes. É uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa, catalase positiva, oxidase negativa, halotolerante, não formadora de esporos e desprovida de cápsula. Possui morfologia de bacilo, diâmetro de 0,4-0,5 µm, comprimento de 0,5-2,0 µm, extremidades arredondadas e flagelos peritríquios que permitem sua motilidade (ADAMS; MOSS, 2004; ROCOURT, 1999). Essa bactéria, mesmo não sendo esporulada, apresenta destacável resistência e suporta os efeitos deletérios do congelamento, desidratação, acidez e calor, além de se desenvolver em ambientes com baixas tensões de oxigênio, devido à sua característica microaerófila (SAKATE et al., 2003). A faixa de pH para crescimento desta bactéria situa-se entre 5,6 a 9,6 (JAY, 2005). A atividade de água (aw) ótima é maior que 0,97, porém, a mínima varia entre 0,90-0,93, suportando concentrações

de NaCl superiores a 10 %. Possui capacidade de se desenvolver em temperaturas que variam de -0,4° a 50 °C, apresentando crescimento ótimo entre 30 e 37 °C 32 (JAY, 2005). Diferentemente da maioria dos outros patógenos, apresenta características psicotróficas podendo desenvolver-se e multiplicar-se em alimentos mantidos sob temperaturas de refrigeração (DYKES, 2003).

Existem 13 sorotipos de *Listeria monocytogenes* que podem causar doença, porém 95% dos isolados pertencem aos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1998).

### **2.1.2 Ciclo intracelular de infecção**

A *Listeria monocytogenes* é considerada patogênica a humanos. A doença por ela provocada, denominada listeriose, ganhou importância como enfermidade de origem alimentar no início dos anos 1980, sendo responsável por casos de aborto, meningite e septicemia, diagnosticada principalmente em pessoas pertencentes a grupos de risco, como pessoas imunodeprimidas, idosos, crianças e mulheres grávidas (FARBER; PETERKIN, 1991). Em meados de 1990 uma nova forma da infecção não invasiva foi reconhecida, envolvendo sintomas gastrointestinais suaves, afetando pessoas saudáveis (DALTON et al., 1997; SALAMINA et al., 1996; SCHLECH, 1997).

O período de incubação da listeriose varia de horas a semanas, contudo, a dose infectante necessária para causar a doença, ainda, não está bem definida. A ocorrência da listeriose depende do nível de contaminação dos produtos alimentícios por *Listeria monocytogenes*, da imunidade do hospedeiro e da virulência das cepas envolvidas. A dose infecciosa de *Listeria monocytogenes* não é conhecida, mas dados epidemiológicos indicam que é maior que 10<sup>4</sup> UFC/g. Dentre os alimentos mais comumente incriminados em surtos de listeriose destacam-se aqueles prontos para o consumo, mantidos sob-refrigeração e

ingeridos sem aquecimento prévio, tais como leite e produtos lácteos, carnes e derivados, peixes, vegetais e frutos do mar (KRAMARENKO et al., 2013).

A manifestação clínica da doença é descrita de duas formas: listeriose gastrointestinal (não invasiva) e listeriose invasiva. A listeriose não invasiva pode causar infecções brandas, semelhantes a uma gripe, até surtos de gastroenterite febril em indivíduos saudáveis, mas normalmente não evolui para óbito (CARRIQUE-MAS et al., 2003; GAHAN; HILL, 2005). Já a listeriose invasiva é uma doença severa, pois, a taxa de mortalidade é alta (20 a 30%), principalmente, para pessoas susceptíveis a adquirir a infecção, como gestantes, recém-nascidos, idosos, pacientes submetidos à hemodiálise, a terapias prolongadas e indivíduos com sistema imunológico deprimido. As manifestações mais comuns são meningite, meningoencefalite, septicemia e aborto (DONELLY, 2001).

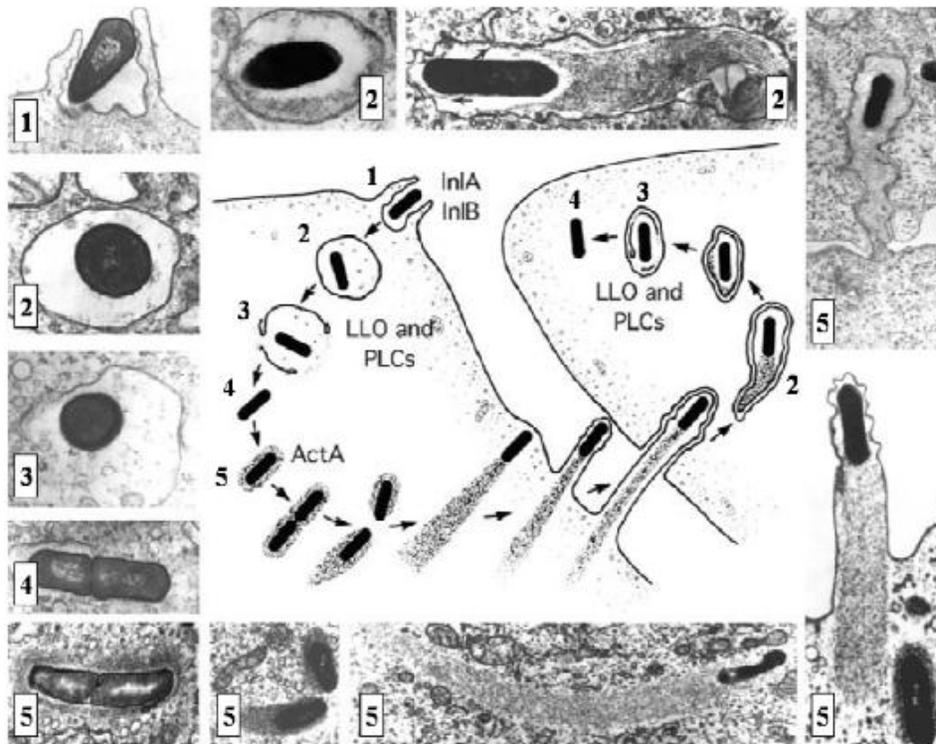
O Centers for Disease Control and Prevention - CDC (2014) estima a ocorrência de aproximadamente 1600 casos de doenças e 260 mortes devido à listeriose anualmente nos Estados Unidos. No ano de 2014, a incidência média anual de listeriose nos Estados Unidos foi de 0,26 casos por 100.000 indivíduos, com uma taxa de incidência superior à meta estabelecida pelo país (0,25).

*Listeria monocytogenes* é considerada como um patógeno oportunista, devido à ocorrência da infecção depender, principalmente, das condições imunológicas dos indivíduos afetados. A ocorrência de listeriose de origem alimentar é relatada principalmente em países industrializados, com poucos, ou nenhum relato em países em desenvolvimento. Entretanto, não se sabe se isto é devido à diferentes taxas de exposição, hábitos alimentares e susceptibilidade do hospedeiro ou à falta de sistemas de pesquisa e informação de dados (CAGRI-MEHMETOGLU et al., 2011).

Como mencionado, a *Listeria monocytogenes* é um parasita intracelular facultativo e que pode se proliferar dentro de macrófagos e em outras células

não fagocíticas, como células epiteliais e hepatócitos. Este microrganismo tem a capacidade de evitar a resposta do sistema imune, por se multiplicar dentro da célula hospedeira e, assim, consegue disseminar-se através da passagem célula-célula. O ciclo intracelular da doença ocorre da seguinte maneira: O ciclo intracelular da doença: escape do fagossomo após a fagocitose, multiplicação na célula hospedeira e invasão da célula vizinha. A invasão é decorrente da polimerização de filamentos de actina que impulsionam a bactéria em direção à célula adjacente, provocando a formação de invaginações e fagocitose, começando assim, um novo ciclo (Figura 1).

**Figura 1** Eletromicrografias de transmissão dos estágios do ciclo de vida intracelular de *Listeria monocytogenes*. (1) A penetração no epitélio intestinal ocorre pela atuação de duas proteínas de superfície: internalina A (InlA) e internalina B (InlB). (2) A bactéria é fagocitada por macrófagos do hospedeiro. (3) A lise da membrana fagocítica ocorre pela atuação da listeriolisina O (LLO) e de fosfolipases C (PLCs). (4) A bactéria ganha acesso ao citoplasma celular. (5) O movimento inter e intracelular ocorre pela polimerização de uma cauda de actina no citoplasma do hospedeiro, pela ação da proteína de superfície ActA. A bactéria se dissemina pela corrente sanguínea, ganhando acesso a diferentes órgãos.



Fonte: Adaptado de Oliveira (2011) e Tilney e Portnoy (1989)

### 2.1.3 A importância da *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos

Os alimentos contaminados são as maiores fontes de transmissão de *L. monocytogenes*, tanto em surtos como nos casos esporádicos de listeriose, indicando

que o trato gastrointestinal (TGI) é o principal ponto de entrada do patógeno no organismo humano e o foco primário de colonização (JING et al., 2010). *Listeria monocytogenes* é extremamente preocupante para as indústrias de processamento de carnes, muitos surtos de listeriose tem sido correlacionado ao consumo de produtos cárneos, onde muitas amostras de *Listeria monocytogenes* já foram isoladas (MARTIN et al., 2014).

Essa preocupação também atinge várias indústrias alimentares, principalmente aos fabricantes de prontos para comer (RTE). A bactéria já foi isolada de leite cru, queijos, carnes frescas e congelados, aves, frutos do mar, frutas e produtos hortícolas, bem como do ambiente e de equipamentos de indústrias processadoras de alimentos (MONTVILLE; MATTHEWS; KNIEL, 2012).

Fatores intrínsecos dos alimentos, bem como técnicas de conservação e armazenamento de uso comum no ramo alimentício podem modular fatores de virulência de bactérias patogênicas (RANTSIOU et al., 2011). Já foi demonstrado que pode ocorrer modulação de genes de virulência em *Listeria monocytogenes* sob diversas condições encontradas no ambiente, resultando num perfil variado de infectividade (BUENO et al., 2010; OLESEN; VOGENSEN; JESPERSEN, 2009).

A carne é considerada uma importante fonte de proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas especialmente as do complexo B e minerais, e devido a essa composição rica em nutrientes é que se tem um excelente meio de cultura para o desenvolvimento deste microrganismo e outros patógenos (BORCH; ARINDER, 2002).

*Listeria* spp. pode ser isolada de carcaças em etapas do abate, na medida que animais doentes ou sadios podem veicular a bactéria, principalmente através do intestino. O congelamento, desidratação superficial e resfriamento não afetam a sobrevivência da *Listeria* spp. na carne (FABER; PETERKIN, 1991).

A adoção de padrões microbiológicos com exigência de ausência de *Listeria monocytogenes* em alimentos por parte de diversos países visa assegurar um produto isento de risco para o consumidor, pois embora uma única célula deste microrganismo, provavelmente, não seja suficiente para causar listeriose, sua capacidade de multiplicação durante a estocagem de alimentos, mesmo sob refrigeração, faz com que sua presença no alimento coloque em risco a saúde dos consumidores mais susceptíveis (gestantes, crianças, imunodeprimidos) (CATÃO; CEBALLOS, 2001).

Nos Estados Unidos a Food and Drug Administration – FDA estabeleceu a norma de “tolerância zero” para presença de *Listeria monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo, sendo seguida pelo United States Department of Agriculture (USDA). No Brasil, apesar de não existir surtos de listeriose documentados, tendo como causa ingestão de alimentos, recentemente, pesquisas já demonstraram o isolamento de *Listeria monocytogenes* em carne e produtos cárneos no país. (BARBALHO et al., 2005).

Entretanto, é necessário se colocar que os dados reais podem estar sendo subestimados, uma vez que a legislação brasileira (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2001) não prevê limites de tolerância para presença deste microrganismo em carnes e produtos cárneos. Várias são as causas apontadas para a destacável ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos. Uma das hipóteses é que a incidência poderia estar relacionada à presença do microrganismo no ambiente intestinal dos animais, sem que ocorra a manifestação de sintomatologia clínica, facilitando, desta forma, que toda a carcaça possa ser contaminada durante as operações envolvidas no abate e evisceração do animal.

Kasnowski (2004) cita a contaminação por pessoas envolvidas no trabalho em abatedouros, sendo constatado que 10 a 30 % eram portadores assintomáticos de *L. monocytogenes*, e também que veterinários de campo

apresentavam listeriose cutânea adquirida pela manipulação de produtos de aborto infectados. Atualmente, autores (BENKERROUM et al., 2005; MARTÍN et al., 2004) relatam que a facilidade do gênero *Listeria* em multiplicar-se nos equipamentos de plantas processadoras de alimentos e sob baixas temperaturas o torna uma ameaça à indústria de alimentos.

O fator que auxilia a proliferação de *Listeria* na planta de processamento é o crescimento de biofilmes, que podem conferir uma proteção contra a ação de desinfetantes com conseqüente manutenção do microrganismo no ambiente e em equipamentos como fatiadores, moedores e embutideiras, que são considerados de difícil higienização (MORETRO; LSNGSRUD, 2004; OLIVEIRA, 2011).

Além disso, estudos apontam que a situação pode ser agravada, pois a microbiota autóctone da carne não interfere no crescimento de *Listeria* sp., uma vez que esse gênero foi detectado mesmo nas amostras de carne e produtos cárneos, e em amostras ambientais e de superfície de equipamentos, que apresentaram altos níveis de contaminação por aeróbios mesófilos e coliformes (BARROS et al., 2007).

Mead et al. (2006) abordaram a ocorrência de um surto com produtos cárneos processados, envolvendo 108 pessoas contaminadas e 14 mortes, onde foi confirmada a presença de *Listeria monocytogenes* como agente contaminante. Contudo, tendo em vista os riscos impostos por *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos e o emprego indiscriminado dos aditivos artificiais, mostrando a necessidade de alternativas de aditivos naturais em combinação com outros métodos de conservação para agirem como obstáculos (“Hurdle Technology”), surge a possibilidade do uso da quitosana como composto antimicrobiano natural e de baixa toxicidade, o qual pode proporcionar segurança microbiológica e química para os consumidores de produtos cárneos.

## **2.2 Produtos funcionais**

Os alimentos funcionais se caracterizam por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crônicas degenerativas (WALZEM, 2004).

Segundo a Anvisa (1999), a alegação de propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. Fibras, ácidos graxos, fitoesteróis e probióticos são alguns dos alimentos com comprovadas alegações funcionais no Brasil.

Por legislação (ANVISA, 2012), um alimento considerado fonte de fibras, precisa ter pelo menos 3g de fibra por 100 g ou 100 ml em pratos preparados, conforme o caso, ou no mínimo de 2,5 a 3,0 g de fibra por porção. Quando a fibra for a quitosana, os fabricantes podem utilizar a seguinte alegação: “A quitosana auxilia na redução da absorção de gordura e colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. Esta alegação pode ser utilizada desde que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 3g de quitosana se o alimento for sólido ou 1,5g se o alimento for líquido (ANVISA, 2008). É válido pontuar a recomendação de consumo médio de 21-38g/dia de fibra alimentar. Sendo que os nutricionistas e especialistas em dieta sugerem que 20-30% da ingestão diária de fibra deve ser composta por fibras solúveis (ELLEUCH et al., 2011).

### **2.2.1 Fibras alimentares**

No cenário atual verifica-se que o padrão alimentar dos seres humanos mudou para uma dieta rica em produtos industrializados, onde gorduras e

açúcares adicionados são amplamente consumidos, enquanto a ingestão de proteínas vegetais e fibras alimentares são reduzidas (KENDALL; ESFAHANI; JENKINS, 2010). Apesar disso, os benefícios creditados a uma alimentação saudável e a conscientização da população da importância quanto ao consumo de alimentos contendo substâncias que auxiliam a promoção da saúde (MORAES; COLLA, 2006) alertaram intensamente todos os setores responsáveis pela produção de alimentos, levando à busca por alternativas de transformação, conservação e alteração química destes produtos. Com isso, ressalta-se a ampliação da utilização de fibras alimentares em alimentos.

A comissão do Codex Alimentarius define fibras dietéticas, também chamadas de fibras alimentares, como polímeros de carboidratos não digeridos, tampouco absorvidos no intestino delgado. Estão incluídos neste grupo: polissacarídeos, oligossacarídeos e substâncias ligadas às fibras, como a lignina (MENEZES et al., 2013).

Estas são amplamente estudadas em decorrência de seus benefícios, entre eles: a redução de colesterol sanguíneo, melhorias na função do intestino grosso e diminuição da glicemia pós-prandial (colaborando desta forma para a prevenção ou redução de doenças intestinais), diminuição do risco de doença cardíaca coronária e diabetes do tipo 2 (KENDALL; ESFAHANI; JENKINS, 2010; MUDGIL; BARAK, 2013).

Os carboidratos não digestíveis podem ser classificados como solúveis e insolúveis, sendo que fibras dietéticas solúveis formam uma solução quando misturadas com água e o mesmo não ocorre com os componentes insolúveis.

Fibras alimentares solúveis incluem substâncias pécicas, gomas, mucilagens, alginatos,  $\beta$ -glicanas e arabinoxilanas. Estas tendem a formar géis em contato com água, aumentando a viscosidade dos alimentos parcialmente digeridos no estômago. As fibras solúveis diminuem a absorção de ácidos biliares e têm atividades hipocolesterolêmicas. Quanto ao metabolismo lipídico, parecem

diminuir os níveis de triglicérides, colesterol e reduzir a insulinemia. Uma característica fundamental da fibra solúvel é sua capacidade para ser metabolizada por bactérias, com a conseguinte produção de gases (ELLEUCH et al., 2011).

Já as fibras alimentares insolúveis incluem a quitosana, celulose, hemicelulose, lignina e amido resistente (MUDGIL; BARAK, 2013). As fibras insolúveis são caracterizadas pela porosidade, baixa densidade, capacidade para aumentar a produção fecal e diminuir o tempo de trânsito intestinal. Para que fibras insolúveis provoquem redução do colesterol, é necessário que sejam adicionadas em grandes quantidades, bem como serem rapidamente fermentáveis (ELLEUCH et al., 2011; MANN; CUMMINGS, 2009).

A quitosana, celulose e algumas hemiceluloses são insolúveis em água, apresentam capacidade de se ligar à água e hidratar as fezes, o que aumenta o volume fecal e, assim, promove movimentos intestinais regulares. Embora os seres humanos não sejam capazes de digerir estes carboidratos, ocorre uma digestão parcial no intestino grosso pela microflora, tal fermentação natural no cólon produz uma quantidade significativa de ácidos graxos de cadeia curta, benéficos para as células intestinais (MUDGIL; BARAK, 2013).

### **2.2.2 Utilização de fibras alimentares em produtos cárneos**

As fibras alimentares estão sendo cada dia mais estudadas quanto a incorporação em diferentes alimentos. Os produtos cárneos entram como destaque nestas pesquisas, uma vez que estes produtos apresentam-se pobres em fibras em sua composição centesimal. Aliado a este fato, tem-se o aumento do consumo de produtos cárneos e a necessidade de produzir alimentos saudáveis com boa aceitabilidade.

Assim, a incorporação de componentes funcionais em derivados cárneos oferece benefícios adicionais à saúde, além da nutrição básica, o que os torna

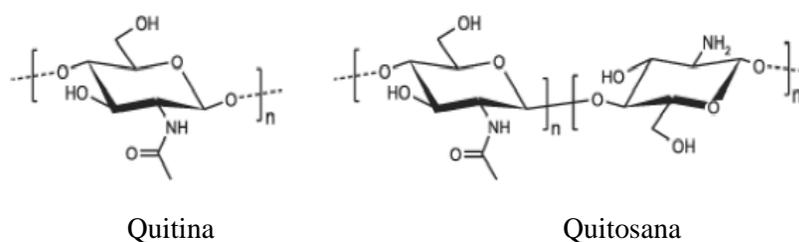
reconhecidos como alimentos funcionais (HAO; BETA, 2012). Tais produtos enriquecidos são mais saudáveis quando comparados com os convencionais, no entanto, a produção de alimentos funcionais limita-se, uma vez que pode alterar as características sensoriais do produto (MEHTA et al., 2015).

Diferentes trabalhos destacam a utilização das fibras alimentares em produtos cárneos: em salsichas, em hambúrgueres, empanados de carne (SEABRA et al., 2002).

### 2.3 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina (Figura 2) e, tem sido tradicionalmente usada nos países orientais para o tratamento de queimaduras e cicatrização de feridas. A quitosana foi isolada em 1859 pelo aquecimento da quitina em solução concentrada de hidróxido de potássio, resultando na sua desacetilação (CHANDY; SHARMA, 1993).

**Figura 2** Estrutura química da quitina e da quitosana



Quitosana, portanto, é composta de vários derivados provenientes da N-deacetilação da quitina, sendo um polímero linear, natural, insolúvel, que apresenta  $\beta$ -1,4 N-acetilglucosamina como unidade monomérica e, com exceção da celulose, é o polissacarídeo mais abundante e largamente distribuído na

natureza, servindo como elemento estrutural, e encontrado especialmente em animais invertebrados e na parede celular de fungos (FRANCO et al., 2005).

Atualmente, a fonte comercial principal de quitosana é a carapaça de moluscos, de camarão, de caranguejos e lagostas. A produção industrial da quitosana se faz por meio de reações de desacetilação, utilizando substâncias ácidas como reagente. As aplicações e características da quitosana dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho da cadeia polimérica.

A quitosana se caracteriza por possuir grupos amínicos livres, pela solubilidade em soluções ácidas, insolubilidade em pH superior a 6,5, insolubilidade em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, baixa solubilidade em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, insolubilidade em solventes orgânicos e grupos amínicos protonados (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), solubilidade em pH inferior a 6,5, capacidade de formar soluções viscosas com formação de geleificação com poliânions e de se solubilizar em misturas de água e álcool (MUZZARELLI; ROCCHETTI, 1986).

O grau de desacetilação (GD) é uma das características mais importantes da quitosana. Ele determina o conteúdo de grupos amínicos livres no polissacarídeo diferenciando-o da quitina e influenciando principalmente a sua solubilidade. Para a produção de quitosana, a quitina bruta é desacetilada com hidróxido de sódio 40 -50 % na temperatura de 110 -115 °C (PETER, 1995). O grau de desacetilação pode variar entre 70 e 95%, dependendo da metodologia utilizada (LI et al., 1992).

A quitosana é uma fibra alimentar de origem animal, que apresenta propriedades benéficas superiores a outras fibras dietéticas, tanto sintéticas quanto naturais, pode atuar como um alimento funcional, reduzindo a absorção das gorduras no intestino e promovendo a diminuição da concentração de colesterol sérico (MUZZARELLI; ROCCHETTI, 1986), além de atuar no tratamento e prevenção da obesidade, doenças coronarianas e certas desordens intestinais (JO et al., 2001).

Quando a fibra quitosana for adicionada, os fabricantes podem utilizar a seguinte alegação: “A quitosana auxilia na redução da absorção de gordura e colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. Esta alegação pode ser utilizada desde que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 3g de quitosana se o alimento for sólido ou 1,5g se o alimento for líquido. (ANVISA, 2008).

### **2.3.1 Aplicações industriais da quitosana**

Por se tratar de um polímero natural, biodegradável, extremamente abundante e atóxico, a quitosana tem sido proposta como um material potencialmente atraente para usos diversos, principalmente em engenharia, biotecnologia e medicina. As indicações mais comuns são seu emprego como meio complexante de íons metálicos, para a formação de coberturas com ação antifúngica e bactericida, como elemento básico para a confecção de matrizes de liberação controlada de drogas, embora ainda que controverso, como um agente ativo no emagrecimento humano por sua interação com gorduras e estruturas afins (ASSIS; LEONI, 2003; BORDERÍAS; ALONZO; MATEOS, 2005; CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 1999; FRANCO et al., 2005).

A quitosana é uma fibra natural solúvel em meio ácido, cuja característica permite que este polímero possa ser utilizado na indústria alimentícia, uma vez que as enzimas envolvidas nos processos de hidrólise deste polissacarídeo (lisozima, quitina deacetilase, quitinase e quitosanase) estão presentes nos organismos animais e vegetais (MELLO et al., 2006). Sendo assim, entende-se que a quitosana pode ser considerada uma opção promissora como conservante natural, haja vista a atual tendência adotada pela indústria de alimentos de uma política decrescente do uso de aditivos químicos, impulsionada pelo reflexo da debilidade e incerteza de ambos os estudos

negativos e positivos relacionados à toxicidade de muitas dessas substâncias químicas (DAMIAN et al., 2005).

### **2.3.1.1 Atividade antimicrobiana da quitosana**

A indústria de alimentos busca técnicas alternativas para substituir os métodos tradicionais de controle de microrganismos nos alimentos, como tratamentos intensos de calor, acidificação, congelamento, desidratação, e adição de sal e agentes químicos. Nos últimos anos, as tecnologias mais estudadas são a inativação de microrganismos por métodos não térmicos e utilização de antimicrobianos naturais (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

A quitosana exibe atividade antimicrobiana comprovada contra uma gama de microrganismos deteriorantes e patogênicos, dentre estes, vários de interesse à indústria cárnea (GARCIA et al., 2011; GÖKMEN; GÜRBÜZ, 2011; PURNAMA; MASATOSHI, 1994). O espectro de susceptibilidade microbiana depende de alguns fatores, como o tipo de microrganismo, o peso molecular, a fase de crescimento em que se encontra (LIU et al., 2006) o grau de desacetilação da quitosana, a temperatura e o pH do meio (CHEN; HWA, 1996; DAMIAN et al., 2005; GERASIMENKO et al., 2004). A atividade antimicrobiana da quitosana nem sempre é realizada em alimentos, devido à natureza altamente reativa que interage prontamente com proteínas, gorduras e outras substâncias aniônicas dos alimentos (RHOADES, 2000). Contudo, algumas aplicações bem-sucedidas são relatadas (BOSTAN; ISINMAHAN, 2011; GÖKMEN; GÜRBÜZ, 2011; JUNEJA et al., 2006; KANATT et al., 2008).

O mecanismo de ação da quitosana sobre os microrganismos não está completamente elucidado, mas várias propostas são sugeridas. Alguns pesquisadores correlacionam a atividade antimicrobiana da quitosana à formação de complexos polieletrólíticos, uma vez que seus grupos amínicos protonados

provavelmente se ligam seletivamente à superfície negativamente carregada dos microrganismos, o que interfere na atividade celular e na permeabilidade da membrana e resulta na perda de componentes intracelulares com conseqüente inibição microbiana (YADAV; BHISE, 2004). Estudos mais recentes revelam, ainda, que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas das soluções, concentração utilizada e tempo de exposição, além das características inerentes à membrana do microrganismo em questão (COSTA SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Neste sentido, pesquisas demonstram que a atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas aumenta quanto maior for a massa molecular do polímero, enquanto que, para bactérias Gram-negativas, quanto menor a massa molecular, maior o potencial antimicrobiano. Sugere-se então que os efeitos da quitosana são distintos nos dois tipos de bactérias: para Gram-positivas, a hipótese é que a quitosana de alta massa molecular forma películas ao redor da célula, que acabam por inibir a absorção de nutrientes, enquanto que a de baixa massa molecular penetra mais facilmente em bactérias Gram-negativas, ligando-se ao DNA e impedindo assim que o RNA e, conseqüentemente, as proteínas, sejam sintetizados causando distúrbios no metabolismo celular. Em adição, sabe-se que a quitosana também apresenta a função de agente quelante de íons metálicos, e dessa forma é sugerido ainda que a molécula pudesse interferir na produção de toxinas e crescimento microbiano (COSTA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Tsai e Hwang (2004) examinando a atividade antibacteriana *in vitro* frente a algumas bactérias patogênicas e probióticas, relataram que para a quitosana com grau de deacetilação entre 70 e 95%, a concentração mínima letal para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemoliticus*, *Listeria monocytogenes* e *Shigella dysenteriae* foi de 50 a 200 ppm, enquanto para *Clostridium perfringens* e bactérias probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* oscilou entre 250 e 1000 ppm.

### **2.3.1.2 Atividade antioxidante da quitosana**

Por razões de saúde pública, os processos de preservação de alimentos são determinados primeiramente pelo controle do desenvolvimento microbiano. Contudo, outros fatores devem ser controlados tais como, a ocorrência de reações químicas e enzimáticas que comprometem a qualidade sensorial do produto. Diversos estudos têm reportado a habilidade antioxidante da quitosana, tendo sido avaliado seu uso em carnes e derivados e frutos do mar que contém quantidades significativas de ácidos graxos insaturados, particularmente susceptíveis à oxidação lipídica durante seu processamento e armazenamento (KANATT; CHANDER; SHARMA, 2004).

O mecanismo de ação antioxidante da quitosana em produtos cárneos é atribuído à sua capacidade de atuar como quelante de íons metálicos, tais como o ferro, ligado às moléculas de hemoglobina e mioglobina, o qual age como catalisador desta reação (BARRETEAU; DELATTRE; MICHUD, 2006; KAMIL; JEON; SHAHIDI, 2002).

## **2.4 Nitrito/Nitrato em produtos cárneos curados**

No Brasil, os sais de cura comerciais são constituídos de mistura de cloreto de sódio (sal carreador) com nitrato e nitrito, de sódio ou potássio, ou apenas um desses. Qualquer que seja o sal utilizado (sódio ou potássio), a quantidade de nitrito residual no produto não pode passar de 150 ppm (expressa como nitrito de sódio). A quantidade de nitrato residual também é legislada, não podendo passar de 300 ppm (também expressa como nitrito de sódio) no produto (BRASIL, 1998, 2009).

Sais de nitrito e nitrato são adicionados à carne com os propósitos de conservação (especialmente como agente antimicrobiano contra *Clostridium*

*botulinum*) e pelas características sensoriais desejáveis que conferem aos produtos curados (FEINER, 2006; TOLDRÁ, 2010).

A coloração rosa avermelhada de produtos cárneos curados é um dos mais importantes efeitos do processo de cura. A mioglobina (Mb), principal pigmento associado à cor da carne, pode existir no músculo em três estados: mioglobina reduzida ou deoximioglobina ( $Mb^+$ ), oximioglobina ( $O_2Mb$ ) e metamioglobina (MMb). O átomo de ferro, elemento central do anel de porfirina, pode ser encontrado na forma reduzida ( $Fe^{2+}$ ) ou oxidada ( $Fe^{3+}$ ); estando em seu estado reduzido, outras moléculas podem se complexar formando compostos com colorações variadas. O oxigênio e outros agentes oxidantes como o nitrito podem oxidar o ferro da sua forma  $Fe^{2+}$  para  $Fe^{3+}$ .

Possivelmente, a reação inicial na cura consiste na conversão das formas químicas da mioglobina, em especial a oximioglobina, em metamioglobina ( $MbFe^{3+}$ ), que confere coloração marrom à carne (RAMOS; GOMIDE, 2007). No entanto, nas condições presentes na carne (pH entre 5,5 e 6,0), o nitrito é convertido a ácido nitroso ( $HNO_2$ ) e deste a óxido nítrico (NO), presentes em equilíbrio. O NO formado se combina com a porção heme da metamioglonina para originar o pigmento de nitrosometamioglobina ( $MbFeNO$ ), altamente instável e que é, rapidamente, reduzida à forma química de nitrosomioglobina ( $MbFe^{2+}NO$ ), pigmento de cor vermelho rosado característica de produtos curados crus (TOLDRÁ, 2010). A nitrosomioglobina, no entanto, é muito instável e a estabilização do complexo pode ser promovida pela desnaturação da molécula de globina pelo aquecimento (50-60 °C), formando o pigmento nitrosohemocromo que apresenta cor rósea característica de produtos curados (RAMOS; GOMIDE, 2007).

A atividade sobre *C. botulinum*, ou seja, atividade antibotulínica, do nitrito em carnes curadas é mais importante, em termos de saúde pública, do que os fatores cor e desenvolvimento de sabor, atributos relacionados à aceitação do

produto pelos consumidores. Para o desenvolvimento de cor e sabor, baixas dosagens, como 30 a 60 ppm, se mostram adequadas à diversos produtos cárneos. O efeito antibotulínico requer ao menos 120 ppm em bacon, presunto curado e em carne enlatada (FEINER, 2006). Esse é o motivo pelo qual as autoridades sanitárias de diversos países, entre eles o Brasil, permitem valores residuais máximos de 150 ppm em produtos curados (DUTRA, 2009).

O nitrito inibe o crescimento de *Clostridium botulinum* interferindo em enzimas ferro-enxofre, como a ferredoxina, evitando a síntese de adenosina trifosfato (ATP) a partir do piruvato. A primeira descoberta nesse sentido foi realizada por Woods et al. (1981 citado por JAY, 2005), que mostraram que o sistema fosforoclástico de *Clostridium sporogenes* é inibido pelo óxido nítrico. Mais tarde, foi demonstrado que o mesmo ocorre para o *C. botulinum* e também algumas outras espécies do gênero *Clostridium*, resultando em acúmulo de ácido pirúvico no meio (JAY, 2005).

O nitrito é capaz de retardar ou inibir reações de oxidação. Sua atividade antioxidante é baseada na formação de compostos estáveis entre pigmentos heme e nitrito (oxidante), com redução do  $Fe^{3+}$  para  $Fe^{2+}$  que reduz o número de íons ferro livre  $Fe^{3+}$  catalisadores da oxidação lipídica. Cerca de 20 a 60 ppm de nitrito são necessários para que atue como antioxidante (TOLDRÁ, 2010).

O nitrito apresenta efeito reduzido sobre *Micrococcus* ssp. *Lactobacillus* ssp. e *Enterococcus* ssp. A concentração residual de 80-140 ppm de nitrito de sódio, em produto cárneo, é barreira efetiva no controle microbiológico (CAMMACK et al., 1999; FEINER, 2006).

O nitrito em concentrações elevadas é tóxico para os seres humanos. O principal efeito tóxico é a oxidação da oxihemoglobina levando à methemoglobinemia, que pode ser fatal principalmente em crianças, cuja capacidade de redução de methemoglobina é baixa. Efeitos agudos foram

observados em casos de ingestão acidental em água potável, salsichas e remédios (CAMMACK et al., 1999).

O nitrito pode ser convertido em ácido nitroso, um dos principais precursores do agente nitrosante anidrido nitroso, principal agente nitrosante em alimentos, o qual reage com aminas e aminoácidos da carne para produzir nitrosaminas. Somente aminas secundárias formam nitrosaminas estáveis. Aminas primárias são, imediatamente, degradadas a álcool e nitrogênio, enquanto que as terciárias não reagem (KARL-OTTO, 2008) As nitrosaminas possuem efeito tóxico, mutagênico, neuro e nefrotóxico e carcinogêncio (FRANCIS, 2000). Microrganismos também podem participar da formação de nitrosaminas reduzindo o nitrato a nitrito e degradando proteínas em aminas e aminoácidos (TRICKER; PREUSSMANN, 1991).

A presença de compostos N-nitrosos tem sido relatada em grande variedade de carnes conservadas pelo uso de nitrito e nitrato. Entre as nitrosaminas voláteis detectadas estão N-nitrosodimetilamina (NDMA), Nnitrosopirrolidina (NPIR) e N-nitrosopiperidina (NPIP).

A aplicação de altas temperaturas, como na fritura, em produtos cárneos curados, resulta na formação de compostos cancerígenos, o que explica os altos níveis desses compostos observados em bacon. Devido ao fato de o processo de fritura ser comum em bacons, a *United States Department of Agriculture (USDA)* estabeleceu exigências especiais para esse produto, reduzindo os níveis de nitrito para 120 ppm, com exclusão do uso de nitrato, e aumento dos níveis de ascorbatos ou isoascorbato (eritorbatos) para 550 ppm (GLÓRIA; BARBOUR; SCALAN, 1997).

O ácido ascórbico (vitamina C), seu isômero ácido eritórbito e outros compostos redutores, como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), têm sido relatados como principais inibidores da reação de nitrosação (WALTERS, 1992). Outros substitutos têm sido estudados na tentativa de reduzir o teor de nitrito em produtos cárneos.

Diversos trabalhos têm demonstrando a preferência dos consumidores por alimentos “naturais”, ou seja, com índices reduzidos de aditivos químicos; com isso, diversos autores têm trabalhado a fim de obter a substituição total ou parcial de nitrito (AL-SHUIBI; AL-ABDULLAH, 2002; JAFARI; EMAN-DJOMEH, 2007; OLIVEIRA et al., 2011).

Vários compostos preservativos têm sido propostos, incluindo a nisina, o ácido sórbico e os sulfitos, entretanto, nenhum foi considerado completamente satisfatório. Já o uso de ácido sórbico e seus sais é considerado promissor no controle do *C. botulinum* em produtos curados, desde que o nitrito esteja presente em níveis acima de 40 ppm, uma vez que o uso do ácido sórbico sozinho em produtos cárneos emulsionados favorece a oxidação lipídica e altera os atributos sensoriais (AL-SHUIBI; AL-ABDULLAH, 2002).

## 2.5 Óleos essenciais

O metabolismo dos seres vivos é dividido em primário e secundário. O metabolismo primário diz respeito ao conjunto das reações químicas, relacionadas com a transformação de macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) em unidades constitutivas da célula, sendo, portanto, essencial à vida e comum a todos os seres vivos.

Vegetais, microrganismos e, em menor escala animais, possuem arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) capazes de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias, não necessariamente, relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo. Nesse grupo encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número de organismos, com bioquímica e metabolismo específicos e únicos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização. Esse conjunto metabólico é definido como metabolismo secundário, cujos produtos,

embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema (SANTOS, 2007). Os vegetais, em relação ao metabolismo secundário, possuem elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade numa mesma espécie (SIMÕES et al., 2007).

O conjunto de compostos secundários nas plantas é resultado do balanço entre formação e eliminação desses compostos durante o crescimento da planta, sendo esse equilíbrio influenciado por fatores fixos e variáveis, genéticos e os ambientais, como luz, temperatura, tipo de solo e água, respectivamente (CARDOSO et al., 2005).

Os metabólitos secundários apresentam várias atividades biológicas. Muitas são de importância comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica e de perfumarias, entre outras. Entre os metabólitos secundários, os principais grupos de compostos encontrados com atividade biológica são os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (SIMÕES et al., 2007).

Segundo Simões et al. (2007), embora vários órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais (flores, folhas, casca do caule, madeira, raízes, rizomas, frutos e sementes), sua composição pode variar conforme a localização em uma mesma espécie.

Os óleos essenciais são frações líquidas, voláteis e odoríferas obtidas a partir do metabolismo secundário de espécimes vegetais; apresentam propriedades biológicas comprovadas, como atividade antioxidante e antimicrobiana. São misturas naturais complexas que podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações variáveis. São caracterizados por dois ou três compostos majoritários presentes em concentrações relativamente elevadas (20-70%) existindo outros componentes presentes em concentrações vestigiais

(traços) (BAKKALI et al., 2008). Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre (SIMÕES et al., 2007).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada, geneticamente e, em geral, é específica para um determinado órgão e característica para seu estágio de desenvolvimento. As condições ambientais são capazes, porém, de causar variações significativas, como a influência do ciclo vegetativo, em que a concentração de cada um dos constituintes do óleo pode variar durante o desenvolvimento do vegetal. O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e os tipos de cultivo também influenciam na composição química dos óleos essenciais. A temperatura, a umidade relativa, o sol e o regime de ventos exercem influência direta, sobretudo, sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem de óleo essencial na superfície (SALGADO, 2005). As plantas ricas em óleos essenciais devem ser coletadas pela manhã ou à noite, pois, o período de exposição ao sol pode provocar perdas quantitativas importantes do óleo existente no vegetal. O grau de hidratação do terreno e os teores de macronutrientes (N, P, K), também podem influenciar a composição dos óleos voláteis. Entretanto, não se pode estabelecer um único padrão, pois, cada espécie reage de forma diferenciada (CASTRO et al., 2006).

Aproximadamente 3000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importantes especialmente para as indústrias farmacêuticas, agronômicas, alimentícias, sanitárias, cosméticas e de perfumaria, sendo conhecidos por suas propriedades antisépticas, bactericidas, virucidas, fungicidas, medicinais; são usados em conservantes de alimentos como agentes antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmo líticos e drogas anestésicas locais (SIMÕES et al., 2007).

### 2.5.1 Óleos essenciais em alimentos

A conservação de alimentos tornou-se problema complexo. Novos produtos são constantemente introduzidos no mercado, e exigem vida útil mais longa e maior garantia de segurança contra patógenos de origem alimentar (WILSON; DROBY, 2000). O uso excessivo de conservantes químicos, questionados em virtude de seu potencial carcinogênico, atributos teratogênicos e toxicidade residual têm levado ao aumento da pressão sobre os fabricantes de alimentos para substituição desses agentes por técnicas alternativas de preservação classificadas como “naturais”. Consequentemente, há interesse considerável na pesquisa da possibilidade do uso de produtos naturais tais como óleos essenciais, extratos de plantas comestíveis e ervas medicinais e especiarias (FRIEDMAN; HENIKA; MANDRELL, 2002).

Poucos conservantes contendo óleos essenciais estão comercialmente disponíveis. Dentre eles tem-se o “DMC Base Natural” produzido pela DOMCA S.A., (Alhendin, Granada, Spain) sendo composto por 50% de óleos essenciais de alecrim, salvia e citrus e 50% de glicerol (MENDOZA-YEPES et al., 1997). O “*Protecta One*” e “*Protecta Two*” são misturas de extratos de ervas produzidos por Bavária Corp. Apopka, FL, Estados Unidos, e são classificados como GRAS nesse país. Embora o conteúdo preciso não seja divulgado pelo fabricante, provavelmente contém um ou mais óleos essenciais dispersos em soluções de citrato de sódio e cloreto de sódio, respectivamente (CUTTER, 2000).

Vários componentes de óleos essenciais têm sido registrados pela Comissão Europeia para utilização como aromatizante em gêneros alimentícios. Os compostos registrados são caracterizados por não apresentarem qualquer risco à saúde do consumidor e incluem entre outros carvacrol, carvona, cinamaldeído, citrato, *p*-cimeno, eugenol, limoneno, mentol, e timol.

A tecnologia de “obstáculos ou barreiras” que envolvem técnicas de preservação múltiplas simultâneas é realizada com sucesso no controle de patógenos e na manutenção da qualidade dos alimentos durante o armazenamento (LEISTNER, 2000). Diversos sinergismos potenciais entre componentes de óleos essenciais e conservantes, ou métodos de conservação de alimentos têm sido sugeridos: baixo pH, baixa atividade de água, agentes quelantes, tensões de oxigênio reduzidas, tratamentos térmicos moderados e elevação de pressão.

Tassou, Drosinos e Nychas (1995), observaram o sinergismo entre NaCl e o óleo essencial de hortelã sobre *Salmonella Enteritidis* e *Listeria monocytogenes*. A ação sinérgica entre o óleo essencial de orégano e nitrito de sódio e seus efeitos sobre o crescimento e produção de toxinas de *C. botulinum* foram observados por Ismaiel e Pierson (1990). Timol e carvacrol apresentaram efeito sinérgico quando associados a elevadas pressões hidrostáticas (HHP) na redução das contagens de *Listeria monocytogenes* (KARATZAS et al., 2001). As atividades antibacterianas dos óleos essenciais de tomilho e orégano sobre *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus* foram mais pronunciadas em baixos níveis de oxigênio (PASTER et al., 1990). Skandamis e Nychas (2000) observaram que o óleo essencial de orégano retardou o crescimento microbiano e suprimiu as contagens de microrganismos deterioradores em carne picada estocada em embalagem com atmosfera modificada (MAP, 40% CO<sub>2</sub>, 30% N<sub>2</sub> e 30% de O<sub>2</sub>), quando em contraste, a inibição não foi pronunciada em amostras estocadas em atmosfera comum.

Para aplicação de óleos essenciais em alimentos o impacto sensorial deve ser considerado. Se elevadas concentrações são necessárias para atingir ação desejada, níveis inaceitáveis de sabor e aroma inapropriados podem ser percebidos (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008).

A utilização de óleos essenciais de plantas e condimentos no controle de microrganismos patogênicos e deterioradores de alimentos requer avaliação de sua eficácia em gêneros alimentícios ou modelos que simulem sua composição. De forma geral, a eficiência de muitos agentes antimicrobianos naturais pode ser reduzida por determinados componentes de alimentos (água, lipídios, carboidratos, proteínas) (GLASS; JOHNSON, 2004). Elevados níveis de proteínas e/ou lipídios em matrizes alimentares parecem proteger microrganismos da ação dos óleos essenciais (AURELI; COSTANTINI; ZOLEA, 1992).

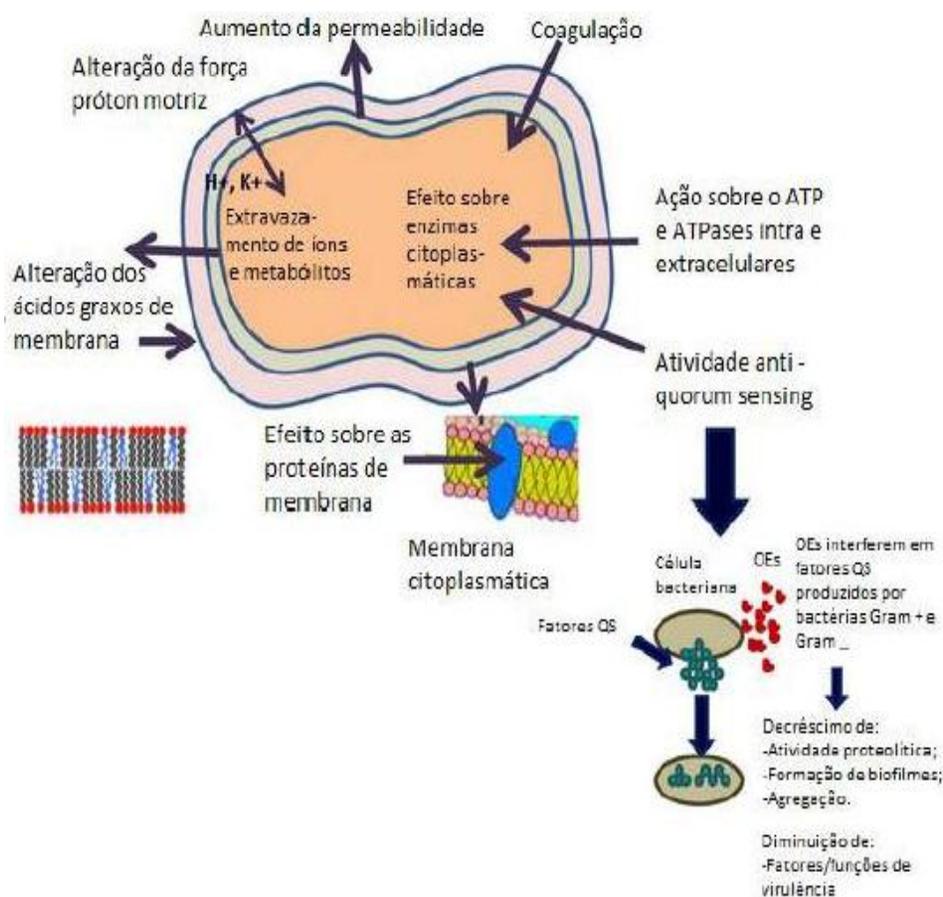
Além de suas características bactericidas os óleos essenciais também apresentam capacidade antioxidante. Nos últimos tempos tem aumentado a demanda dos consumidores por produtos naturais “livres de aditivos químicos”, levando a indústria de alimentos a considerar a incorporação de antioxidantes naturais em produtos diversos (BADI et al., 2004). Assim, há interesse crescente em pesquisas científicas e industriais por condimentos e ervas aromáticas, em virtude de suas fortes propriedades antioxidantes, propriedades relacionadas à presença de diversas substâncias como vitaminas, flavonoides, terpenoides, carotenoides, fitoestrógenos e minerais (CALLUCCI et al., 2003).

### **2.5.2 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais**

O estudo da atividade *in vitro* de óleos essenciais e seus constituintes sobre bactérias patogênicas e deteriorantes têm sido realizado por diversos autores (BASSOLE et al., 2003; BURT, 2004; DORMAN; DEANS, 2000; MARTINS, 2013; OLIVEIRA et al., 2011; OUSSALAH et al., 2007). Porém o mecanismo de ação dos óleos essenciais ainda não foram totalmente elucidados (LAMBERT et al., 2001), embora as propriedades antimicrobianas e seus componentes tenham sido pesquisados desde muito tempo (KOEDAM, 1977). Considerando o

grande número de diferentes grupos de compostos químicos presente nos óleos essenciais, é mais provável que sua atividade antibacteriana não seja atribuída a um mecanismo específico, mas sim a vários alvos na célula (Figura 3) (NAZZARO et al., 2013).

**Figura 3** Localidades e mecanismos de ação de componentes dos óleos essenciais em células bacterianas. Danos à membrana citoplasmática e proteínas de membrana; efluxo de constituintes intracelulares; coagulação do citoplasma e depleção da força próton motriz.



Fonte: Nazzaro et al. (2013) com modificações

Uma característica importante dos óleos essenciais é a sua hidrofobicidade, fato que permite a partição dos lipídeos da membrana citoplasmática bacteriana perturbando sua estrutura e sua função (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1994). Pode então ocorrer o vazamento de íons e do conteúdo celular (CARSON; MEE; RILEY, 2002; LAMBERT et al., 2001). Di Pasqua et al. (2007) em seu trabalho trataram cepas bacterianas de *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens* e *Brochothrix thermosphacta* com os componentes de óleos essenciais, timol, eugenol e carvacrol (compostos fenólicos), limoneno (terpeno) e cinamaldeído (aldeídos alifáticos), em concentração de antimicrobianos superior à concentração mínima inibitória (MIC), para verificar a ação desses compostos sobre o perfil de ácidos graxos da membrana das células.

Esses pesquisadores observaram que depois de apenas duas horas de exposição das células aos compostos, o percentual de ácidos graxos insaturados encontrados foi inferior aos ácidos graxos saturados. Esse resultado daria apoio ao mecanismo de ação dos compostos sobre a membrana lipídica provocando alterações estruturais na mesma. Em estudo anterior dos mesmos autores (DI PASQUA et al., 2006), a adaptação das células aos compostos, numa concentração inferior ao MIC, resultou em aumento sensível do percentual de ácidos graxos insaturados, que são bem conhecidos por dar alto grau de fluidez à membrana. Alto grau de ácidos graxos saturados na bicamada lipídica da membrana é relacionado com a diminuição da fluidez da membrana e consequente aumento de sua rigidez (BAYER et al., 2000).

A elevada atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre patógenos de origem alimentar provavelmente se dá devido às altas porcentagens de compostos fenólicos como carvacrol, eugenol e timol (COSENTINO et al., 1999; DORMAN; DEANS, 2000; LAMBERT et al., 2001). Parece que a

presença do grupo hidroxila, presente nesses compostos, está relacionada com a inativação das enzimas microbianas. Muito provavelmente, os compostos fenólicos interagem com a membrana celular, causando vazamento de componentes celulares, provocando a mudança em ácidos graxos e fosfolipídios, diminuindo o metabolismo energético e influenciando na síntese de material genético (CEYLAN; FUNG, 2004).

Estudos mostram que os compostos fenólicos agem na membrana citoplasmática, interrompendo a força próton motriz (FPM), o fluxo de elétrons, o transporte ativo e a coagulação do conteúdo das células (DAVIDSON; NAIDU, 2000).

Da mesma forma que os compostos fenólicos, o local de ação dos terpenos, outro componente dos óleos essenciais, é a membrana celular. Eles permeiam através da membrana fazendo com que ela inche, assim inibindo enzimas respiratórias e causando a dissipação parcial do gradiente de pH e de potencial elétrico. Cinamaldeído tem a maior atividade antifúngica entre os aldeídos alifáticos, o qual permeia a membrana citoplasmática alcançando o periplasma, mas não resulta na em sua desintegração como no caso de carvacrol e timol (CEYLAN; FUNG, 2004; HELANDER et al., 1998).

A maioria dos estudos que investigam a ação de óleos essenciais sobre microrganismos, sugerem que esses óleos são ligeiramente mais ativos contra bactérias *Gram*-positivas do que *Gram*-negativas (HARPAZ et al., 2003; PINTORE et al., 2002). Os organismos *Gram*-negativos são menos sensíveis à ação dos óleos essenciais, provavelmente, devido à presença da membrana externa que envolve a parede celular, e restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através da sua camada lipopolissacarídica (VAARA, 1992). Nevas et al. (2004) observaram em sua pesquisa que, dos 13 óleos essenciais testados contra 12 espécies de bactérias patogênicas e/ou deterioradoras, as bactérias *Gram*-positivas apresentaram-se mais sensíveis aos óleos, sendo que dentre as

*Gram*-positivas testadas *C. butulinum* tipos B e E e *Clostridium perfringens* se apresentaram mais sensíveis. Dentre as bactérias *Gram*-negativas *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* foram mais resistentes.

Porém, nem todos os estudos sobre óleos essenciais concluíram que *Gram*-positivos são mais suscetíveis. *Aeromonas hydrophila*, uma bactéria *Gram*-negativa, parece de fato ser uma das espécies mais sensíveis (WAN; WILCOCK; COVENTRY, 1998). Ouattara et al. (1997) observaram em seu estudo que, não houve diferença na susceptibilidade entre bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas após 24 horas de contato com os óleos essenciais, mas após 48 horas os microrganismos *Gram*-negativos apresentaram maior resistência do que os microrganismos *Gram*-positivos.

## **2.6 Matriz alimentar: mortadela**

Os produtos cárneos emulsionados, como as salsichas e as mortadelas, são bastante populares, sendo consumidos tanto em nível doméstico como no mercado de alimentação rápida, representando importante segmento da industrialização de carnes (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2006).

Entende-se por mortadela, o produto cárneo industrializado, obtido da emulsão das carnes de animais de açogue, acrescido ou não de toucinho, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, em diferentes formas, e submetido ao tratamento térmico adequado. De acordo com a composição da matéria-prima e das técnicas de fabricação, podem ser classificadas em Mortadela, Mortadela tipo Bologna, Mortadela tipo Italiana, Mortadela Bologna e Mortadela de ave (BRASIL, 2000).

A mortadela é um produto cárneo curado e esse processo contribui para formação de cor característica, textura, sabor e aroma específicos do produto, além de efeitos antioxidantes e bacteriostáticos (MARRIOT; LECHOWICH; PIRSON, 1981).

O processamento da mortadela compreende as etapas de pesagem e seleção de ingredientes e matérias-primas, moagem e cominuição das carnes, pré-mistura das matérias-primas e ingredientes, emulsificação, mistura de toucinho (se houver), embutimento, cozimento e defumação (se houver), resfriamento e embalagem. Um aspecto importante refere-se à emulsificação, a qual pode ser feita por dois princípios: emulsificação em *cutters* ou com emulsificadores, sendo que a seleção de qual processo a ser utilizado, dependerá do tipo de mortadela a ser produzida. Geralmente para produtos com menor qualidade utilizam-se os emulsificadores e para mortadelas de qualidade superior, utilizam-se os *cutters* (OLIVO, 2006).

Emulsão pode ser definida como sendo uma suspensão coloidal de dois líquidos imiscíveis, que se mantêm dispersos um no outro, pela ação de agente emulsificante interfacial dos alimentos que é a proteína. Quando a carne, gordura, água e sal são misturados e submetidos à alta velocidade de cominuição, uma massa homogênea é formada, com características de emulsão, visto que os três componentes básicos para formá-la estão presentes (água, gordura e proteína). A formação da emulsão consiste de duas transformações relacionadas: entumescimento das proteínas e formação da matriz viscosa, e emulsificação das proteínas solubilizadas com os glóbulos de gordura e água (HEDRICK et al., 1994). A proteína cárnea, especialmente a miofibrilar, por possuir uma porção hidrofóbica (apolar) e outra hidrofílica (polar) atua na interface entre a gordura e a água, permitindo a formação da emulsão.

Inicialmente, a mortadela era conceituada como produto barato e consumido por pessoas de baixa renda. Contudo, com o passar dos anos, a mortadela ganhou adeptos em todas as camadas sociais do Brasil, tornando-se um produto requintado, sendo conhecida pela cor rósea, sabor delicado, massa fina, aroma suave e como ingrediente de lanches. O preço acessível e as características próprias de condimentação são os principais fatores que elevaram a procura pela mortadela no território nacional (YUNES, 2010).

## REFERÊNCIAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 2nd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2004. 479 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos**: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. 2008. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Alimentos+Com+Alegacoes+de+Propriedade+s+Funcionais+e+ou+de+Saude/Alegacoes+de+propriedade+funcional+aprovadas>>. Acessado em: 11 nov. 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 19, de 30 de abril, 1999. Regulamento técnico para procedimentos de registro de alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 jan. 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012**. Regulamento técnico sobre informação nutricional complementar. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/630a98804d7065b981f1e1c116238c3b/Resolucao+RDC+n.+54\\_2012.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/630a98804d7065b981f1e1c116238c3b/Resolucao+RDC+n.+54_2012.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 22 jun. 2015.

AL-SHUIBI, A. M.; AL-ABDULLAH, B. M. Substitution of nitrite by sorbate and the effect on properties of mortadella. **Meat Science**, Barking, v. 62, n. 4, p. 473-478, 2002.

ASSIS, O. B. G.; LEONI, A. M. Filmes ... **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 30, p. 33-38, 2003.

AURELI, P.; COSTANTINI, A.; ZOLEA, S. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 5, p. 344-348, 1992.

BADI, H. N. et al. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 19, p. 231-236, 2004.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARBALHO, T. C. F. et al. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. **Food Control**, Guildford, v. 16, p. 211-216, 2005.

BARRETEAU, H.; DELATTRE, C.; MICHUD, P. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 3, p. 323, 2006.

BARROS, M. A. F. et al. *Listeria* spp. associated to different levels of autochthonous microbiota in meat, meat products and processing plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 603-609, 2007.

BASSOLE, I. H. N. et al. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**, New York, v. 62, n. 2, p. 209-212, 2003.

BAYER, A. S. et al. In vitro resistance of *Staphylococcus aureus* to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with alterations in cytoplasmic membrane fluidity. **Infection Immunity**, Washington, v. 68, p. 3548-3553, 2000.

BENKERROUM, N. et al. Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. **Microbiology**, New York, v. 98, p. 56, 2005.

BORCH, E.; ARINDER, P. Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. **Meat Science**, Barking, v. 62, p. 381-390, 2002.

BORDERÍAS, A. J.; ALONZO, I. S.; MATEOS, M. P. New applications of fibres in foods: addition to fishery products. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 16, p. 458, 2005.

BOSTAN, K.; ISINMAHAN, F. Microbiological quality and shelf-life of sausage treated with chitosan. **Journal of the Faculty of Veterinary Medicine**, Istanbul, v. 37, n. 2, p. 117-126, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Mortadela. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2000. Seção I, p. 6-10.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998. Aprova o regulamento técnico “atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 - carne e produtos cárneos”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 dez. 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Ofício circular nº 15/2009/ GAB/ DIPOA, de 8 de maio de 2009**. Uso de conservantes/aditivos em produtos cárneos: procedimentos de registro e fiscalização. Brasília, 2009.

BUENO, V. F. et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates of food and human origins from Brazil using molecular typing procedures and in vitro cell culture assays. **International Journal of Environmental Health Research**, Abingdon, v. 20, p. 43-59, 2010.

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

CAGRI-MEHMETOGLU, A. et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in two Kasar Cheese processing environments. **Food Control**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 762-766, May 2011.

CALLUCCI, L. et al. Effects of gamma-irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Aston, v. 51, n. 4, p. 927-934, 2003.

CAMMACK, R. et al. Review nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1411, n. 2/3, p. 475-488, 1999.

CARDOSO, M. G. et al. **Plantas aromáticas e condimentos**. Lavras: UFLA, 2005. 83 p.

CARRIQUE-MAS, J. J. et al. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese: an outbreak of listeriosis? **Epidemiology and Infection**, New York, v. 130, n. 1, p. 79-86, Feb. 2003.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-Kill, lysis, leakage and tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CASTRO, D. P. et al. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 27-32, 2006.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp. coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 281, 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food: foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. Sites, 2006–2013. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 63, n. 1, p. 328-332, 2014.

CEYLAN, E.; FUNG, D. Y. C. Antimicrobial activity of spices. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, Trumbull, v. 12, n. 1, p. 1-55, 2004.

CHANDY, T.; SHARMA, C. P. Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicilin. **Biomaterial**, Surrey, v. 12, n. 12, p. 65-70, 1993.

CHEN, R. H.; HWA, H. D. Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on thermal, mechanical and permeability properties of the prepared membrane. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 29, p. 353-358, 1996.

COSENTINO, S. et al. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, p. 130-135, 1999.

COSTA SILVA, H. S. R.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 776, 2006.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C. “**Quitosana**: a fibra do futuro”. Fortaleza: Parque de Desenvolvimento Tecnológico, 1999.

CUTTER, C. N. Antimicrobial effect of herb extracts against Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes, and Salmonella typhimurium associated with beef. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 5, p. 601-607, May 2000.

DALTON, C. B. et al. An outbreak of gastroenteritis and fever due to Listeria monocytogenes in milk. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 336, n. 2, p. 100-105, Jan. 1997.

DAMIAN, C. et al. Avaliação físico-química e da textura (instrumental e sensorial) de salsichas elaboradas com diferentes níveis de quitosana - poli-( $\alpha$ -1'4)n-acetil-d-glucosamina. **Acta Científica Venezuelana**, Florianópolis, v. 56, n. 1, p. 16-23, 2005.

DAVIDSON, P. M.; NAIDU, A. S. Phyto-phenols. In: NAIDU, A. S. (Ed.). **Natural food antimicrobial systems**. Boca Raton: CRC, 2000. p. 265-294.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, 273-285, 2004.

DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, p. 2745-2749, 2006.

DI PASQUA, R. et al. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 12, p. 4863-4870, 2007.

DONELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*. In: HUI, Y. H.; PIERSON, M. D.; GORHAM, J. R. (Ed.). **Foodborne disease handbook**. 2nd ed. New York: M. Dekker, 2001. v. 1, p. 213-246.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DUTRA, M. P. et al. Efeito da radiação gama na cor objetiva de mortadelas elaboradas com diferentes concentrações de nitrito. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 5., 2009, São Paulo. **Anais...** Campinas: ITAL/CTC, 2009. 1 CD ROM.

DYKES, G. A Influence of the adaptation of *Listeria monocytogenes* populations to structured or homogeneous habitats on subsequent growth on chilled processed meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, p. 301-306, 2003.

ELLEUCH, M. et al. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: characterization, technological functionality and commercial applications: a review. **Food Chemistry**, London, v. 124, p. 411-421, 2011.

FARBER, M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FEINER, G. **Meat products handbook practical science and technology**. Boca Raton: CRC, 2006. 627 p.

FRANCIS, F. J. **Encyclopedia of food science and technology**. New York: J. Wiley, 2000.

FRANCO, L. O. et al. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Analytica**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 14, p. 40-44, 2005.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, p. 1545-1560, 2002.

GAHAN, C. G. M.; HILL, C. A review: gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 98, n. 6, p. 1345-1353, June 2005.

GARCÍA, M. et al. Partial substitution of nitrite by chitosan and the effect on the quality properties of pork sausages. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 481-487, Apr./June 2011

GERASIMENKO, D. V. et al. Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 40, n. 3, p. 253-257, 2004.

GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. **Higiene e vigilância sanitária dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2001.

GLASS, K. A.; JOHNSON, E. A. Antagonistic effect of fat on the antibotulinal activity of food preservatives and fatty acids. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 675-682, 2004.

GLÓRIA, M. B. A.; BARBOUR, J. F.; SCALAN, R. A. Volatile nitrosamines in fried bacon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, p.1816-1818, 1997.

GÖKMEN, M.; GÜRBÜZ, U. Use of Chitosan in Turkish Sausage (Sucuk) production and effects on quality. **The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine**, Kafkas, v. 17, p. 67-71, 2011.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 97, 2008.

HAO, M.; BETA, T. Development of Chinese steamed bread enriched in bioactive compounds from barley hull and flaxseed hull extracts. **Food Chemistry**, London, v. 133, p. 1320-1325, 2012.

HARPAZ, S. et al. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Lateolabrax niloticus*). **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 3, p. 410-417, 2003.

HEDRICK, H. B. et al. **Principles of meat science**. 3rd ed. Dubuque: Kendall/Hunt, 1994. 354 p.

HELANDER, I. M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 3590-3595, 1998.

ISMAIEL, A. A.; PIERSON, M. D. Effect of sodium nitrite and oregano oil on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in TYG broth and ground pork. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 11, p. 958-960, 1990.

JAFARI, M.; EMAM-DJOMEH, Z. Reducing nitrite content in hot dogs by hurdle technology. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 12, p. 1488-1493, 2007.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 524 p.

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

JING, L. et. Survival of *Listeria monocytogenes* in simulated gastrointestinal system and transcriptional profiling of stress and adhesion-related genes. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 7, n. 3, p. 267-274, 2010.

JUNEJA, V. K. et al. Chitosan protects cooked ground beef and turkey against *Clostridium perfringens* spores during chilling. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 6, p. 236-240, 2006.

KAMIL, J. Y. V. A.; JEON, Y. J.; SHAHIDI, F. Antioxidative activity of different viscosity chitosans in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea haerengus*). **Food Chemistry**, London, v. 79, p. 69-77, 2002.

KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. **Food Chemistry**, London, v. 107, p. 845-852, 2008.

KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Effect of irradiated chitosan on the rancidity of radiation-processed lamb meat. **International Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 39, n. 9, p. 997-1003, 2004.

KARATZAS, A. K. et al. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 3, p. 463-469, 2001.

KARL-OTTO, H. The use and control of nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, Barking, v. 78, n. 1/2, p. 68-76, 2008.

KASNOWSKI, M. C. **Listeria ssp., Escherichia coli**: isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída. 2004. 111 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

KENDALL, C. W. C.; ESFAHANI, A.; JENKINS, D. J. A. The link between dietary fibre and human health. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 24, p. 42-48, 2010.

KOEDAM, A. **Antimikrobielle wirksamkeit ätherischer öle**: eine literaturarbeit 1960-1976 - fortsetzung und schluss. Riechstoffe: Aromen, Kosmetika, 1977. p. 36-41.

KRAMARENKO, T. et al. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. **Food Control**, Guildford, v. 30, n. 1, p. 24-29, 2013.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal Food Microbiology**, Oxford, v. 55, n. 1/3, p. 181-186, 2000.

LI, Q. et al. Applications and properties of Chitosan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, Lancaster, v. 7, p. 370-397, Oct. 1992.

LIU, N. et al. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of Escherichia coli. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 64, p. 60-65, 2006.

MANN, J. I.; CUMMINGS, J. H. Possible implications for health of the different definitions of dietary fibre. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, Milano, v. 19, p. 226-229, 2009.

MARRIOT, N. G.; LECHOWICH, R. V.; PIRSON, M. D. Use of nitrite and nitrite-sparing agents in meats: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 44, n. 11, p. 881-885, 1981.

MARTIN, B. et al. Diversity and distribution of Listeria monocytogenes in meat processing plants Belen. **Food Microbiology**, London, v. 44, p. 119-127, 2014.

MARTIN, B. et al. Quantification of Listeria monocytogenes in fermented sausages by MPN-PCR method Appl. **Microbiology**, Seoul, v. 39, n. 3, p. 290, 2004.

MARTINS, A. P. **Atividade de antimicrobianos naturais sobre endósporos de clostridium perfringens em mortadelas**. 2013. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

MEAD, P. S. et al. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 134, p. 744-751, 2006.

MEHTA, N. et al. Novel trends in development of dietary fiber rich meat products - a critical review. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 52, n. 2, p. 633-647, 2015.

MELLO, K. G. P. C. et al. Synthesis and physicochemical characterization of chemically modified chitosan by succinic anhydride. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, p. 665-668, 2006.

MENDOZA-YEPES, M. J. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 17, n. 1, p. 47-55, 1997.

MENEZES, E. W. et al. Codex dietary fibre definition: justification for inclusion of carbohydrates from 3 to 9 degrees of polymerization. **Food Chemistry**, London, v. 140, p. 581-585, 2013.

MONTVILLE, T. J.; MATTHEWS, K. R.; KNIEL, K. E. **Food microbiology: an introduction**. 3th ed. New York: ASM, 2012.

MORAES, F. P.; COLLA, L. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MORETRO, T.; LSNGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. **Biofilms**, Cambridge, v. 1, p. 107-121, 2004.

MUDGIL, D.; BARAK, S. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 61, p. 1-6, 2013.

MUZZARELLI, R. A. A.; ROCCHETTI, R. The determination of the degree of acetylation of chitosan by spectrophotometry. In: MUZZARELLI, R.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G. W. (Ed.). **Chitin in nature and technology**. New York: Plenum, 1986.

NAZZARO, F. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Amsterdam, v. 6, p. 1451-1474, 2013.

NEVAS, M. et al. Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic bacteria. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 1 p. 199-202, 2004.

OLESEN, I.; VOGENSEN, F. K.; JESPERSEN, L. Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stress. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 6, p. 669-680, 2009.

OLIVEIRA, M. M. M. **Óleos essenciais no controle de biofilmes bacterianos: *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* enteropatogênica.** 2011. 138 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

OLIVEIRA, T. L. C. et al. Antimicrobial activity of Satureja Montana L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 3, p. 546-555, 2011.

OLIVO, R. **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango.** Criciúma: Do Autor, 2006. 680 p.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Emulsões cárneas. In: SHIMOKOMAKI, M. et al. (Ed.). **Atualidades em ciência e tecnologia de carnes.** São Paulo: Varela, 2006. cap. 9.

OUATTARA, B. et al. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 37, p. 155-162, 1997.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, p. 414-420, 2007.

PASTER, N. et al. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils moulds and foodborne bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 33-37, July 1990.

PETER, M. G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. **Pure and applied chemistry**, Oxford, v. 32, p. 629-640, 1995.

PINTORE, G. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavour and Fragrance Journal**, Sassari, v. 17, n. 1, p. 15-19, 2002.

PURNAMA, D.; MASATOSHI, I. Effect of chitosan in meat preservation. **Meat Science**, Barking, v. 38, n. 2, p. 243-254, 1994.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologia**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. p. 69-72.

RANTSIOU, K. et al. Understanding the behavior of foodborne pathogens in the chain: New information for risk assessment analysis. **Trends in Food Science e Technology**, Cambridge, v. 22, p. 21-29, 2011.

ROCOURT, J. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. (Ed.). **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: M. Dekker, 1999. p. 1-20.

SAKATE, R. I. et al. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 53, n.2, p. 184-187, 2003.

SALAMINA, G. et al. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 117, n. 3, p. 429-436, Dec. 1996.

SALGADO, A. P. S. **Efeito da luz na planta e no óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)**. 2005. 49 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

SANTOS, R. E. V. **Avaliação física, química e microbiológica e nutricional de mortadelas formuladas com misturas de sangue suíno e concentrado protéico de soro de leite**. 2007. 113 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

SCHLECH, W. F. *Listeria* gastroenteritis: old syndrome, new pathogen. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 336, n. 2, p. 130-132, Jan. 1997.

SEABRA, L. M. J. et al. Fécula de mandioca e farinha de aveia como substitutos de gordura na formulação de hambúrguer de carne ovina. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 245-248, 2002.

SIKKEMA, J. J.; DE BONT, A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, p. 8022-8028, 1994.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC, 2007. 1102 p.

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. E. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, p. 1646-1653, Apr. 2000.

TASSOU, C.; DROSINOS, E. H.; NYCHAS, G. J. E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 °C and 10 °C. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 78, p. 593–600, 1995.

TOLDRÁ, F. **Handbook of meat processing**. Boston: Editorial Office, 2010. 584 p.

TRICKER, A. R.; PREUSSMANN, R. Carcinogenic N-nitrosamines in diet: occurrence, formation, mechanism and carcinogenic potential. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, Amsterdam, v. 259, p. 277- 289, 1991.

TSAI, G. J.; HWANG, S. P. In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 70, p. 675-681, 2004.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 56, p. 395-411, 1992.

WALTERS, C. L. Reactions of nitrate and nitrite in foods with special reference to the determination of N-nitroso compounds. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 9, n. 5, p. 441-447, 1992.

WALZEM, R. L. Functional foods. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 15, p. 518, 2004.

WAN, J.; WILCOCK, A.; COVENTRY, M. J. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, p. 152-158, 1998.

WILSON, C. L.; DROBY, S. **Food microbial contamination**. Boca Raton: CRC, 2000. 290 p.

YADAV, A. V.; BHISE, S. B. Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. **Current Science**, Bangalore, v. 87, n. 9, p. 1176-1178, Nov. 2004.

YUNES, J. F. F. **Avaliação dos efeitos da adição de óleos vegetais como substitutos de gordura animal em mortadela**. 2010. 103 f. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**

**ARTIGO 1**

**INIBIÇÃO DE *Listeria monocytogenes* POR QUITOSANA ADICIONADA  
EM MORTADELA INTEIRA E FATIADA**

Artigo redigido conforme a norma da revista Food Research International  
“Versão Preliminar”

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a concentração mínima bactericida da quitosana sobre a *Listeria monocytogenes in vitro*, bem como, a inibição deste microrganismo *in situ* e a caracterização físico-química de mortadelas acrescidas de diferentes concentrações de quitosana durante o período de armazenamento sob refrigeração. As mortadelas, fatiadas e inteiras, foram elaboradas com 0; 1; 2 e 3% de quitosana, embaladas a vácuo e armazenadas a 4°C por 30 dias. Ao longo do armazenamento foram avaliados pH, potencial de oxi-redução (Eh), atividade de água, nitrito residual, grau de oxidação e enumeração de *Listeria monocytogenes*, onde esta última foi avaliada em mortadelas inteiras e fatiadas. A concentração mínima bactericida *in vitro* para a *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 foi de 1% de quitosana (densidade de 0,30 g/mL, grau de desacetilação >85,0%). Não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os parâmetros de atividade de água (Aw) e potencial de oxi-redução (Eh) ao longo do período de armazenamento (30 dias). Os valores de Aw variaram de 0,925 a 0,955, valores favoráveis ao crescimento de diversos microrganismos, inclusive da *Listeria monocytogenes*, uma vez que, esta cresce a Aw superior a 0,90. O Eh observado em todas as amostras analisadas foi positivo. Para o pH houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) ao longo dos 30 dias de armazenamento para o controle e para as mortadelas contendo maiores concentrações de quitosana. O nitrito residual apresentou diferença significativa ( $p<0,05$ ) para todas as amostras em estudo. Sendo verificada queda da concentração deste para todos os tratamentos, onde para o Q2 e o Q3 a queda apresentou-se menor que as demais. Quanto à oxidação lipídica, índice de TBARs, todos os tratamentos foram afetados significativamente ( $p<0,05$ ) ao longo do armazenamento. O controle iniciou com menor média e ao longo dos 30 dias avaliados houve aumento expressivo do índice de oxidação. Para as demais amostras observou-se que no tempo 0 todas as amostras contendo quitosana apresentaram valores maiores que o controle, porém ao longo do tempo ocorreu redução destes valores, para cerca de 0,6 mg de malonaldeído.Kg-1, demonstrando possível efeito antioxidante da quitosana nestes produtos. Os valores das quatro amostras para contagem de *Listeria monocytogenes* tanto na mortadela inteira como na mortadela fatiada foram significativamente diferentes ( $p<0,05$ ), onde, as amostras controle apresentaram maiores contagens, cerca de  $10^{10}$  UFC/g, para ambos os tipos de mortadelas em estudo, ao final do período de armazenamento. As maiores reduções foram observadas para as amostras contendo maiores concentrações de quitosana, 2 e 3%, constatando-se uma redução de 3 ciclos logarítmicos, nas mortadelas inteiras. Tal fato demonstra uma possível atividade antimicrobiana efetiva da quitosana contra o microrganismo alvo na mortadela inteira. Quando comparadas às contagens da *Listeria monocytogenes* na mortadela inteira e

fatiada, torna-se nítida a maior eficiência na redução do microrganismo quando a quitosana encontrava-se junto à massa cárnea. Contudo, os resultados do presente trabalho permitem concluir que existe viabilidade tecnológica e atividade antimicrobiana, em relação a um patógeno de grande interesse na indústria cárnea, na adição de quitosana em produtos cárneos, conseguindo obter, ainda, um produto fontes de fibras.

**Palavras-chave:** atividade antimicrobiana, fibra alimentar solúvel e patógeno alimentar.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the minimum bactericidal concentration of chitosan on *Listeria monocytogenes* in vitro, as well as the inhibition in situ of this microorganism and physicochemical characterization of mortadella added with different concentrations of chitosan during refrigerated storage. The mortadella, sliced and whole, were prepared with 0; 1; 2; 3% chitosan, vacuum packed and stored at 4 °C for 30 days. During storage were evaluated pH, oxidation-reduction potential (Eh), water activity, residual nitrite, oxidation degree and enumeration of *Listeria monocytogenes*, where the latter was assessed in whole and sliced mortadella. The minimum bactericidal concentration in vitro for *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 was 1% chitosan (density 0.30 g / ml, degree of deacetylation > 85.0%). There was no significant difference ( $p > 0.05$ ) between the water activity parameters ( $A_w$ ) and oxidation-reduction potential (Eh) during the storage period (30 days). The  $A_w$  values ranged from 0.925 to 0.955, favorable values to the growth of many microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, since this grows at an  $A_w$  greater than 0.90. The Eh observed in all samples were positive. There was no significant difference ( $p < 0.05$ ) for the pH throughout the 30 days storage for control and for mortadella containing higher concentrations of chitosan. The residual nitrite showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) for all analyzed samples. It was verified a decrease in the concentration of residual nitrite for all treatments, where Q2 and Q3 had a lower decrease than the others. As for the lipid oxidation, TBARS values, all treatments were significantly affected ( $P < 0.05$ ) during storage. The control started with lower average and throughout the 30 days there was significant increase in the oxidation rate. For the remaining samples it was observed that at time 0 all samples containing chitosan showed higher values than the control, but over time there was a reduction of these values to about 0.6 mg malondialdehyde.Kg-1, demonstrating possible chitosan antioxidant effect in these products. The values of the four samples for counting of *Listeria monocytogenes* in both whole and sliced mortadella were significantly different ( $p < 0.05$ ), in which the control samples showed higher values, approximately 1010 CFU / g, for both types of studied mortadella at the end of the storage period. The greatest reductions were observed for samples containing higher concentrations of chitosan, 2 and 3%, confirming a reduction of three logarithmic cycles in the whole mortadella. This shows one possible effective antimicrobial activity of chitosan against the target organism in the whole mortadella. When comparing the number of *Listeria monocytogenes* in whole and sliced mortadella, there is a greater efficiency in reducing the microorganism when the chitosan was found in the meat mass. However, the present results allow us to conclude that there is technological feasibility and antimicrobial activity against a pathogen of great interest in the meat industry, in the addition of chitosan in meat products, obtaining also a fiber source product.

**Keywords:** antimicrobial activity, soluble dietary fiber and food pathogen.

## 1 INTRODUÇÃO

A manifestação de *Listeria monocytogenes* como patógeno alimentar data de 1980 com a ocorrência de diversos surtos e casos esporádicos de listeriose ligados ao consumo de alimentos contaminados e tem provocado inúmeras discussões em todo o mundo, o que por sua vez, tem estimulado pesquisadores a buscar respostas para as várias questões que têm surgido sobre a relação entre *Listeria ssp.* e listeriose (Silva et al., 1998).

Neste contexto é extremamente preocupante a presença desta bactéria patogênica para as indústrias de processamento de carnes, pois muitos surtos de listeriose têm sido correlacionados ao consumo de produtos cárneos, onde muitas amostras de *Listeria monocytogenes* já foram isoladas (Martin et al., 2014).

A causa da grande incidência de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos se deve, principalmente, em decorrência de sua característica psicrotrófica, resistência a alguns agentes antimicrobianos utilizados na indústria de alimentos e a sua capacidade de formação de biofilmes microbianos na planta de processamento (Beresford et al., 2001).

Com isso, novas estratégias de conservação de alimentos estão em constante desenvolvimento. Sendo assim, surge a quitosana, que devido à sua propriedade antimicrobiana comprovada vem sendo sugerida como uma opção a esta emergente necessidade neste segmento (Harish; Tharanathan, 2007).

Quitosana é composta de vários derivados provenientes da N-desacetilação da quitina, sendo um polímero linear, natural, insolúvel, que apresenta  $\beta$ -1,4 N- acetilglucosamina como unidade monomérica e, com exceção da celulose, é o polissacarídeo mais abundante e largamente distribuído na natureza, servindo como elemento estrutural, e encontrado especialmente em animais invertebrados e na parede celular de fungos (Franco et al., 2005). Esta fibra alimentar apresenta propriedades tecnológicas e fisiológicas úteis em

alimentos. A falta de toxicidade e alergenicidade, sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade a faz uma substância muito atraente para diversas aplicações no processamento de alimentos (Bostan; Isinmahan, 2011).

Por razões de saúde pública, os processos de preservação de alimentos são determinados primeiramente pelo controle do desenvolvimento microbiano. Contudo, outros fatores devem ser controlados, tais como: a ocorrência de reações químicas e enzimáticas que comprometem a qualidade sensorial do produto. Diversos estudos têm reportado a habilidade antioxidante da quitosana, tendo sido avaliado seu uso em carnes e derivados e frutos do mar que contém quantidades significativas de ácidos graxos insaturados, particularmente susceptíveis à oxidação lipídica durante seu processamento e armazenamento (Kanatt et al., 2002; Park; Kim, 2010).

Frente às características tecnológicas da quitosana observa-se um alto potencial da sua incorporação em mortadelas, onde estas características irão de encontro aos interesses científicos, dos consumidores e das indústrias alimentícias.

A mortadela é um produto cárneo emulsionado, embutido e curado que é consumido por todas as classes sociais. É fonte de proteínas, porém não possui fibras alimentares, característica passível de mudança pela incorporação da quitosana. Além da procura por alimentos com segurança alimentar, observa-se também o crescente interesse dos consumidores em produtos práticos para o preparo, exemplo disso, o aumento dos produtos cárneos já fatiados (Bressan et al. 2007). Entretanto, a manipulação dos embutidos cárneos para sua obtenção na forma fatiada pode levar à contaminação microbiológica do produto, o que provoca redução de sua vida útil e potenciais riscos à saúde pública, devido à contaminação por microrganismos patogênicos.

Diante disso, o presente estudo objetivou avaliar a inibição de *Listeria monocytogenes* e caracterização físico-químicas de mortadelas acrescidas de diferentes concentrações de quitosana durante o período de armazenamento sob refrigeração.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Microbiologia de Alimentos e de Tecnologia de Carnes e Derivados do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A carne de acém bovino e o toucinho utilizados na formulação foram adquiridos em comércio de Lavras, MG. A quitosana (densidade de 0,30 g/mL, grau de desacetilação >85,0%) foi adquirida da empresa Polymar (Fortaleza, CE). A bactéria, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, foi cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

### 2.1 Padronização, estocagem e preparo dos inóculos das células vegetativas

A reativação da cepa foi realizada inoculando-se 10 mL de cada cultura em tubos contendo 10 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) HIMEDIA® acrescido de 0,6% de extrato de levedura HIMEDIA® e incubados a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, o procedimento anterior foi repetido, para uma segunda ativação das células. A cada nova reativação da cultura, sua pureza era verificada por meio de crescimento em meio seletivo e diferencial Oxford e Palcam, coloração de Gram e testes bioquímicos, como: fermentação de carboidratos, motilidade, catalase, verificação de hemólise segundo recomendações do Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods da AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (Labbe, 2001).

A padronização foi realizada por meio da elaboração de curva de crescimento; o desenvolvimento do microrganismo, em meio de cultivo caldo BHI (Brain Heart Infusion) HIMEDIA® acrescido de 0,6% de extrato de levedura HIMEDIA®, foi monitorado por espectrometria através da evolução da densidade

ótica a 600nm e contagem direta em placas contendo Ágar BHI HIMEDIA® acrescido de 0,6% de extrato de levedura HIMEDIA®. Sendo padronizado para a execução de todo o experimento tanto *in vitro* quanto no produto cárneo uma população de  $10^5$  UFC/mL ou grama de *Listeria monocytogenes*.

## **2.2 Concentração mínima bactericida (CMB) da quitosana sobre a *Listeria monocytogenes in vitro***

A quitosana foi incorporada ao meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) HIMEDIA® acrescido de 0,6% de extrato de levedura HIMEDIA® em diferentes concentrações para avaliação da concentração mínima bactericida da quitosana contra a *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, onde esta bactéria era inoculada na população de  $10^5$  UFC/mL. Sendo as concentrações utilizadas variando de 0 a 3%, com intervalos de 0,5 a 0,5%. A concentração mínima bactericida foi definida como a menor concentração necessária para prevenir completamente o crescimento bacteriano visível. Placas de controle sem quitosana foram utilizadas para o controle. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas.

## **2.3 Elaboração das mortadelas**

A elaboração das mortadelas foi baseada na formulação descrita por Dutra (2009), sendo adicionados diferentes níveis de quitosana em substituição à massa cárnea: 0% (Q0); 1% (Q1); 2% (Q2); e 3% (Q3). A massa cárnea das mortadelas foi formulada com 58% de acém bovino e 14% de toucinho suíno. Os demais ingredientes da formulação foram: água (20%); fécula de mandioca (5%); sal (2%); polifosfato de sódio (0,5%; Fosmax E-10, New Max Industrial Ltda); nitrito de sódio (150 ppm, Maxsoy Alimentos Ltda); e ácido ascórbico

(0,5%; Fixamax C-202; New Max Industrial Ltda). Os ingredientes foram processados em cutter KJ-10 (Indústrias Jamar Ltda.; Tupã, SP, Brasil) e a massa embutida (gomos de  $\pm$  400g) em tripa artificial de poliamida (STARTRIP® Z-R, SCHUR Equipamentos e Embalagens; Barueri, SP, Brasil) de 67 mm diâmetro. Os gomos foram cozidos por imersão em água até temperatura interna de 73°C (acompanhada pela inserção de um termopar no centro da massa), quando as mortadelas foram removidas, resfriadas e estocadas em câmara fria (4°C) por 24 horas.

#### **2.4 Preparo das amostras**

Para cada tratamento foi fabricado 1,0 Kg de mortadela, sendo 500 gramas destinadas às análises microbiológicas e 500 gramas destinadas às análises físico-químicas. As análises foram realizadas nos tempos: 0, após 24 do processamento, 10, 20 e 30 dias de armazenamento.

Para a verificação da inibição de *Listeria monocytogenes* por quitosana adicionada em mortadelas, estas foram estudadas na sua forma inteira e na sua forma fatiada. As mortadelas foram fatiadas (aproximadamente 4 mm de espessura) em um cortador de frios (modelo USM2 200; Urano; Canoá, RS, Brasil). As amostras destinadas as análises microbiológicas foram inoculadas com *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 na concentração final de  $10^5$  UFC/g, logo após a etapa de cozimento da mortadela. Nas mortadelas inteiras o microrganismo foi inoculado e homogeneizado com o produto. Já para as mortadelas fatiadas a inoculação foi realizada na parte superior das fatias, com auxílio da alça de Drigalski.

As mortadelas foram incubadas a 7 °C por um período de 30 dias.

## 2.5 Caracterização das mortadelas

As mortadelas foram analisadas quanto ao pH, potencial de oxi-redução (Eh), atividade de água, nitrito residual e grau de oxidação. Uma porção da mortadela foi homogeneizada (tritador Turratec Te102; TECNAL Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, SP, Brasil) em 10 porções de água destilada e o pH e o potencial de oxi-redução imediatamente medidos por um eletrodo combinado de bulbo vidro acoplado a um pHmetro DM 20 (Digimed, São Paulo, Brasil). A atividade de água das amostras trituradas foi determinada em aparelho Aqualab CX2 (Decagon Devices Inc., WA, USA). O teor residual de nitrito nos produtos elaborados foi quantificado segundo método oficial no. 973.31 da Association of Official Analytical Chemists - AOAC (2002). O grau de oxidação lipídica foi determinado usando o teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBAR), segundo metodologia descrita por Raharjo et al. (1992). A concentração do malonaldeído (MDA) foi determinada por curva analítica de 1.1,3.3-tetraethoxypropane (TEP) e os resultados de TBARS expressos como mg MDA.kg<sup>-1</sup> de amostra.

## 2.6 Enumeração de *Listeria monocytogenes* nas mortadelas inteiras e fatiadas

Para enumeração de *Listeria monocytogenes* foi utilizada a metodologia tradicional da FDA (Food and Drug Administration), descrita por HITCHINS (2003), com pequenas modificações, tanto para as mortadelas inteiras quanto para as mortadelas fatiadas. As embalagens das mortadelas foram abertas de forma asséptica, 25g das amostras foram homogeneizadas em 225mL água peptonada 0,1% m/v em homogeneizador Stomacher Metroterm® (490 golpes/min) por três minutos. Após diluições seriadas decimais em água peptonada 0,1%, alíquotas de

100µL foram semeadas por superfície em Ágar Oxford. As análises foram realizadas em triplicata e as placas foram incubadas a 37°C/24h.

## **2.7 Análises estatísticas**

A análise estatística foi conduzida em regressão 4 (tratamentos) x 4 (tempos) para avaliação da caracterização das mortadelas, bem como, para enumeração de *Listeria monocytogenes*. As três repetições foram constituídas por diferentes bateladas de produção de mortadelas. Os dados foram testados pela análise de variância (ANOVA) e, quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando um nível de significância de 5%, também realizado para a caracterização das mortadelas. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o pacote estatístico SAS, versão 9.2 (Statistical Analysis System - SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), licenciado para a UFPA.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Concentração mínima bactericida (CMB) da quitosana sobre a *Listeria monocytogenes in vitro*

A concentração mínima bactericida para a *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 foi de 1% de quitosana (densidade de 0,30 g/mL, grau de desacetilação >85,0%). Resultados diferentes foram reportados por Bento et al. (2009), onde o efeito de diferentes concentrações de quitosana de *Mucor rouxii* UCP 064 foram testadas para CMB sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, onde foi reportado uma CMB de 0,5%, tal dado pode ter se apresentado diferente devido à metodologia utilizada, uma vez que, estes autores utilizaram a diluição da quitosana em ácido acético a 1%. Em nosso trabalho, a intenção foi eliminar os ácidos fracos, a fim da eliminação de possíveis interferentes nos resultados.

Rhoades; Roller (2000) destacam que mesmo os valores de concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida da quitosana sendo considerados elevados em comparação com outros compostos antimicrobianos (por exemplo, óleos essenciais, compostos fenólicos, bacteriocinas), amplo espectro de atividade antimicrobiana e baixa toxicidade para as células de mamíferos torna um composto antimicrobiano promissor para ser aplicada em alimentos.

#### 3.2 Caracterização das mortadelas

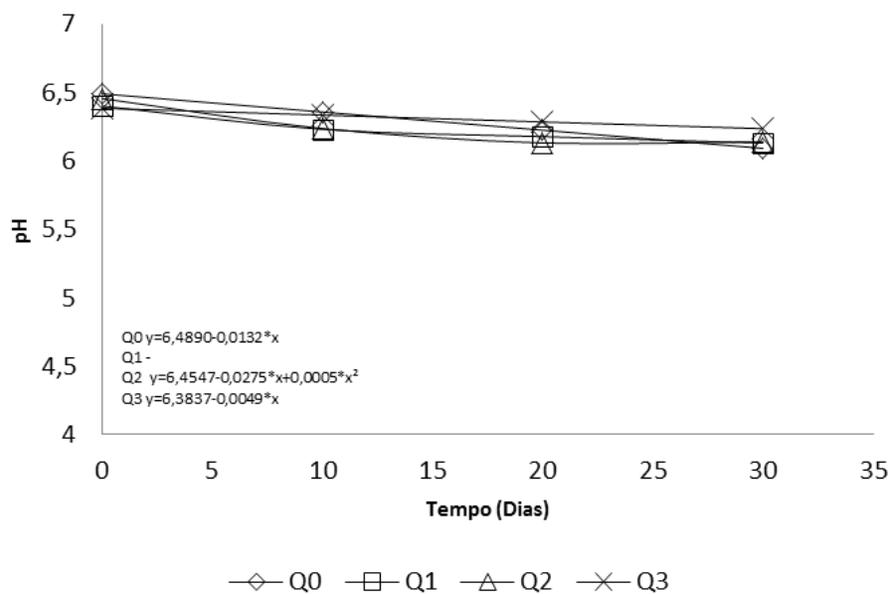
Não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os parâmetros de atividade de água ( $A_w$ ) e potencial de oxi-redução ( $E_h$ ) no tempo de armazenamento (30 dias).

Os valores de  $A_w$  variaram de 0,925 a 0,955, valores favoráveis ao crescimento de diversos microrganismos, inclusive da *Listeria monocytogenes*,

uma vez que esta cresce a  $A_w$  superior a 0,90. Quanto ao Eh foi demonstrado que, possivelmente, as diferentes concentrações de quitosana adicionadas às mortadelas não modificaram a capacidade de oxidação ou redução dos produtos ao longo do tempo de armazenamento. O Eh observado em todas as amostras analisadas foi positivo, onde o controle apresentou maiores valores. Quanto mais oxidada está uma substância, mais positivo é seu potencial elétrico, e microrganismos aeróbios necessitam de valores oxidantes de Eh para crescer (Jay, 2005).

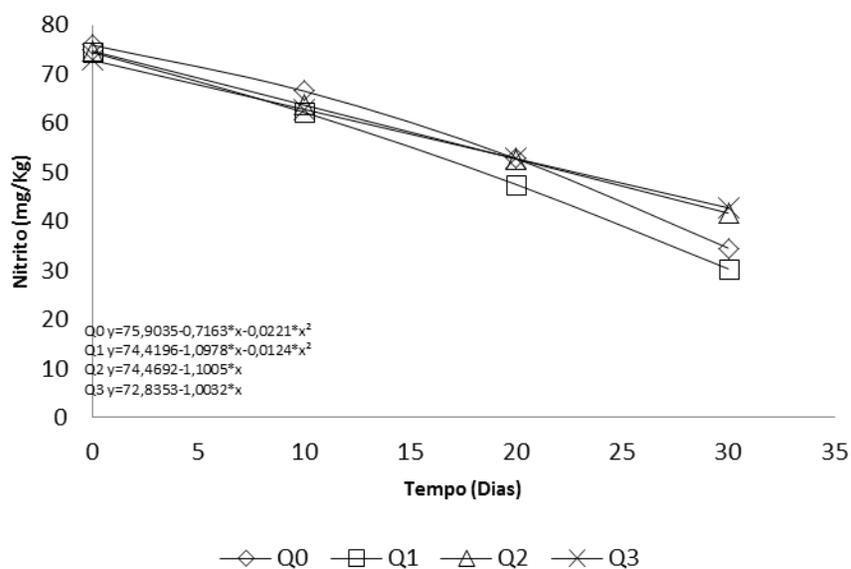
Para o pH houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao longo dos 30 dias de armazenamento para o controle e para Q2 e Q3 (Figura 1). A concentração hidrogeniônica que determina o pH dos alimentos é fator de importância fundamental na limitação dos tipos de microrganismos capazes de se desenvolver no alimento, exercendo influência sobre o crescimento, a sobrevivência ou a destruição desses microrganismos (Silva, 2000). Neste trabalho o pH das mortadelas, ao longo do tempo, encontraram-se na faixa de 5.96 a 6.69, portanto as mortadelas em estudo podem ser consideradas como alimentos de baixa acidez ( $\text{pH} > 4,5$ ). Este pH é propício ao crescimento da grande maioria dos microrganismos patogênicos. Portanto, é importante ressaltar a importância da tecnologia de barreiras e o controle da temperatura de refrigeração ao longo do armazenamento. Observou-se valores maiores de pH para as amostras contendo maiores concentrações de quitosana. Tal fato se deve, provavelmente, devido à quitosana ser uma fibra de origem animal derivada da quitina que se caracteriza por possuir grupos amínicos livres, solubilidade em soluções ácidas, insolubilidade em pH superior a 6,5, capacidade de formar soluções viscosas com formação de geleificação e de solubilizar-se em misturas de água e álcool (Muzzarelli; Rocchetti, 1986).

**Figura 1** Alterações nos valores de pH durante o tempo de armazenamento de mortadelas elaborados com diferentes concentrações de quitosana. Q0: controle; Q1: amostra elaborada com adição de 1% de quitosana; Q2: amostra elaborada com adição de 2% de quitosana; Q3: amostra elaborada com adição de 3% de quitosana.



O nitrito residual apresentou diferença significativa ( $p<0,05$ ) para todas as amostras em estudo. Sendo verificada queda da concentração deste para todos tratamentos, para o Q2 e o Q3 a queda apresentou-se menor que as demais (Figura 2).

**Figura 2** Alterações nos valores de Nitrito durante o tempo de armazenamento de mortadelas elaborados com diferentes concentrações de quitosana. Q0: controle; Q1: amostra elaborada com adição de 1% de quitosana; Q2: amostra elaborada com adição de 2% de quitosana; Q3: amostra elaborada com adição de 3% de quitosana.



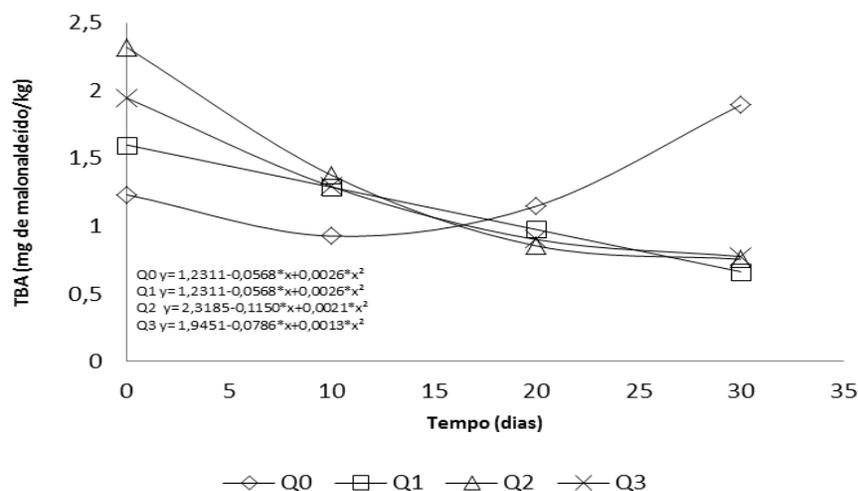
A queda nos valores de nitrito após ser adicionado em sistema cárneo ocorre devido à sua oxidação de, aproximadamente 1% a 10% para nitrato ( $\text{NO}_3$ ), e reações com a mioglobina (5% a 10%), com os grupos sulfidrila das proteínas (5% a 15%), com gordura (1% a 5%), com proteína (20% a 30%) e cerca de 1% a 5% transformam-se em gás e se desprendem do produto (Cassens, 1997). Em consequência, essas reações complexas do nitrito podem contribuir para a variação na quantidade residual de nitrito em produtos cárneos. Fato este constatado neste estudo, onde ocorreu redução de aproximadamente 80 ppm de nitrito nas quatro amostras. Observando-se diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da queda na concentração de nitrito quando a concentração de quitosana é aumentada.

A atividade sobre *Clostridium botulinium* do nitrito em carnes curadas é mais importante, em termos de saúde pública, do que para a cor e o desenvolvimento de sabor, atributos relacionados à aceitação do produto pelos consumidores. Para o desenvolvimento de cor e sabor, baixas dosagens, como 30 a 60 ppm, se mostram adequadas para diversos produtos cárneos. O efeito antibotulínico requer ao menos 120 ppm em bacon, presunto curado e em carne enlatada (Feiner, 2006). Esse é o motivo pelo qual as autoridades sanitárias de diversos países, entre eles o Brasil, permitem valores residuais máximos de 150 ppm em produtos curados.

A Figura 3 mostra os resultados de TBARs, que foram afetados significativamente ( $p < 0,05$ ) ao longo do armazenamento. O controle iniciou com menor média e ao longo dos 30 dias avaliados houve aumento expressivo do índice de oxidação. Para as demais amostras observou-se que no tempo 0 todas as amostras contendo quitosana apresentaram valores maiores que o controle, porém, ao longo do tempo ocorreu redução destes valores, para cerca de 0,6 mg de malonaldeído.Kg<sup>-1</sup>, demonstrando possível efeito antioxidante da quitosana nestes produtos. A oxidação do produto não é desejável uma vez que os odores de ranço podem ser detectados por provadores treinados e não treinados na faixa de 0,5 – 1,0 e 0,6 – 2,0 mg de malonaldeído.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Counsell; Hornig, 1981).

O mecanismo de ação antioxidante da quitosana em produtos cárneos é atribuído à sua capacidade de quelar íons metálicos, tais como o ferro, ligado às moléculas de hemoglobina e mioglobina, o qual age como catalisador desta reação (Kamil et al., 2002; Barreteau et al., 2006).

**Figura 3** Alterações nos valores de TBARs durante o tempo de armazenamento de mortadelas elaborados com diferentes concentrações de quitosana. Q0: controle; Q1: amostra elaborada com adição de 1% de quitosana; Q2: amostra elaborada com adição de 2% de quitosana; Q3: amostra elaborada com adição de 3% de quitosana.

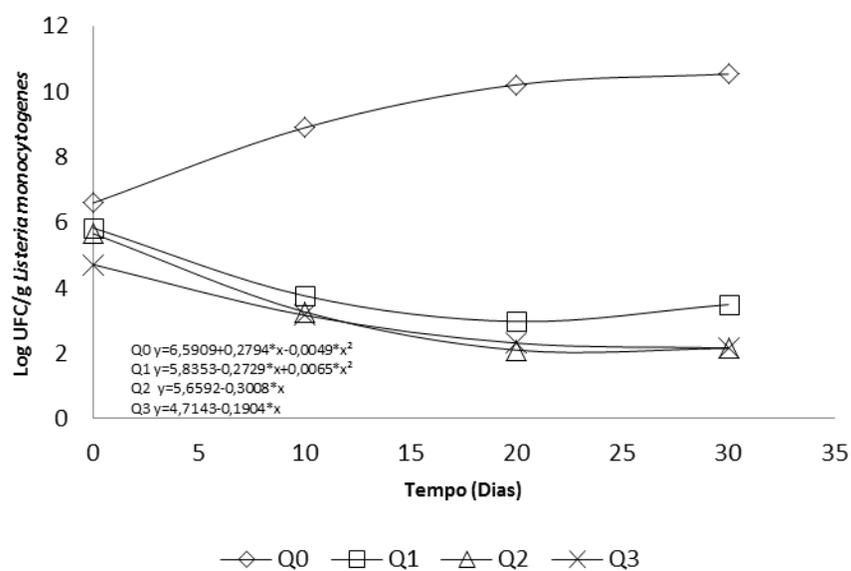


### 3.3 Enumeração de *Listeria monocytogenes*

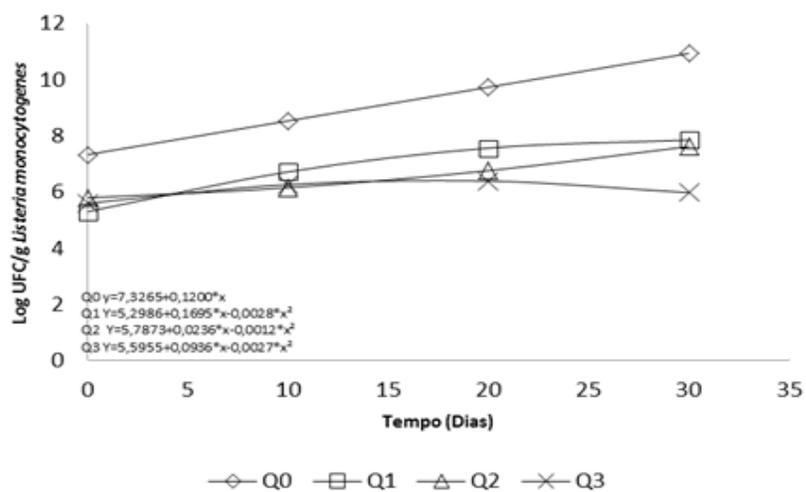
A quitosana exibe atividade antimicrobiana comprovada contra uma gama de microrganismos patogênicos, dentre estes, vários de interesse à indústria cárnea (Gökmen; Gürbüz, 2011). O espectro de susceptibilidade microbiana depende de alguns fatores, como o tipo de microrganismo, o peso molecular, a fase de crescimento em que se encontra (Liu et al., 2006) o grau de desacetilação da quitosana, a temperatura e do pH do meio (Chen e Hwa, 1996; Gerasimenko et al, 2004; Damian et al., 2005).

Os valores das quatro amostras para contagem de *Listeria monocytogenes* tanto na mortadela inteira (Figura 4A) como na mortadela fatiada (Figura 4B) foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), onde, as amostras controle apresentaram maiores contagens, cerca de  $10^{10}$  UFC/g, para ambos os tipos de mortadelas em estudo, ao final do período de armazenamento.

**Figura 4** Contagem de *Listeria monocytogenes* na mortadela inteira (A) e na mortadela fatiada (B) durante o tempo de armazenamento de mortadelas elaborados com diferentes concentrações de quitosana. Q0: controle; Q1: amostra elaborada com adição de 1% de quitosana; Q2: amostra elaborada com adição de 2% de quitosana; Q3: amostra elaborada com adição de 3% de quitosana.



A



B

No tempo 0, 24 horas após o processamento, para os tratamentos contendo quitosana, constatou-se uma pequena redução na contagem de *Listeria monocytogenes*, fato este que foi observado durante todo o período de armazenamento (Figura 4A). Onde, as maiores reduções foram observadas para as amostras contendo as maiores concentrações, 2 e 3%, constatando-se uma redução de 3 ciclos logarítmicos. Tal fato, demonstra uma possível atividade antimicrobiana efetiva da quitosana contra o microrganismo alvo na mortadela inteira.

Quando comparadas as contagens da *Listeria monocytogenes* na mortadela inteira e fatiada, torna-se nítida a maior eficiência na redução do microrganismo quando a quitosana encontrava-se junto à massa cárnea. A maior redução observada para a mortadela fatiada (Figura 4B) foi da amostra Q3, onde se constatou um leve aumento do microrganismo nos primeiros 10 dias, com posterior queda. Já as amostras Q1 e Q2 apresentaram contagens semelhantes ao final dos 30 dias de armazenamento. Verifica-se uma redução de aproximadamente 1 log quando analisada a amostra contendo 3% de quitosana. Nota-se uma maior redução para a maior concentração de quitosana utilizada, contudo, estes resultados quando comparados à adição da quitosana na massa do produto apresentou-se com menor efetividade. Tal fato, ocorreu, provavelmente, pela maior presença do microrganismo na superfície do produto e devido ao baixo contato com a quitosana, que encontrava-se ao longo da fatia de mortadela.

A eficácia antimicrobiana da quitosana não é sempre realizada em alimentos, devido à natureza altamente reativa deste composto policatiônico, que interage prontamente com proteínas, gorduras e outras substâncias aniônicas (Rhoades, 2000). Tal fato foi ressaltado nesta pesquisa, uma vez que a CMB da quitosana sobre a *Listeria monocytogenes in vitro* foi de 1%, enquanto que, quando verificada a eficiência *in situ* os melhores resultados para a atividade antimicrobiana encontravam-se em concentrações mais elevadas desta substância.

O mecanismo de ação da quitosana sobre os microrganismos não está completamente elucidado, contudo, várias propostas são sugeridas. Alguns pesquisadores correlacionam a atividade antimicrobiana da quitosana à formação de complexos polieletrólíticos, uma vez que, seus grupos amínicos protonados provavelmente se ligam seletivamente à superfície negativamente carregada dos microrganismos, o que interfere na atividade celular e na permeabilidade da membrana e resulta na perda de componentes intracelulares com consequente inibição microbiana (Tsai, Hwang, 2004).

Outros estudos revelam, ainda, que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas das soluções, concentração utilizada e tempo de exposição, além das características inerentes à membrana do microrganismo em questão (Costa et al., 2006).

Com isso, pesquisas demonstram que a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas aumenta quanto maior a massa molecular do polímero, enquanto que, para bactérias Gram-negativas, quanto menor a massa molecular, maior o potencial antimicrobiano. Desprende-se assim a sugestão de que os efeitos da quitosana são distintos nos dois tipos de bactérias: nas Gram-positivas, a hipótese é que a quitosana de alta massa molecular forma películas ao redor da célula que acabam por inibir a absorção de nutrientes, enquanto a de baixa massa molecular penetra mais facilmente em bactérias Gram-negativas, ligando-se ao DNA e impedindo assim que o RNA e, conseqüentemente, as proteínas, sejam sintetizados causando distúrbios no metabolismo celular (Devlieghere et al., 2004; Harish et al., 2007). Em adição, sabe-se que a quitosana também apresenta a função de agente quelante de íons metálicos, e dessa forma é sugerido ainda que a molécula pudesse interferir na produção de toxinas e crescimento microbiano (Amarim et al., 2005).

## 4 CONCLUSÃO

A adição de quitosana não alterou de forma significativa a atividade de água e o potencial de oxi-redução das mortadelas. Quanto ao pH, constatou-se uma diferença significativa das amostras ao longo do tempo, onde as amostras contendo maiores concentrações de quitosana, Q2 e Q3, apresentaram maiores índices de pH. Com relação à oxidação lipídica, os resultados do trabalho mostraram que as amostras contendo diferentes concentrações de quitosana apresentaram menores valores de substâncias reativas ao TBARs, portanto, reduzindo-a. Para a análise de nitrito residual houve diferença significativa para todas as amostras em estudo, sendo verificada queda da concentração deste para todos os tratamentos; para o Q2 e o Q3 a queda apresentou-se menor que as demais, apresentando ao final do período de armazenamento uma concentração maior de nitrito residual.

Já quanto à enumeração de *Listeria monocytogenes* nas mortadelas, inteiras e fatiadas, constatou-se uma redução do número de microrganismos nas amostras contendo quitosana quando comparadas ao controle, onde a maior redução averiguada foi nas mortadelas inteiras, demonstrando uma possível atividade antimicrobiana.

Assim, os resultados do presente trabalho permitem concluir que existe viabilidade tecnológica e atividade antimicrobiana em relação a um patógeno de grande interesse na indústria cárnea, na adição de quitosana em produtos cárneos, conseguindo obter, ainda, um produto fontes de fibras.

## **AGRADECIMENTOS**

A equipe agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

Amorim, R.V.S.; Ledingham, W.M.; Fukushima, K. and Campos-Takaki, G.M. (2005). Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (*Zygomycetes*) and its relationship to cell growth rate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32, 19-23.

Association of Official Analytical Chemists. (1998). *Official methods of analysis of AOAC International*. 16th ed. Virginia.

Avadi M.R., Sadeghi A.M.M., Tahzibi A., Bayati K., Pouladzadeh M., Zohuriaan-Mehr M.J., Rafiee-Tehrani M. (2004). Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: Synthesis, characterization and antibacterial effects. *Eur. Polymer J*, 40,1355–1361.

Barreteau, H., Delattre, C., Michaud, P. (2006). Production of Oligosaccharides as Promising New Food Additive Generation. *Food Technol. Biotechnol.*, 44, 323–333.

Bento, R. A.; Stamford, T. L. M.; Campos-Takaki, G. M.; Stamford, T. C. M. Souza, E. L. (2009). Potential of chitosan from *Mucor rouxii* UCP064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria monocytogenes* / Potencial de quitosana de *Mucor rouxii* UCP 064 como componente alternativo para inibir *Listeria monocytogenes*. *Braz. j. microbial*, 40, 583-589.

Beresford, M, R., Andrew, P. W., Shama, G. (2009). *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology*, 90,1000-1005.

Bostan, K.; Isin Mahan, F. (2011). Microbiological Quality and Shelf life of Sausage Treated with Chitosan. *J. Fac. Vet. Med. Istanbul Üniv*, 37, 117-126.

Bressan, M. C.; Iodi, F.; Ferreira, M. W.; Andrade, P. L.; Boari, C. A.; Piccoli, R. H. (2007). Influência da embalagem na vida útil de presuntos fatiados. *Revista Ciência e Agrotecnologia*, 31, 433-438.

Cassens, R. G. (1997). Residual nitrite in cured meat. *Food Technology* 51, 53-55.

Chen, R.H., Hwa, H.D. (1996). Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on thermal, mechanical and permeability properties of the prepared membrane. *Carbohydrate Polymers*, 29, 353-358.

Costa Silva HSR, Dos Santos KSCR and Ferreira EI. (2006). Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, 29, 776-785.

Counsell, J. N., Hornig, D. H. (1981) *Vitamin C (ascorbic acid)*. England: Applied Science, (Chapter 7).

Damian, C.; Ribeirão, L. H.; Francisco, A.; Espírito Santo, L. M. P.; Teixeira, E. (2005). Quitosana: um aminopolissacarídeo com características funcionais. *Alim. Nutr.*, 2, 195-205.

Devlieghere, F.; Vermeiren, L.; Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14, 273-285.

Dutra, M. P. et al. (2009). Efeito da radiação gama na cor objetiva de mortadelas elaboradas com diferentes concentrações de nitrito. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 5., 2009, São Paulo. Anais...Campinas: ITAL/CTC, 2009. 1 CD ROM.

Feiner, G. (2006). *Meat products handbook practical science and technology*. Boca Raton: CRC.

Counsell, J. N., Hornig, D. H. (1981) Vitamin C (ascorbic acid). England: Applied Science, (Chapter 7).

Franco, L.O., Stamford, T.C.M., Stamford, N.P., Campos-Takaki, G.M. (2005). *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. *Revista Analytica*, 14, 40-44.

Gerasimenko, D. V., Avdienko, I. D., Bannikova, G. E., Zueva, O. Y., Varlamov, V. P. (2004). Antibacterial Effects of Water-Soluble Low-Molecular-Weight Chitosans on Different Microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, 253–257.

Gökmen, M., Gürbüz, U. (2011). Use of Chitosan in Turkish Sausage (Sucuk) Production and Effects on Quality. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 67-71.

Harish Prashanth, K. V.; Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 117-131.

Hitchins, A.D. (2003). *Listeria monocytogenes*. In: *Bacteriological Analytical Manual*. 7 ed. Arlington: AOAC International, 141-151.

Jay, J. M. (2005). *Microbiologia de alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 347.

Kamil J. Y. V. A., Jeon Y. J., Shahidi F. (2002). Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*). *Food Chemistry*, 79, 69–77.

Kanatt, S. R., Chander, R., Sharma, A. (2008). Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. *Food Chemistry*, 107, 845-852.

Liu, N., Chen, X. G., Park, H. J., Liu, C. G., Liu, C. S., Meng, X. H., Yu, L. J. (2006). Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers* 64, 60-65.

Martin, B. Perich, A.; Gomez, D.; Yanguela, J. Rodriguez, A.; Garriga, M.; Aymerich, T. (2014). Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants Belen. *Food Microbiology*, 44, 119-127.

Muzzarelli, R. A. A.; Rocchetti, R. (1986). The determination of the degree of acetylation of chitosan by spectrophotometry. In: MUZZARELLI, R.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G. W. (Ed.). *Chitin in nature and technology*. New York: Plenum Press, 385-388.

Park, W. Y., Kim, Y. J. (2010). Effects of Chitosan with Different Molecular Weight and Nitrite Addition on the Residual Nitrite Contents and Self-life of Emulsified Sausage during Cold Storage. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour*, 30, 269-276.

Raharjo, S.; Sofos, J. N.; Schmidt, G. R. (1993). Improved Speed, Specificity, and Limit of Determination of an Aqueous Acid Extraction Thiobarbituric Acid-C18 Method for Measuring Lipid Peroxidation in Beef. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2182-2185.

Rhoades, J.; Roller, S. (2000). Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 80-86.

Silva, M.C.D.; Hofer, E.; Tibana, A. (1998). Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Protection*, 61, 354-356.

Silva, J. A. (2000). *Tópicos da tecnologia de alimentos*. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 227 p.

Tsai, G. J.; Hwang, S. P. (2004) In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. *Fisheries Science*, 70, 675-681.

**ARTIGO 2**

**CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA E SENSORIAL DE  
MORTADELAS FORMULADAS COM QUITOSANA**

Artigo redigido conforme a norma da revista Journal of Functional Foods  
“Versão Preliminar”

## RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações de quitosana (0, 1, 2 e 3%) nas características tecnológicas e sensoriais de mortadelas. Não houve ( $P>0,05$ ) efeito dos tratamentos sobre a composição centesimal, sendo que todas as mortadelas estavam dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. Com o aumento da concentração de quitosana houve ( $P<0,05$ ) elevou os valores de pH e redução nos valores de atividade de água das mortadelas. O potencial de oxi-redução não foi afetado ( $P>0,05$ ) pelos tratamentos, com média de 55,62, mas um maior ( $P<0,05$ ) teor de nitrito residual médio foi observado nas mortadelas adicionadas de 3% de quitosana (72,26 ppm) em relação às demais formulações. Com relação à oxidação lipídica, as mortadelas adicionadas de 2% e 3% de quitosana possuíram ( $p<0,05$ ) maiores valores de TBARS do que as demais. Os índices de cor instrumental não diferiram ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos, os parâmetros de dureza e mastigabilidade reduziram ( $p<0,05$ ) com a adição crescente de quitosana na formulação. As notas hedônicas das amostras situaram-se entre 6 e 8 (gostei ligeiramente e gostei muito), exceto para aparência daquelas adicionadas de 1% de quitosana, cuja nota ficou entre 5 e 6 (nem gostei/nem desgostei e gostei ligeiramente). O teste de aceitação destacou, claramente, que as amostras contendo 2 e 3% de quitosana foram as preferidas para os atributos sensoriais de sabor e textura. Para o atributo aparência, as amostras preferidas foram as controle que continha 1% de quitosana, apesar da dispersão dos vetores. Pelo CATA, as amostras mais aceitas foram as que continham 2 e 3% de quitosana, sugerindo que o controle apresentou “cor rosa clara”, “sabor de carne”, “sabor salgado”, “sabor residual de gordura”, “gosto de ranço” e a amostra com 3% de quitosana “sabor característico de mortadela”. Os resultados indicam viabilidade da adição de quitosana, nas concentrações testadas, em mortadelas.

**Palavras-chave:** fibra alimentar, produto emulsionado, CATA.

## ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effects of adding different concentrations of chitosan (0, 1, 2 and 3%) in technological and sensory characteristics of mortadella. There were no ( $P > 0.05$ ) effect of treatments on the composition, and all mortadella were within the limits established by Brazilian law. With the chitosan increase concentration there was ( $P < 0.05$ ) an increase in pH and reduction in the water activity values of mortadella. The oxidation-reduction potential was not affected ( $P > 0.05$ ) by the treatments, with an average of 55.62, but a higher ( $P < 0.05$ ) average residual nitrite content was observed in mortadella with 3% chitosan (72.26 ppm) when compared with the other formulations. Regarding lipid oxidation, the mortadella with 2% and 3% chitosan had ( $p < 0.05$ ) higher TBARS values than the others. The instrumental color indices did not differ ( $P > 0.05$ ) between treatments, the parameters of hardness and chewiness reduced ( $p < 0.05$ ) with the increasing addition of chitosan in the formulation. The hedonic notes of samples were between 6 and 8 (slightly liked and enjoyed), except for the appearance of those with 1% chitosan, whose score was between 5 and 6 (not liked / or disliked and slightly liked). The acceptance test noted clearly that the samples containing 2 and 3% chitosan were preferred for the sensory attributes of taste and texture. For appearance attribute the preferred samples were the control and the sample with 1% chitosan, despite the dispersion of vectors. At CATA, the most accepted samples were those that contained 2 to 3% of chitosan, suggesting that control presented "light pink", "meat flavor", "salty", "aftertaste of fat", "stale taste" and the sample with 3% chitosan had "characteristic mortadella flavor". The results indicate feasibility of adding chitosan, in the studied concentrations, in mortadella.

**Keywords:** dietary fiber, emulsified product, CATA.

## 1 INTRODUÇÃO

No cenário atual verifica-se que o padrão alimentar dos seres humanos mudou para uma dieta rica em produtos industrializados, onde gorduras e açúcares adicionados são amplamente consumidos, enquanto a ingestão de proteínas vegetais e fibras alimentares são reduzidas (Kendall et al., 2010). Apesar disso, os benefícios creditados a uma alimentação saudável e a conscientização da população da importância quanto ao consumo de alimentos contendo substâncias que auxiliam a promoção da saúde (Moraes; Colla, 2006) alertaram intensamente todos os setores responsáveis pela produção de alimentos, levando à busca por alternativas de transformação, conservação e alteração química destes produtos. Com isso, ressalta-se a ampliação da utilização de fibras alimentares em alimentos.

Neste panorama surge a quitosana, uma fibra alimentar de origem animal, que apresenta propriedades benéficas superiores a outras fibras dietéticas, tanto sintéticas quanto naturais. Extraída do exoesqueleto de crustáceos e com estrutura química semelhante à celulose, a quitosana pode atuar como um alimento funcional, reduzindo a absorção das gorduras no intestino e promovendo a diminuição da concentração de colesterol sérico (Muzzarelli; Rocchetti, 1986; Tharanathan; Kittur, 2003), além de atuar no tratamento e prevenção da obesidade, doenças coronarianas e certas desordens intestinais (Jo et al., 2001; Synowiecki; Al-khateed, 2003; Liu et al., 2008).

O Guia Alimentar para a população brasileira recomenda o consumo de 25g de fibras alimentares ao dia para adultos (Brasil, 2006). A Sociedade Brasileira de Cardiologia orienta o consumo entre 20 a 30g de fibras e a Sociedade Brasileira de Diabetes de 21 a 30g fibras/dia (Sposito et al., 2007). Já a American Dietetic Association (ADA, 2002) recomenda a ingestão de 20 a 35 g de fibras por dia ou 10 a 13 g de fibras para cada 1.000 kcal ingeridas, para

adultos saudáveis. Legalmente no Brasil, para que um produto possa alegar propriedades de saúde com as fibras alimentares, este deve fornecer na porção do produto sólido pronto para consumo, no mínimo de 2,5g de fibras por porção do produto (Brasil, 2000). Quando a fibra for a quitosana os fabricantes podem utilizar a seguinte alegação: “A quitosana auxilia na redução da absorção de gordura e colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis” (Anvisa, 2013).

Um estudo conduzido por Goosen (1997) obteve dados de efeitos da dieta com quitosana em homens adultos. A fibra foi administrada na forma de biscoito por um período de estudo de quatro semanas. Quando a quitosana foi adicionada na dieta (3 a 6 g/dia), o nível sérico de colesterol total diminuiu significativamente, enquanto o de lipoproteína de alta densidade aumentou quando comparado com os níveis antes da ingestão.

Contudo, em produtos com deficiência em fibras alimentares na composição centesimal, como os produtos cárneos, a incorporação destes componentes torna-se um fato altamente relevante tanto para as indústrias alimentícias, quanto para os consumidores. Além das propriedades funcionais, as fibras alimentares também colaboram para as propriedades reológicas de produtos (Mudgil; Barak, 2013) através de características como a solubilidade, viscosidade, formação de gel, capacidade de retenção de água e aumento de volume através de associação entre moléculas (Cummings; Stephen, 2007; Mudgil; Barak, 2013). Estes efeitos são altamente interessantes em produtos cárneos, especialmente em produtos emulsionados, como mortadelas.

Além das propriedades tecnológicas do produto, outro fator que deve ser levado em consideração ao se elaborar um novo produto são as características sensoriais. Ng et al. (2013) destacaram a importância das propriedades sensoriais para obter respostas emocionais no desenvolvimento de novos produtos, reportando-se, portanto, os benefícios do uso de respostas dos consumidores

para tal fim. Neste sentido, a metodologia do Check-all-that-apply – CATA aparece como uma metodologia valiosa para compreender características hedônicas e sensoriais de produtos alimentícios, gerando dados úteis e interessantes que podem ser utilizados para complementação de técnicas que utilizam avaliadores treinados, de forma mais fácil e menos demorada para a compreensão dos provadores (Ares et al., 2010; Jorge et al., 2015).

Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar por meio de análises físico-químicas, escala hedônica e metodologia do CATA, os efeitos sobre a caracterização tecnológica e sensoriais da adição de diferentes concentrações de quitosana na elaboração de mortadelas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Tecnologia de Carnes e Derivados e de Análise Sensorial do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A carne de acém bovino e o toucinho utilizados na formulação foram adquiridos em comércio de Lavras, MG. A quitosana (densidade de 0,30 g/mL, grau de desacetilação >85,0%) foi adquirida da empresa Polymar (Fortaleza, CE).

### 2.1 Elaboração das mortadelas

A elaboração das mortadelas foi baseada na formulação descrita por Dutra (2009), sendo adicionados diferentes níveis de quitosana em substituição à massa cárnea: 0% (Q0); 1% (Q1); 2% (Q2); e 3% (Q3). A massa cárnea das mortadelas foi formulada com 58% de acém bovino e 14% de toucinho suíno. Os demais ingredientes da formulação foram: água (20%); fécula de mandioca (5%); sal (2%); polifosfato de sódio (0,5%; Fosmax E-10, New Max Industrial Ltda); nitrito de sódio (150 ppm, Maxsoy Alimentos Ltda); e ácido ascórbico (0,5%; Fixamax C-202; New Max Industrial Ltda). Os ingredientes foram processados em *cutter* KJ-10 (Indústrias Jamar Ltda.; Tupã, SP, Brasil) e a massa embutida (gomos de  $\pm$  400g) em tripa artificial de poliamida (STARTRIP® Z-R, SCHUR Equipamentos e Embalagens; Barueri, SP, Brasil) de 67 mm diâmetro. Os gomos foram cozidos por imersão em água até temperatura interna de 73°C (acompanhada pela inserção de um termopar no centro da massa), quando as mortadelas foram removidas, resfriadas e estocadas em câmara fria (4°C) por 24 horas.

## 2.2 Caracterização das mortadelas

As mortadelas elaboradas foram analisadas quanto à composição centesimal de acordo com os métodos oficiais da AOAC (2002): umidade, pela secagem da amostra a 105°C até peso constante (AOAC 950.46); extrato etéreo (gordura), pelo método de Soxhlet (AOAC 960.39); proteínas, por micro-Kjeldahl e fator de conversão do nitrogênio de 6,25 (AOAC 968.06); resíduo mineral fixo (cinzas), por incineração da amostra a 550°C (AOAC 950.46) e carboidratos pela diferença dos demais.

Uma porção de cada mortadela foi homogeneizada (triturador Turratéc Te102; TECNAL Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, SP, Brasil) em 10 porções de água destilada e o pH e o potencial de oxi-redução (Eh) imediatamente medidos por um eletrodo combinado de bulbo vidro acoplado a um pHmetro DM 20 (Digimed, São Paulo, Brasil). A atividade de água das amostras trituradas foi determinada em aparelho Aqualab CX2 (Decagon Devices Inc., WA, USA) e o teor residual de nitrito quantificado segundo método oficial no. 973.31 da AOAC (2002).

O grau de oxidação lipídica foi determinado usando o teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (índice de TBARS), segundo metodologia descrita por Raharjo et al. (1992). A concentração do malonaldeído (MDA) foi determinada por curva analítica de 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) e os resultados de TBARS expressos como mg MDA.kg<sup>-1</sup> de amostra.

A cor instrumental foi determinada em um espectrofotômetro colorimétrico CM700 (Konica Minolta Sensing Inc. Osaka, Japan), utilizando o iluminante D65, ângulo do observador de 10° e componente especular excluído (SCE mode). Os componentes luminosidade (L\*), índice de vermelho (a\*) e índice de amarelo (b\*) foram determinados a partir de cinco leituras realizadas em vários pontos da superfície das amostras, conforme descrito por Jorge et al.

(2015). A saturação ( $C^*$ ) e o ângulo de tonalidade ( $h^*$ ) também foram determinados:  $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ ; e  $h^* = \tan^{-1} (b^*/a^*)$ .

A análise de textura foi avaliada pelo método de análise de textura (TPA), conforme descrito por Jorge et al. (2015), sendo utilizado um texturômetro TA.XT2i (Stable Micro Systems). Seis replicatas foram cortadas em cubos de 1.0 cm de aresta e comprimidas duas vezes, a uma taxa de  $180 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ , até 50% do seu tamanho original. Não houve tempo de descanso entre os dois de compressão. Foi obtida uma curva de deformação ao longo do tempo, de onde se calculam os seguintes parâmetros de textura (Ramos; Gomide, 2007): fraturabilidade (N), dureza (N), coesividade, adesividade (N.mm), elasticidade (mm) e mastigabilidade (N.mm).

### **2.3 Análise sensorial**

A análise sensorial foi realizada após aprovação no Sistema Nacional de Ética em Pesquisa (SISNEP), sob o protocolo CAAE 12961113.6.0000.5148, como requisito para obedecer aos preceitos da Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1996), sendo que os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

As perguntas do CATA foram previamente definidas, usando o método proposto por Ares et al. (2010) e modificado por Jorge et al. (2015) para produtos cárneos. Na primeira etapa, onze participantes não treinados, declarados provadores frequentes (com consumo em mais que uma vez por semana) de mortadela, foram recrutados aleatoriamente na Universidade Federal de Lavras (UFLA), sendo o grupo composto por professores, estudantes de graduação e pós-graduação, com idades variando de 20 a 45 anos. Quatro amostras de mortadelas fatiadas (aproximadamente 4 mm de espessura) em um cortador de frios (modelo USM2 200; Urano; Canoa, RS, Brasil) foram servidas

e apresentadas numa única sessão de testes (Técnica de Rede), em que os juízes usaram uma pergunta aberta para esclarecer os termos apropriados para descrever a sua cor, aparência, sabor e textura. Os termos mais citados para cada atributo foram escolhidos para compor o questionário do CATA (Tabela 1).

**Tabela 1** Termos sugeridos para cada atributo sensorial durante a primeira fase das questões do Check-all-that-apply (CATA).

<b>Aparência</b>	<b>Sabor</b>	<b>Textura</b>
Cor rosa clara	Sabor característico de mortadela	Firme
Cor rosa escura	Sabor de carne	Macia
Cor avermelhada	Gosto de raço	Pastosa
Cor amarronzada	Sabor condimentado	Quebradiça
Cor esverdeada	Sabor residual de gordura	Borrachenta
Presença de gordura aparente	Sabor salgado	Fibrosa
Textura lisa		
Textura grosseira		

Na segunda etapa utilizou-se, ou recrutou-se, um grupo de 100 provadores, não treinados, formado por professores, estudantes de graduação e pós-graduação da UFLA. Todos os participantes se declararam provadores de mortadela. A análise sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial (DCA/UFLA) numa única sessão de testes conduzidos em cabines individuais com luz branca. As amostras de mortadela foram marcadas com um código de três dígitos e apresentadas aos participantes aleatoriamente em sequência monádica e de forma casualizada. Foi fornecida água mineral para limpeza do palato entre as avaliações das amostras. Os provadores receberam uma ficha de avaliação sensorial e foram instruídos a analisar as amostras, utilizando uma escala hedônica cujas notas variaram de 1 (desgostei extremamente) até 9 (gostei extremamente), quanto aos atributos: aparência; sabor; textura; e aspecto global. Na mesma avaliação foi solicitado que os provadores assinalassem quais termos

da lista previamente definida (Tabela 1) eles consideravam adequados para descrever cada amostra.

#### **2.4 Análises estatísticas**

Os dados das análises físico-químicas foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos (amostras) e três repetições através da análise de variância (ANOVA). Os dados foram testados pela ANOVA e, quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando um nível de significância de 5%.

A avaliação estatística para o teste de aceitação foi conduzida considerando um delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), onde cada provador constituía um bloco. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando necessário, as médias comparadas pelo teste de Tukey, considerando um nível de significância de 5%. Cada atributo foi analisado individualmente pelo Mapa de Preferência Interno (MPI) e os atributos aparência, sabor e textura foram simultaneamente avaliados pelo Mapa de Preferência Interno de três vias (MPI tri-plot), também denominado *parallel factor analysis* (PARAFAC), segundo descrito por Nunes (2012) e Nunes et al. (2011).

A fim de identificar a relação entre os termos do CATA selecionados para cada amostra, o Mapa de Preferência Externo – MPE (Nunes et al., 2011; Nunes et al., 2012) na matriz de correlação com os valores hedônicos que os provadores infringiram para o atributo da impressão global para as amostras. A Análise de Componentes Principais (PCA) também foi utilizada para correlacionar os índices das análises de cor e textura instrumental com os termos do CATA que tinham referência com os atributos de aparência e textura, respectivamente.

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o pacote estatístico *SAS*, versão 9.2 (*Statistical Analysis System - SAS Institute Inc.*, Cary, NC, USA), licenciado para a UFLA. As análises de MPI, MPI three-way, MPE e PCA, foram realizadas utilizando o programa estatístico *SensoMaker* version 1.5 (Lavras, Brasil).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Caracterização das mortadelas**

Os dados relativos às análises tecnológicas das amostras de mortadelas são apresentados na Tabela 2. A adição de quitosana não alterou ( $P>0,05$ ) a composição centesimal das mortadelas, sendo que todos os tratamentos avaliados estavam dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira (MAPA, 2000) para os teores de proteína (mínimo de 12%), umidade (máximo de 65%), gordura (máximo de 30%) e carboidratos (máximo 10%) em embutidos com a denominação “mortadelas”. Ainda segundo a legislação brasileira (Brasil, 1998), a mortadela com 3% de quitosana pode ser categorizada como “fonte de fibras alimentares”.

**Tabela 2** Médias<sup>1</sup> ( $\pm$  desvio padrão) das características tecnológicas das amostras de mortadelas

Características	Amostras <sup>2</sup>				Médias
	Q0	Q1	Q2	Q3	
Umidade (%)	64.80 $\pm$ 0.25	64.62 $\pm$ 0.24	64.22 $\pm$ 0.08	64.56 $\pm$ 0.07	64.55
Gordura (%)	13.54 $\pm$ 0.44	12.95 $\pm$ 0.57	12.85 $\pm$ 0.23	13.12 $\pm$ 0.31	13.11
Proteína (%)	16.23 $\pm$ 0.08	16.88 $\pm$ 0.18	16.01 $\pm$ 0.26	16,89 $\pm$ 0.21	16.50
Cinzas (%)	3.80 $\pm$ 0.06	3.47 $\pm$ 0.12	3.72 $\pm$ 0.34	3.51 $\pm$ 0.38	3.62
Carboidratos (%)	1.63 $\pm$ 0.43	2.08 $\pm$ 0.12	2.19 $\pm$ 0.24	1.92 $\pm$ 0.27	1.95
pH	6.35 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	6.56 $\pm$ 0.06 <sup>bc</sup>	6.77 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	6.79 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	6.62
Atividade de água (Aw)	0.9536 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	0.9496 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.9360 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	0.9316 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.9427
Nitrito residual (mg.Kg <sup>-1</sup> )	67.65 $\pm$ 1.23 <sup>b</sup>	69.56 $\pm$ 0.89 <sup>b</sup>	69.62 $\pm$ 0.82 <sup>b</sup>	72.26 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	69.77
TBARs mg de MDA.kg <sup>-1</sup>	1.19 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	1.29 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	1.43 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.55 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	1.36
Cor Índice de L*	55.42 $\pm$ 1.56	57.29 $\pm$ 2.90	56.24 $\pm$ 2.51	56.58 $\pm$ 1.97	56.38
Cor Índice de a*	9.96 $\pm$ 1.49	8.96 $\pm$ 3.81	8.77 $\pm$ 2.23	10.30 $\pm$ 0.66	9.50
Cor Índice de b*	14.45 $\pm$ 1.88	14.28 $\pm$ 3.05	14.90 $\pm$ 2.72	13.81 $\pm$ 0.87	14.36
Cor Índice de C*	17.65 $\pm$ 0.79	17.29 $\pm$ 1.06	17.49 $\pm$ 1.37	17.24 $\pm$ 0.36	17.42
Cor Índice de h*	55.23 $\pm$ 0.72	57.45 $\pm$ 0.15	58.99 $\pm$ 0.10	53.23 $\pm$ 0.34	56.22
Dureza (n)	21.05 $\pm$ 3.69 <sup>a</sup>	23.33 $\pm$ 2.15 <sup>a</sup>	19.18 $\pm$ 1.58 <sup>ab</sup>	12.76 $\pm$ 5.51 <sup>b</sup>	19.08
Coesividade	0.69 $\pm$ 0.004	0.70 $\pm$ 0.01	0.69 $\pm$ 0.04	0.70 $\pm$ 0.02	0.69
Adesividade (n.mm)	0.22 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.06	0.14 $\pm$ 0.03	0.19
Flexibilidade (mm)	4.93 $\pm$ 0.25	4.88 $\pm$ 0.28	4.81 $\pm$ 0.41	4.77 $\pm$ 0.18	4.84
Mastigabilidade (n.mm)	72.67 $\pm$ 1.94 <sup>a</sup>	80.55 $\pm$ 1.44 <sup>a</sup>	63.83 $\pm$ 1.99 <sup>ab</sup>	42.08 $\pm$ 1.60 <sup>b</sup>	64.78

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem ( $P < 0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey Q0: amostras controle; Q1: amostras elaboradas com 1% de quitosana; Q2: amostras com 2% de quitosana; e Q3: amostras com 3% de quitosana.

Os valores das quatro amostras para pH foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), onde, as amostras controle e amostras elaboradas com 1% de quitosana apresentaram valores dentro da faixa (6,10 para 6,68) relatada para produtos emulsionados, tipo mortadela (Cáceres et al, 2008; Viuda-Martos et al., 2011; Pereira et al., 2011; Jorge et al., 2015), mesmo estes produtos não apresentando em sua formulação carne mecanicamente separada (CMS). Porém, para as mortadelas contendo 2 e 3% de quitosana estes valores apresentaram-se maiores. Tal ocorrência pode ser explicada pelo fato de a quitosana possuir grupos amínicos livres (Muzzarelli; Rocchetti, 1986), esta característica provavelmente é o fator que influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) o aumento do pH das amostras em maior concentração de quitosana.

A maior concentração de quitosana diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade de água das mortadelas. Isto pode ser devido à maior concentração de fibras presentes nos produtos. Mesmo a quitosana sendo insolúvel em água e em soluções alcalinas (Mathur; Narang, 1990), a sua presença devido à sua baixa atividade de água, reduziu a água livre do produto aumentando, provavelmente, por sua estabilidade microbiológica.

Para o nitrito residual, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras de mortadelas, sendo verificada uma queda na concentração final deste aditivo em relação à quantidade adicionada, embora o tratamento Q3 tenha apresentado uma menor queda do que os demais, provavelmente devido ao pH deste tratamento apresentar-se maior que os outros, uma vez que, as reações de cura ocorrem mais rapidamente em pH mais ácidos. Cassens (1997) relatou que, após o nitrito ser adicionado no sistema cárneo, aproximadamente 1% a 10% é oxidado a nitrato ( $\text{NO}_3$ ), 5% a 10% reage com a mioglobina, 5% a 15% com os grupos sulfidrilas das proteínas, 1% a 5% com gordura, 20% a 30% com proteína e cerca de 1% a 5% transformam-se em gás e se desprendem do produto. Em consequência, essas reações complexas do nitrito podem contribuir

para a variação na quantidade residual de nitrito em produtos cárneos. Fato este constatado neste estudo, onde ocorreu uma redução de aproximadamente 80 ppm de nitrito nas quatro amostras, após um período de 24 horas.

Em relação à oxidação lipídica, os resultados diferenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) para todos os tratamentos. A mortadela controle apresentou menor média quando comparada às demais, porém as amostras que apresentaram maior índice de oxidação foram as mortadelas Q2 e Q3. A quitosana apresenta ação antioxidante que é atribuída à sua capacidade de quelar íons metálicos, tais como o ferro, ligado às moléculas de hemoglobina e mioglobina, o qual age como catalisador desta reação (Barreteau, 2006). A ação antioxidante não foi constatada neste trabalho, para o primeiro dia de vida útil do produto, uma vez que, a análise de TBARs foi realizada no dia seguinte à fabricação das mortadelas, provavelmente devido à quitosana ter reagido com o malonaldeído (Nielsen, 1998). Segundo Counsell; Hornig (1981) odores de ranço podem ser detectados por provadores treinados e não treinados na faixa de 0,5 – 1,0 e 0,6 – 2,0 mg de malonaldeído.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

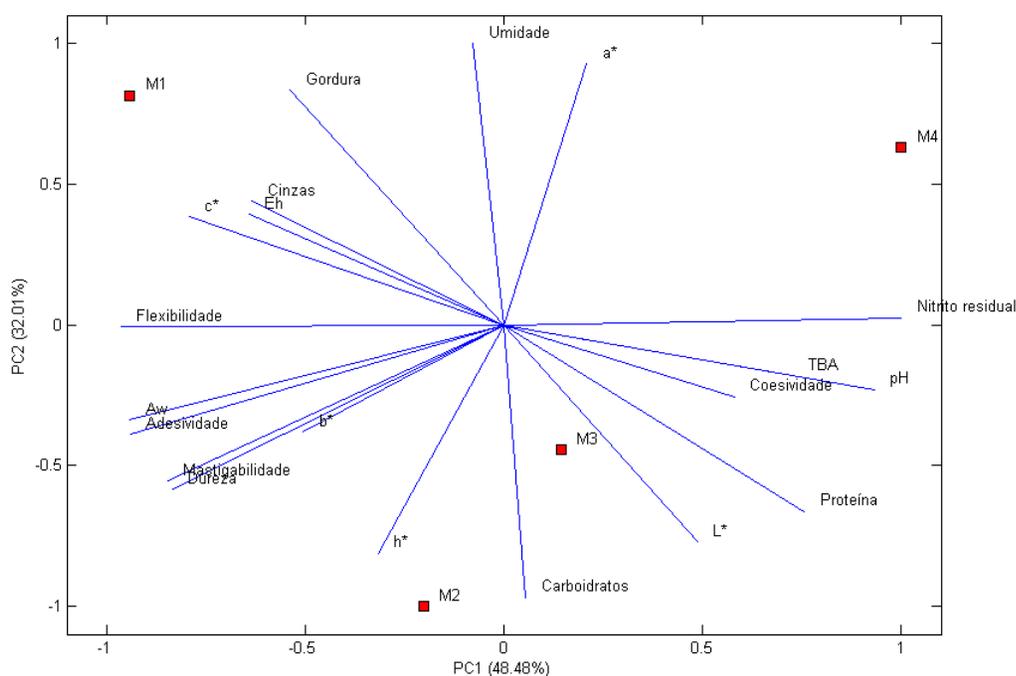
A utilização da quitosana não alterou ( $p > 0,05$ ) os índices de cor dos produtos. No entanto, os parâmetros de textura, dureza e mastigabilidade, foram afetados ( $p > 0,05$ ) pela adição de quitosana. Ambos os atributos reduziram com a maior adição de quitosana. Fernández-Guínés et al. (2004) relataram que, devido à sua capacidade de ligação à água e as propriedades de inchamento, as fibras insolúveis podem influenciar a textura dos alimentos. A fibra insolúvel pode aumentar a consistência dos produtos à base de carne através da formação de uma rede tridimensional capaz de modificar as propriedades da fase contínua de emulsão (Backers; Noli, 1997).

A mastigabilidade é um atributo relacionado ao número necessário de mordidas em força constante para reduzir a amostra até consistência aceitável para que seja engolida (Ramos; Gomide, 2007). Ainda segundo estes autores, a

mastigabilidade é um parâmetro de textura secundário relacionado à flexibilidade, dureza e coesividade. Desta forma, uma vez que não houve efeito sobre a flexibilidade e coesividade das amostras, os baixos valores de dureza das amostras contendo quitosana afetaram de forma significativa a mastigabilidade.

A análise de componentes principais (Figura 1) mostra a relação de todas as análises de caracterização tecnológica com os tratamentos, cujos componentes principais explicam 80,49% da variação.

**Figura 1** Análise de componentes principais (PCA) das médias das análises de caracterização tecnológica das amostras de mortadela. Q0: amostras controle; Q1: amostras elaboradas com 1% de quitosana; Q2: amostras com 2% de quitosana; e Q3: amostras com 3% de quitosana.



É possível observar a formação de três grupos distintos onde diferenças entre atributos: textura instrumental, de cor instrumental e características físico

químicas foram evidentes. O grupo composto pela amostra Q3 foi relacionado a uma maior atividade de água e teor de nitrito residual, estando ainda localizado em sentido oposto aos vetores que indicam dureza e mastigabilidade.

### **3.2 Análise sensorial**

A maioria dos julgadores que participaram da avaliação eram pessoas do sexo feminino (60%) e com idade entre 18 e 30 anos (90%). A frequência de consumo de mortadela apresentou-se elevado, onde 69% dos julgadores relataram consumir os produtos cerca de uma ou duas vezes na semana. Tal fato era esperado devido a este produto cárneo ser muito consumido e apreciado por pessoas de diferentes classes sociais.

#### **3.2.1 Teste de aceitação**

Todas as amostras analisadas apresentaram características sensoriais de aparência, sabor e textura típicas das mortadelas, baseadas no Padrão de Identidade e Qualidade estabelecido pelo país (MAPA, 2000).

A adição de quitosana teve um efeito significativo nas pontuações do teste de aceitação, havendo diferenças ( $p < 0,05$ ) entre as amostras nos atributos de aparência, sabor, textura e impressão global (Tabela 3). Especialmente para a percepção de sabor e de textura, pode-se observar uma preferência pelos julgadores para amostras contendo maior adição de quitosana (Q2 e Q3), verificando a possível utilização desta fibra alimentar em mortadelas, uma vez que, os produtos cárneos são pobres em fibras alimentares. Embora as amostras Q2 e Q3 não tenham diferido ( $P > 0,05$ ) do controle quanto à aparência, a amostra com 1% de quitosana (Q1) apresentou uma menor aceitação neste atributo que as demais.

**Tabela 3** Médias<sup>1</sup> ( $\pm$  desvio padrão) das notas<sup>2</sup> do teste de aceitação para as amostras de mortadelas

Amostras <sup>3</sup>	Aparência	Sabor	Textura	Impressão Global
Q0	6.56 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	6.75 $\pm$ 1.20 <sup>b</sup>	6.79 $\pm$ 1.13 <sup>b</sup>	7.09 $\pm$ 0.98 <sup>ab</sup>
Q1	5.89 $\pm$ 1.23 <sup>b</sup>	6.86 $\pm$ 1.11 <sup>b</sup>	6.66 $\pm$ 1.13 <sup>b</sup>	6.90 $\pm$ 1.06 <sup>b</sup>
Q2	6.47 $\pm$ 1.28 <sup>a</sup>	7.33 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>	7.25 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup>	7.30 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>
Q3	6.20 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>	7.37 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>	7.21 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>	7.32 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras(a,b) iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

<sup>2</sup> Notas da escala de 1 (desgostei muito) a 9 (gostei muito), com valor intermediário de 5 (nem gostei nem desgostei).

<sup>3</sup> Q0: amostras controle; Q1: amostras elaboradas com 1% de quitosana; Q2: amostras com 2% de quitosana; e Q3: amostras com 3% de quitosana.

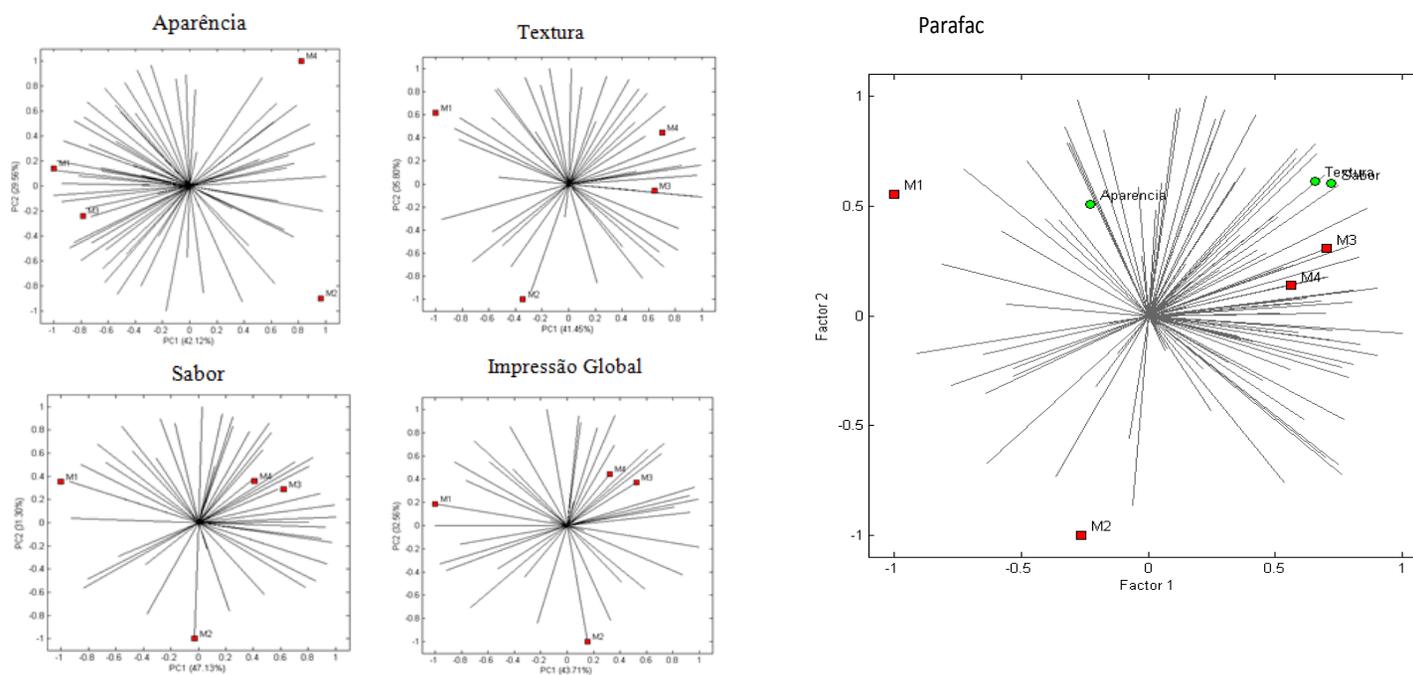
As notas hedônicas situaram-se entre 6 e 8 (gostei ligeiramente e gostei muito), exceto para aparência da amostra Q1. Segundo Anzaldúa-Morales (1994), notas entre 6 (gostei ligeiramente) e 9 (gostei muitíssimo) obtidas no teste de aceitação sugerem que o produto seja aceito no mercado consumidor a partir do ponto de vista sensorial. Além disso, vale ressaltar, que todos os tratamentos receberam médias dos escores acima dos valores considerados “indiferentes” (nota 5,0) em todos os atributos avaliados, o que identifica que os consumidores não desgostaram de nenhuma amostra.

Em seu trabalho, Damian et al. (2005) observaram que sensorialmente, não houve diferença significativa entre as salsichas com quitosana (0,10%; 0,25% e 0,50%) e o controle em relação aos parâmetros de aceitação sensorial. Os valores utilizados por este pesquisador e colaboradores foram inferiores aos utilizados em nosso trabalho, com isso, verifica-se a possibilidade de estudos contendo maiores concentrações de quitosana e, ainda, para diferentes produtos cárneos.

Os dados do teste de aceitação foram usados para criar um mapa de preferência interno (MPI) das amostras em todos os atributos (Figura 2). Além disso, foi realizada uma análise fatorial mapa de preferência interno Tri-plot (PARAFAC), onde as correlações entre as amostras, os consumidores e os atributos sensoriais são demonstrados simultaneamente (Nunes et al., 2011). O “*Core Consistency Diagnostic*” (CORCONDIA) do modelo Parafac explicou 98,44% da correlação entre estes fatores. Contudo, a representação gráfica de Parafac (Figura 2) fornece menos informações do que a análise individual no mapa de preferência interno, especialmente devido ao MPI apresentar a impressão global.

Os componentes principais do MPI explicaram mais de 71% da variação dos dados. O teste de aceitação destaca, claramente, que as amostras contendo maiores teores de quitosana (Q2 e Q3) foram as preferidas para os atributos sensoriais de sabor e textura analisados no teste de aceitação. Para o atributo aparência as amostras preferidas foram as Q0 e Q2, apesar da dispersão dos vetores. Tal preferência demonstra uma possível aceitação por parte dos provadores pela incorporação de quitosana ao produto em estudo.

**Figura 2** Mapa de preferência interno (MPI) para aparência, sabor, textura e impressão global das amostras de mortadela e Tri-plot (PARAFAC) para aparência, sabor e textura das amostras de mortadela com base nas pontuações dos consumidores no teste de aceitação. Q0: amostras controle; Q1: amostras elaboradas com 1% de quitosana; Q2: amostras com 2% de quitosana; e Q3: amostras com 3% de quitosana.



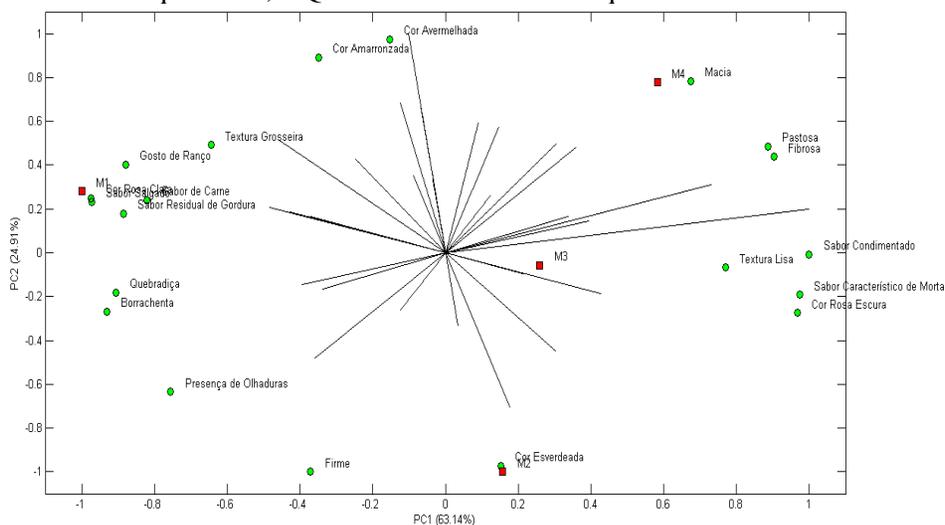
É importante ressaltar que este trabalho utilizou um teste cego, onde os consumidores não tinham conhecimento da adição de fibras nas mortadelas, portanto as amostras foram avaliadas apenas pelas suas propriedades sensoriais. Segundo Moraes et al. (2006), a informação contribui para uma maior aceitação dos alimentos funcionais. Os autores entendem que dispendo de maiores informações tanto sobre os efeitos benéficos de determinados alimentos, como os maléficados causados pela exposição a inúmeras substâncias inerentes à vida moderna, os consumidores poderão conferir maior importância aos alimentos, contendo substâncias benéficas à saúde. Assim, é provável supor que poderia ter havido um maior impacto na aceitação final dos produtos se a amostra fosse apresentada como um produto com características funcionais adicionais ao seu similar comercial.

Considerando que ao se desenvolver um novo produto, um dos pontos fundamentais é avaliar sua aceitabilidade, a fim de prever seu comportamento frente ao mercado consumidor (Robertson, 1998), a adição de quitosana em mortadelas, parece ser uma alternativa viável para o consumo de um produto cárneo enriquecido com fibras alimentares.

### **3.2.2 Check-all-that-apply (CATA)**

O mapa de preferência externo (MPE) (Figura 3) foi gerado a partir da frequência das contagens do número de vezes que os provadores associaram cada termo sensorial às respectivas amostras e com os escores da impressão global obtidas no teste de aceitação (Ares et al., 2011).

**Figura 3** Mapa de preferência externo (MPE) obtido a partir dos termos sensoriais do questionário Check-all-that-apply (CATA) na matriz de correlação com impressão de impressão geral do consumidor para as amostras de mortadela. Q0: amostras controle; Q1: amostras elaboradas com 1% de quitosana; Q2: amostras com 2% de quitosana; e Q3: amostras com 3% de quitosana.



Os dois componentes principais do MPE explicaram 88,05% da variação dos dados e o modelo vetorial apresentou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9302. Das 100 pessoas que participaram do estudo, apenas 49 identificaram diferenças significativas entre as características das amostras. Ng et al. (2013) destacaram, ao estudarem a metodologia CATA, que os atributos da metodologia estavam correlacionados com os resultados da escala hedônica, mas observaram que as medidas emocionais foram capazes de fornecer maior diferenciação do produto em comparação às respostas hedônicas, assim como observado neste estudo.

A amostra controle (Q0) foi a que os provadores utilizaram o maior número de termos para descrever. Como observado no MPI, essa amostra foi relacionada a menores escores para os atributos sabor, textura e impressão global no teste de aceitação. Isto pode ter ocorrido, provavelmente, pela percepção de uma “aparência de textura grosseira”, que foi amplamente registrada pelos provadores. Além da textura

grosseira, outros termos mais influentes foram “cor rosa clara”, “sabor de carne”, “sabor salgado”, “sabor residual de gordura”, “gosto de ranço” e “presença de gordura aparente”.

A grande dispersão observada no gráfico MPE (Figura 2) ilustra que a percepção dos provadores foi bastante heterogênea, uma vez que os termos estão espalhados em todas as direções (Giacalone et al., 2013). Entretanto, é interessante notar que o termo sensorial “sabor característico de mortadela”, que deveria estar mais relacionado à mortadela controle, encontra-se no polo oposto a esta amostra. Além disso, este termo encontra-se, notadamente, mais próximo às mortadelas contendo as maiores concentrações de quitosana, o que reforça uma provável preferência pelas mortadelas contendo esta fibra alimentar.

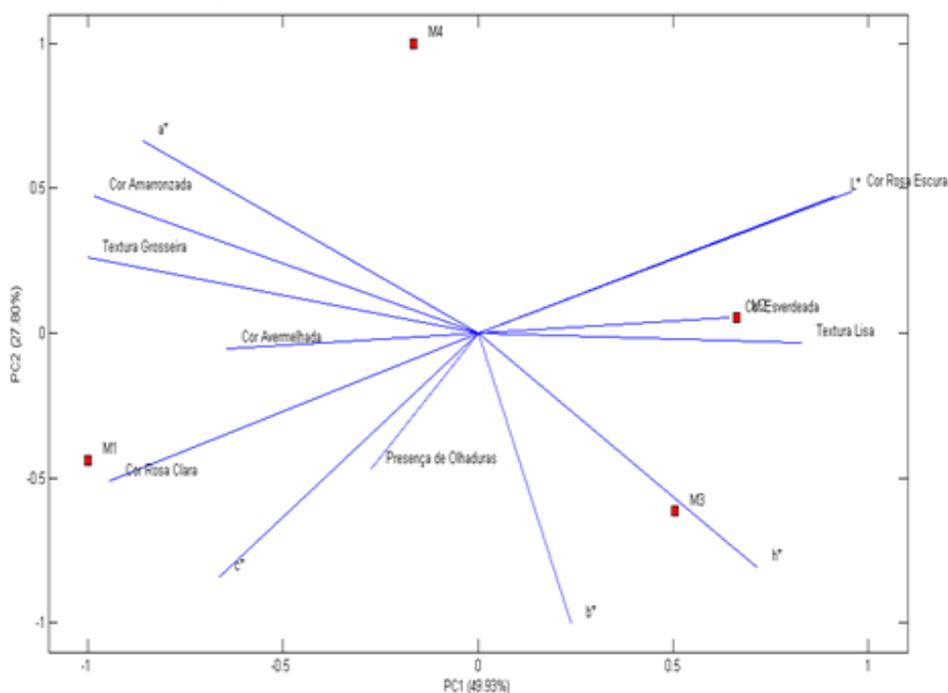
A “textura fibrosa” e o “sabor condimentado” foram parâmetros relacionados com a amostra com maior teor de quitosana (Q3). Uma vez que na mortadela controle o atributo “sabor salgado” é expressivo, é plausível que a presença da quitosana tenha amenizado a percepção do sabor salgado, substituindo-o por uma percepção de condimentação.

Os atributos cor e textura são extremamente importantes para a aceitação de produtos alimentícios pelos consumidores. Desta forma, com a intenção de proporcionar uma melhor visualização dos resultados, uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada com os dados das médias dos resultados dos comportamentos objetivos e sensoriais dos parâmetros de aparência e textura.

Para a cor, os componentes principais explicaram 77.73% dos dados (Figura 4), sendo possível distinguir três grupos: o primeiro formado pela amostra controle (Q0); o segundo pelas amostras Q1 e Q2; e o terceiro pela amostra contendo maior teor de quitosana (Q3). Em produtos cárneos a luminosidade ( $L^*$ ) parece ser o parâmetro mais informativo para alterações de cor (Bellingrath; Slide, 1985), mas o índice  $a^*$  é um parâmetro de cor mais sensível na caracterização da cor vermelha e na sua estabilidade (Ramos e Gomide, 2007). A maior concentração de quitosana

apresentou maior luminosidade ( $L^*$ ), maior índice de vermelho ( $a^*$ ) e menor índice de amarelo ( $b^*$ ). Sendo os termos mais utilizados para descrever esta amostra “cor rosa escuro”, “cor amarronzada” e “cor avermelhada”. Fato semelhante foi observado por Youn et al. (1999), em seu trabalho, quando adicionaram quitosana em salsichas produzidas com carne bovina constataram que a cor vermelha foi intensificada. Sendo assim, a adição de 3% de quitosana parece ter contribuído positivamente para a aceitação de Q3.

**Figura 4** Análise de componentes principais (PCA) das médias da análise instrumental de cor (CIELAB) e dos termos sensoriais para a cor do questionário Check-all-that-apply (CATA) para as amostras de mortadela. Q0: amostras controle; Q1: amostras elaboradas com 1% de quitosana; Q2: amostras com 2% de quitosana; e Q3: amostras com 3% de quitosana..  $L^*$ : luminosidade;  $a^*$ : índice de cor vermelha;  $b^*$ : índice de cor amarela;  $C^*$ : índice de saturação;  $h^*$ : ângulo de tonalidade.

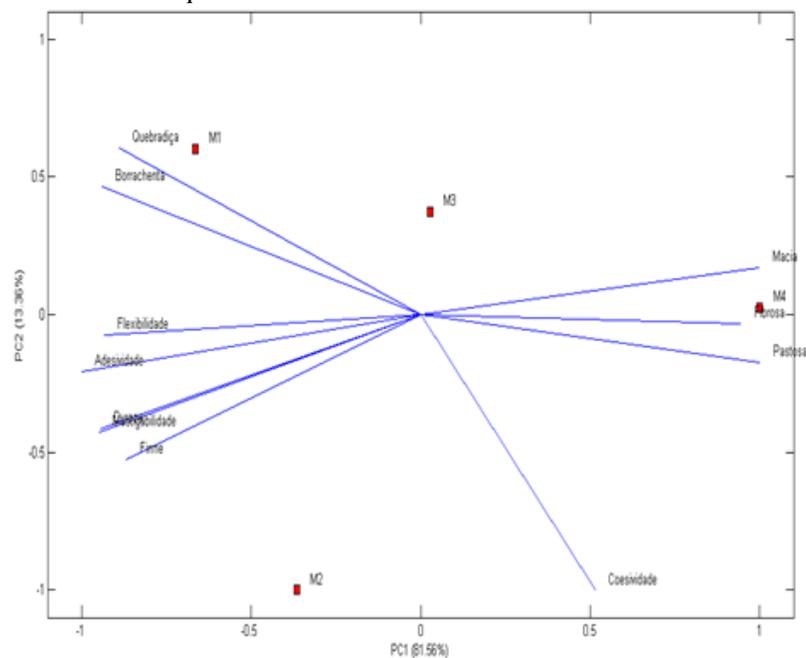


Por outro lado, foram verificados menores valores de índice de saturação e tonalidade para M4. Porém, devido à pequena variação (Tabela 2) dos parâmetros citados estes índices não influenciaram na cor da mortadela contendo maior concentração de quitosana.

É importante ressaltar que durante o estudo não foi informado aos provadores que se tratava de amostras fontes de fibras. Com isso, este fator não interferiu na provável escolha quanto à cor da mortadela Q3.

Com relação à textura das amostras seus componentes principais explicam 94.92% dos dados, sendo possível observar coerência entre o perfil instrumental e a percepção dos provadores (Figura 5).

**Figura 5** Análise de componentes principais (PCA) das médias da análise perfil de textura (TPA) e dos termos sensoriais para a textura do questionário Check-all-that-apply (CATA) para as amostras de mortadela. Q0: amostras controle; Q1: amostras elaboradas com 1% de quitosana; Q2: amostras com 2% de quitosana; e Q3: amostras com 3% de quitosana.



Os parâmetros flexibilidade, adesividade e dureza exibem uma forte correlação com as amostras M1 e M2 apresentando-se coerente com os termos “textura borrachenta”, “textura quebradiça” e “textura firme”, percebida pelos provadores.

A maior quantidade de quitosana adicionada à amostra M4 fez com que esta fosse relacionada pelos provadores aos termos “textura macia” e “textura pastosa”, estando coeso com a análise instrumental de textura (Tabela 2), onde foi verificado um menor valor para mastigabilidade. Parâmetro este que está relacionado ao menor tempo (segundos) requerido para mastigar uma amostra, a uma velocidade constante de aplicação de força, para reduzi-la a uma consistência adequada para a deglutição (Meilgaard et al., 1999).

A presença das fibras alimentares provavelmente foi sentida pelos provadores na mortadela contendo 3% de quitosana, onde o termo “textura fibrosa” esteve mais correlacionado.

#### **4 CONCLUSÃO**

Menores valores de atividade de água e maiores valores de pH, nitrito residual e índice de oxidação lipídica foram verificados na amostra Q3 (3% de quitosana.). As mortadelas contendo quitosana apresentam uma boa aceitação sensorial, notas contidas entre 6 (gostei ligeiramente) e 8 (gostei muito) para a impressão global do produto. O PARAFAC indicou como amostras mais aceitas as mortadelas Q2 e Q3, sugerindo que nosso controle (Q1) apresentou “cor rosa clara”, “sabor de carne”, “sabor salgado”, “sabor residual de gordura”, “gosto de ranço” e a amostra Q3 “sabor característico de mortadela”. Os resultados indicam viabilidade da adição de quitosana, nas concentrações testadas, em mortadelas.

#### **AGRADECIMENTOS**

A equipe agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

Anvisa (2013). IX Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. In: Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Alimentos+Com+Alegacoes+de+Propriedades+Funcionais+e+ou+de+Saude/Alegacoes+de+propriedade+funcional+aprovadas>>. Acessado em: 11/2015.

Anzaldúa-Morales A. (1994). La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Zaragoza: Acribia, 198p.

AOAC (2002). Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC international. 17. ed., Washington.

Ares, G., Barreiro, C., Deliza, R., Giménez, A., & Gámbaro A. (2010). Application of check-all-that-apply questions to the development of chocolate milk desserts. *Journal of Sensory Studies*, 25,67-86.

Ares, G., Varela, P., Rado, G., Giménez, A. (2011). Are consumer profiling techniques equivalent for some product categories? The case of orange-flavoured powdered drinks. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1600–1608.

Backers, T. & Noli, B. (1997). Dietary fibres for meat processing. *International Food Marketing and Technology* (December), 4–8.

Barreteau H.; Delattre C.; Michud P. (2006). Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 3, 323.

Brasil (1996). Ministério da Saúde. Resolução No 196/96. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brazilian Public. DOU 05/04/2000, 1. (pp. 6–10).

Brasil. Resolução n19, 30 de Abril. (1999). Regulamento Técnico para Procedimentos de Registro de Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua rotulagem. Diário Oficial da União.

Brasil (2000). Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa, N 4, de 31 de março de 2000. Aprova os Regulamentos técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. Brazilian Public. DOU 05/04/2000, 1. (pp. 6–10).

Brasil (2006). Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde – Brasília: Ministério da saúde, 2006.

Cáceres, E., García, M.L., & Selgas, M.D. (2008). Effect of pre-emulsified fish oil – as source of PUFA n–3 – on microstructure and sensory properties of mortadella, a Spanish bologna-type sausage. *Meat Science*, 80, 183–193.

Cassens, R. G. (1997). Residual nitrite in cured meat. *Food Technology* 51, 53-55.

Counsell, J. N., Hornig, D. H. (1981) Vitamin C (ascorbic acid). England: Applied Science, (Chapter 7).

Cummings, J.H.; Stephen, A.M. (2007). Carbohydrate terminology and classification. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61, S5–S18.

Damian, C.; Ribeirão, L. H; Francisco; A. Espírito Santo; L. M. P. Teixeira, E. (2005). Quitosana: um aminopolissacarídeo com características funcionais. *Alim. Nutr.*, 2,195-205.

Dutra, M. P. et al. (2009). Efeito da radiação gama na cor objetiva de mortadelas elaboradas com diferentes concentrações de nitrito. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 5., 2009, São Paulo. Anais... Campinas: ITAL/CTC, 2009. 1 CD ROM.

Fernández-Ginés, J. M., Fernández-López, J. M., Sayas-Basberá, M. E., Sendra, E., Pérez-Alvarez, J. A. (2004). Lemon albedo as a new source of dietary fiber: application to Bologna sausages. *Meat Science*, 67, 7-13.

Giacalone, D., Bredie, W.L.P., & Frøst, M.B. (2013). “All-In-One Test” (AI1): A rapid and easily applicable approach to consumer product testing. *Food Quality and Preference*, 27(2), 108–119.

Goosen, M. F. A. (1997). *Applications of chitin and chitosan*. Lancaster: Technomic, 336 p.

Jorge, E. C.; Mendes, A. C. G.;Auriema, B. E.; Cazedey, H. P.;Fontes, P. R.; Ramos, A. L. S.; Ramos, E. M. (2007). Application of a check-all-that-apply question for evaluating and characterizing meat products. *Meat Science*, 100, 124–133.

Kendall, C.W.C.; Esfahani, A.; Jenkins, D.J.A. (2010). The link between dietary fibre and human health. *Food Hydrocolloids*, 24, 42-48.

Liu, N., Chen, X.G., Park, H.J., Liu, C.G., Liu, C.S., Meng, X.H., Yu, L.J. (2006). Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers* 64, 60-65.

Mathur, N. K.; Narang, C. K. (1990). Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical Education*, 67, 938-942.

Meilgaard, M., Civille, G. V., Carr, B. T. (1999). *Descriptive analysis technique*. In: *Sensory evaluation techniques*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 3, 187- 200.

Moraes, F. P.; Colla, L. (2006). Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3, 109-122.

Mudgil, D.; Barak, S. (2013). Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 1-6.

Muzzarelli, R. A. A.; Rocchetti, R. (1986). The determination of the degree of acetylation of chitosan by spectrophotometry. In: MUZZARELLI, R.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G. W. (Ed.). *Chitin in nature and technology*. New York: Plenum Press.

Ng, M., Chaya, C., & Hort, J. (2013). Beyond liking: Comparing the measurement of emotional response using EsSense Profile and consumer defined check-all-that-apply methodologies. *Food Quality and Preference*, 28(1), 193–205.

Nunes, C.A., Bastos, S.C., Pinheiro, A.C.M., Pimenta, C.J., & Pimenta, M.E.S.G. (2012). Relating consumer acceptance to descriptive attributes by three-way external preference mapping obtained by parallel factor analysis (Parafac). *Journal of Sensory Studies*, 27, 209–216.

Nunes, C.A., Pinheiro, A.C.M., & Bastos, S.C. (2011). Evaluating consumer acceptance tests by three-way internal preference mapping obtained by parallel factor analysis (Parafac). *Journal of Sensory Studies*, 26, 167–174.

Pereira, A. A. et al. (2008). Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, 32, 887-893.

Raharjo, S.; Sofos, J. N.; Schmidt, G. R. (1993). Improved Speed, Specificity, and Limit of Determination of an Aqueous Acid Extraction Thiobarbituric Acid-C18 Method for Measuring Lipid Peroxidation in Beef. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2182-2185.

Ramos, E.M.; Gomide, L.A.M. (2007). Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologia. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 69-72.

Robertson, J.A. (1998). Application of plant-based byproducts as fiber supplements in processed foods. *Recent Research Development in Agricultural & Food Chemistry*, 2, 705-717.

Sposito, A. C. et al. (2007). IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 88, 2-19.

Synowiecki, J., Al-khateed, N. A. (2003). Production, properties and some new applications of chitin and its derivatives». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 4,145-231.

Tharanathan, R. N., Kittur, F. S. (2003). Chitin - the undisputed biomolecule of great potential. *Food Science and Nutrition*, 43, 61-87.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J.A. (2011). Effect of packaging conditions on shelf-life of mortadella made with citrus fibre washingwater and thyme or rosemary essential oil. *Food and Nutrition Sciences*, 02(01), 1–10.

Youn, S.K., Park, S.M., Kim, Y.J., Ahn, D.H. (1999). Effect on storage property and quality in meat sausage by added chitosan. *Journal of Chitin and Chitosan* 4 (4), 189-195.

**ARTIGO 3**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro* E *in situ* DE  
ANTIMICROBIANOS NATURAIS SOBRE *Listeria monocytogenes***

Artigo redigido conforme a norma da revista International Journal Microbiology  
“Versão Preliminar”

## RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito sinérgico de quitosana e óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, com redução de nitrito de sódio sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 inoculados em mortadela, bem como sua atividade sobre a oxidação lipídica do produto. A análise quantitativa do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* foi realizada utilizando-se cromatógrafo gasoso Shimadzu CG. A quitosana foi incorporada ao meio de cultura BHI acrescido de 0,6% de extrato de levedura em diferentes concentrações para avaliação da concentração mínima bactericida desta contra a *Listeria monocytogenes*. A concentração mínima bactericida do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* foi determinada empregando-se a técnica de diluição em caldo. Para cada tratamento foi fabricado 1,0 Kg de mortadela, sendo 500 gramas destinadas às análises microbiológicas, enumeração de *Listeria monocytogenes*, e 500 gramas destinadas às análises físico-químicas, pH, Eh, Aw, nitrito residual e oxidação lipídica. As análises foram realizadas nos tempos: 0, após 24h do processamento, e 30 dias de armazenamento. A influência dos níveis de quitosana e de óleo essencial nas mortadelas foi avaliada por meio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). O composto majoritário do óleo em estudo foi o eugenol, com 83,52%. A CMB para a *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 foi de 1% de quitosana (densidade de 0,30 g/mL, grau de desacetilação >85,0%). O óleo essencial de *Syzygium aromaticum* apresentou CMB de 0,3%. A concentração de quitosana influenciou os valores do pH para as mortadelas em estudo, tanto no primeiro dia de armazenamento quanto após os trinta dias. Onde, observou-se que quanto maior a concentração de quitosana presente nas amostras maiores os valores do pH. O Eh e a Aw não apresentaram diferenças significativas nos diferentes tratamentos. Para o nitrito residual observou-se, claramente, uma menor redução da concentração quando em maiores concentrações de quitosana. Pode-se observar que as maiores concentrações do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* apresentou ação antioxidante, na análise de TBARs. As maiores concentrações de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e quitosana influenciaram a contagem de *Listeria monocytogenes* dos tratamentos, tanto no primeiro dia de armazenamento quanto após os trinta dias. Constatando-se uma atividade antimicrobiana dos antimicrobianos naturais sobre a bactéria em estudo. Portanto, constata-se que a adição dos antimicrobianos naturais estudados apresentaram efeitos positivos, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

**Palavras-chave:** Óleo essencial de cravo-da-índia; Quitosana; Mortadela.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the synergistic effect of chitosan and essential oil of *Syzygium aromaticum*, with reduction of sodium nitrite on *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 inoculated in mortadella and its activity on the lipid oxidation product. The quantitative analysis of *Syzygium aromaticum* essential oil was performed using a Shimadzu CG gas chromatograph. The chitosan was incorporated into a BHI culture medium added with 0.6% yeast extract in different concentrations to evaluate the minimum bactericidal concentration against *Listeria monocytogenes*. The minimum bactericidal concentration of the *Syzygium aromaticum* essential oil was determined employing the broth dilution technique. For each treatment it was made 1.0 kg of mortadella, where 500 grams were for microbiological analysis, counting of *Listeria monocytogenes*, and 500 grams were intended for physical and chemical analysis, pH, Eh, Aw, residual nitrite and lipid oxidation. Analyzes were performed at the following times: 0, 24 after the processing and 30 days of storage. The influence of chitosan levels and essential oil in mortadella was assessed by Central Composite Design (CCD). The major compound in the studied oil was eugenol, with 83.52%. The MBC for *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 was 1% chitosan (density 0.30 g / ml, degree of deacetylation > 85.0%). The essential oil of *Syzygium aromaticum* presented MBC of 0.3%. The concentration of chitosan influenced the pH values for the studied mortadella, both on the first day of storage and after thirty days. Where it was observed that the higher the concentration of chitosan in samples, the higher the pH values. The Eh and Aw had no significant differences in the different treatments. For residual nitrite was clearly observed a smaller reduction of the residual nitrite concentration when in higher concentrations of chitosan. It could be seen that the highest essential oil concentrations of *Syzygium aromaticum* presented antioxidant activity in the TBARS analysis. The highest concentrations of essential oil of *Syzygium aromaticum* and chitosan influenced the counting of *Listeria monocytogenes* in the treatments, both in the first day of storage as after thirty days. Noting that there is a antimicrobial activity of natural antimicrobials on the studied. Therefore, it appears that the addition of the studied natural antimicrobial showed positive effects, antioxidant and antimicrobial activity.

**Keywords:** Indian clove essential oil; chitosan; mortadella.

## 1 INTRODUÇÃO

A atual demanda no mundo pelo uso de aditivos de origem natural traz consigo a necessidade destes serem estudados. Na literatura, a quitosana e os óleos essenciais são muito estudados quanto à sua atividade bactericida, porém, os estudos, na grande maioria das vezes, são *in vitro*. Assim, nota-se a carência de pesquisas na área de conservação de alimentos utilizando óleos já comprovadamente bactericidas e também a combinação desses óleos essenciais com outros antimicrobianos naturais, como, por exemplo, quitosana.

A quitosana é composta de vários derivados provenientes da N-desacetilação da quitina, sendo um polímero linear, natural, insolúvel, que apresenta  $\beta$ -1,4 N- acetilglucosamina como unidade monomérica e, com exceção da celulose, é o polissacarídeo mais abundante e largamente distribuído na natureza, servindo como elemento estrutural, e encontrado especialmente em animais invertebrados e na parede celular de fungos (Franco et al., 2005). Esta fibra alimentar apresenta propriedades tecnológicas e fisiológicas úteis em alimentos. A falta de toxicidade e alergenicidade, sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade a faz uma substância muito atraente para diversas aplicações no processamento de alimentos (Bostan; Isinmahan, 2011).

Já os óleos essenciais são frações líquidas, voláteis e odoríferas obtidas a partir do metabolismo secundário de espécimes vegetais; apresentam propriedades biológicas comprovadas, como atividade antioxidante e antimicrobiana. São misturas naturais complexas que podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações variáveis. São caracterizados por dois ou três compostos majoritários presentes em concentrações relativamente elevadas (20-70%) existindo outros componentes presentes em concentrações vestigiais (traços) (Bakkali et al., 2008). Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres,

óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre (Simões et al., 2007).

Outro fato relevante, na utilização de quitosana e óleos essenciais, é a possibilidade de redução da concentração utilizada de nitrito/nitrato, fato altamente desejável pela comunidade científica e pelo consumidor. Essa possibilidade advém do possível sinergismo que a quitosana e os óleos essenciais podem possuir juntamente com o nitrito/nitrato. Um produto cárneo curado de interesse para o estudo da substituição parcial ou total do nitrito e nitrato é a mortadela, uma vez que, esse produto cárneo é muito consumido e apreciado por pessoas de diferentes classes sociais e, também, apresenta grande possibilidade de crescimento de microrganismos patogênicos, como é o caso do *Listeria monocytogenes*. Esta bactéria, mesmo não sendo esporulada, apresenta destacável resistência e suporta os efeitos deletérios do congelamento, desidratação, acidez e calor, além de se desenvolver em ambientes com baixas tensões de oxigênio, devido à sua característica microaerófila. Além de ser um microrganismo psicrotrófico (Sakate et al., 2003).

Ao analisar a dose necessária de um aditivo como nitrito a ser adicionada a um alimento, verifica-se que sua concentração dependerá da sua finalidade, sendo que seu emprego em produtos cárneos varia entre 30 e 50 ppm para o desenvolvimento de cor, entre 20 e 40 ppm para desenvolvimento de aroma, entre 80 e 150 ppm para o efeito conservante, e entre níveis de 20 e 50 ppm para o efeito antioxidante. É válido salientar, que os altos níveis desse aditivo têm como foco principal a conservação do alimento, uma vez que para a reestruturação da cor e aroma, são necessários no máximo 50 ppm (Lucke, 2000).

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito sinérgico de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, com redução de nitrito de sódio sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 inoculada em mortadela, bem como sua atividade sobre a oxidação lipídica do produto.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Tecnologia de Carnes e Derivados do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) e no Laboratório de Fitoquímica do Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A carne de acém bovino e o toucinho utilizados na formulação foram adquiridos em comércio de Lavras, MG. A quitosana (densidade de 0,30 g/mL, grau de desacetilação >85,0%) foi adquirida da empresa Polymar (Fortaleza, CE). Os óleos essenciais da empresa FERQUIMA. A bactéria, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, foi cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

### 2.1 Padronização, estocagem e preparo dos inóculos das células vegetativas

A reativação da cepa foi realizada inoculando-se 10 mL de cada cultura em tubos contendo 10 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) HIMEDIA® acrescido de 0,6% de extrato de levedura HIMEDIA® e incubados a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, o procedimento anterior foi repetido, para uma segunda ativação das células. A cada nova reativação da cultura, sua pureza era verificada por meio de crescimento em meio seletivo e diferencial Oxford e Palcam, coloração de Gram e testes bioquímicos, como: fermentação de carboidratos, motilidade, catalase, verificação de hemólise segundo recomendações do Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods da AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (Labbe, 2001).

A padronização foi realizada por meio da elaboração de curva de crescimento; o desenvolvimento do microrganismo, em meio de cultivo caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Brain Heart Infusion) HIMEDIA® acrescido de

0,6% de extrato de levedura HIMEDIA®, foi monitorado por espectrometria através da evolução da densidade ótica a 600nm e contagem direta em placas contendo Ágar BHI HIMEDIA® acrescido de 0,6% de extrato de levedura HIMEDIA®. Sendo padronizado para a execução de todo o experimento tanto *in vitro* quanto no produto cárneo uma população de  $10^5$  UFC/mL ou grama de *Listeria monocytogenes*.

## **2.2 Avaliação quantitativa dos constituintes do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (Cravo-da-índia)**

A análise quantitativa do óleo essencial de cravo-da-índia foi realizada no Laboratório de Fitoquímica, utilizando-se cromatógrafo gasoso Shimadzu CG – 17ª equipado com detector por ionização de chamas (DIC), nas seguintes condições experimentais: coluna capilar DB5; programação da coluna: temperatura inicial de 40°C até 240°C; temperatura do injetor: 220°C; temperatura de detector: 240°C; gás carreador: nitrogênio ( $2,2 \text{ mL min}^{-1}$ ); taxa de split 1:10; volume injetado: 1µL (1% de solução em diclorometano) e pressão na coluna de 115 KPa, sendo a quantificação de cada constituinte obtida por meio de normalização de áreas (%).

## **2.3 Concentração mínima bactericida (CMB) da quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia sobre a *Listeria monocytogenes in vitro***

A quitosana foi incorporada ao meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) HIMEDIA® acrescido de 0,6% de extrato de levedura HIMEDIA® em diferentes concentrações para avaliação da concentração mínima inibitória da quitosana contra a *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, onde, esta bactéria era inoculada na população de  $10^5$  UFC/mL. Sendo as concentrações utilizadas

variando de 0 a 3%, com intervalos de 0,5 a 0,5%. A concentração mínima bactericida (CMB) foi definida como a menor concentração necessária para prevenir completamente o crescimento bacteriano visível. Placas de controle sem quitosana foram utilizadas para o controle. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas.

A concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de cravo-da-índia foi determinada empregando-se a técnica de diluição em caldo (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003). Preparou-se o caldo BHI acrescido de 0,6% de extrato de levedura e de 0,5% de Tween 80 para a diluição dos óleos essenciais. As concentrações utilizadas do óleo foram de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0%. Alíquotas de 30 µL de células vegetativas padronizadas de *Listeria monocytogenes* foram transferidas para tubos homogeneizados contendo 5 mL de caldo preparado, acrescidos das diferentes concentrações de óleos essenciais. Foi realizado o controle positivo, tubos contendo caldo BHI acrescido de 0,6% de extrato de levedura. Os tubos foram incubados em condições aeróbias a temperatura de 37°C por 24 horas.

Decorrido esse período, realizou-se o plaqueamento de 100 µL da cultura em Ágar Oxford, o plaqueamento foi realizado em três repetições e em triplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, passado esse período a concentração bactericida foi determinada. Foram consideradas CMB dos óleos essenciais àquelas onde não se observaram crescimento nas placas.

## **2.4 Elaboração das mortadelas**

A elaboração das mortadelas foi baseada na formulação descrita por Dutra (2009), sendo adicionados diferentes níveis de quitosana e óleos essenciais. A massa cárnea das mortadelas foi formulada com 58% de acém bovino e 14% de

toucinho suíno. Os demais ingredientes da formulação foram: água (20%); fécula de mandioca (5%); sal (2%); polifosfato de sódio (0,5%; Fosmax E-10, New Max Industrial Ltda); nitrito de sódio (75 ppm, Maxsoy Alimentos Ltda); e ácido ascórbico (0,5%; Fixamax C-202; New Max Industrial Ltda). Os ingredientes foram processados em cutter KJ-10 (Indústrias Jamar Ltda.; Tupã, SP, Brasil) e a massa embutida (gomos de  $\pm 400\text{g}$ ) em tripa artificial de poliamida (STARTRIP® Z-R, SCHUR Equipamentos e Embalagens; Barueri, SP, Brasil) de 67 mm diâmetro. Os gomos foram cozidos por imersão em água até temperatura interna de  $73^{\circ}\text{C}$  (acompanhada pela inserção de um termopar no centro da massa), quando as mortadelas foram removidas, resfriadas e estocadas em câmara fria ( $4^{\circ}\text{C}$ ) por 24 horas.

## 2.5 Preparo das amostras

Para cada tratamento foi fabricado 1,0 Kg de mortadela, sendo 500 gramas destinadas às análises microbiológicas e 500 gramas destinadas às análises físico-químicas. As análises foram realizadas nos tempos: 0, após 24h do processamento, e 30 dias de armazenamento.

As amostras destinadas as análises microbiológicas foram inoculadas com *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 na concentração final de  $10^5$  UFC/g, logo após a etapa de cozimento da mortadela. O microrganismo foi inoculado e homogeneizado com o produto. As mortadelas foram incubadas à  $7^{\circ}\text{C}$  por um período de 30 dias.

## 2.6 Caracterização das mortadelas

As mortadelas foram analisadas quanto ao pH, potencial de oxi-redução (Eh), atividade de água, nitrito residual e grau de oxidação. Uma porção da

mortadela foi homogeneizada (tritador Turrtec Te102; TECNAL Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, SP, Brasil) em 10 porções de água destilada e o pH e o potencial de oxi-redução imediatamente medidos por um eletrodo combinado de bulbo vidro acoplado a um pHmetro DM 20 (Digimed, São Paulo, Brasil). A atividade de água das amostras trituradas foi determinada em aparelho Aqualab CX2 (Decagon Devices Inc., WA, USA). O teor residual de nitrito nos produtos elaborados foi quantificado segundo método oficial no. 973.31 da Association of Official Analytical Chemists - AOAC (2002). O grau de oxidação lipídica foi determinado usando o teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBAR), segundo metodologia descrita por Raharjo et al. (1992). A concentração do malonaldeído (MDA) foi determinada por curva analítica de 1.1,3.3-tetraethoxypropane (TEP) e os resultados de TBARS expressos como mg MDA.kg<sup>-1</sup> de amostra.

## **2.7 Enumeração de *Listeria monocytogenes* nas mortadelas**

Para enumeração de *Listeria monocytogenes* foi utilizada a metodologia tradicional da FDA (Food and Drug Administration), descrita por HITCHINS (2003), com pequenas modificações, para as mortadelas inteiras. As embalagens das mortadelas foram abertas de forma asséptica, 25g das amostras foram homogeneizadas em 225mL água peptonada 0,1% m/v em homogeneizador Stomacher Metroterm® (490 golpes/min) por três minutos. Após diluições seriadas decimais em água peptonada 0,1%, alíquotas de 100µL serão semeadas por superfície em Ágar Oxford. As análises foram realizadas em triplicata e as placas serão incubadas a 37°C/24h.

## 2.8 Análises estatísticas

A influência dos níveis de quitosana e de óleos essenciais nas mortadelas foi avaliada por meio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), segundo Rodrigues e Iemma (2005), para duas variáveis independentes em um esquema fatorial  $2^2$ , com as seguintes concentrações:

- a) 0,3 a 4,6 % de quitosana; e
- b) 0,018 a 0,582 % de óleo essencial de cravo-da-índia.
- c) 75 ppm nitrito

O DCCR foi composto por 8 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios. Os dois fatores independentes foram investigados em cinco diferentes níveis (-1,41; -1; 0; +1 e +1,41), dispostos na Tabela 1.

**Tabela 1** Delineamento fatorial completo para mortadelas contendo quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	X1	X2	Óleo	Quitosana
1	-1	-1	0,1	1
2	1	-1	0,5	1
3	-1	1	0,1	4
4	1	1	0,5	4
5	-1.41	0	0,018	2,5
6	1.41	1	0,582	2,5
7	0	-1.41	0,3	0,3
8	0	1.41	0,3	4,6
9	0	0	0,3	2,5
10	0	0	0,3	2,5
11	0	0	0,3	2,5

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização química do óleo essencial

Madagascar e Indonésia são os principais produtores de cravo-da-índia. No Brasil, a planta é conhecida como craveiro, craveiro-da-índia e cravo. O craveiro é uma planta arbórea, perene e atinge 10 metros de altura. A copa é bem verde, de formato piramidal. As folhas são ovais, persistentes e de coloração verde brilhante. As flores brancas, são agrupadas em inflorescência do tipo cacho e seus botões são colhidos quando sua cor muda de verde para carmim, posteriormente ocorre uma cuidadosa dessecação ao sol. O fruto é do tipo baga e de formato alongado. Desenvolvem-se em regiões de clima tropical e a propagação é feita por sementes, que preferem solos ricos em matéria orgânica e nutrientes, úmidos e bem drenados (Nagraes, 2003).

A composição química do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), bem como a quantificação dos constituintes estão representadas na tabela 2, onde o composto majoritário deste óleo foi o eugenol, com 83,52%.

**Tabela 2** Constituintes químicos do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e seus respectivos teores

Pico	Tr	Área	IRRExp	Identificação
1	22.006	83.52	1361	Eugenol
2	24.456	5.33	1418	E-Cariofileno
3	25.893	0.65	1451	$\alpha$ -Humuleno
4	29.129	9.70	1528	Acetato de Eugenila
5	31.227	0.71	1581	Óxido de cariofileno

Legenda: Tr tempo de retenção (min); IRRExp – índice experimental

Os óleos essenciais podem compreender em sua composição mais de sessenta componentes químicos individuais. Os constituintes majoritários podem representar mais de 85% desta fração, enquanto outros componentes estão presentes como constituinte traço (Burt, 2004).

Foram identificados 5 componentes químicos (99,91%) para óleo essencial de cravo-da-índia. Os componentes encontrados em maiores concentrações foram o eugenol (83,52%) e acetato de eugenila (9,70%), coincidindo com componentes químicos identificados por diversos autores (Robbers et al., 1997; Nascimento; Locatelli; Freitas, 2000; Mazzafera, 2003).

Segundo Robbers et al. (1997) o cravo-da-índia, espécie *Syzygium aromaticum*, da família *Myrtaceae*, tem seu óleo essencial obtido dos botões florais dessecados, o qual contém mais de 85%, por volume, de substâncias fenólicas totais, preponderando eugenol (70% a 95%), acetato de eugenila e  $\beta$ -cariofileno. É caracterizado como um líquido incolor ou amarelo-claro, classificado como aromatizante, e utilizado nos casos de dispepsia, bronquite e tratamentos dentários (Robbers et al., 1997).

O óleo essencial de cravo da índia está presente na planta em grande quantidade, entre 15 e 25% e é utilizado na culinária, nas indústrias de alimento e também na medicina, sua ação antimicrobiana é relatada frente a inúmeros microrganismos (Dorman; Deans, 2000).

De acordo com Mazzafera (2003), o óleo essencial de cravo-da-índia, apresentou os seguintes compostos: eugenol (75%), acetato de eugenila (15%) e  $\beta$ -cariofileno (10%). No estudo realizado por Pereira et al. (2008), o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou em sua constituição: eugenol (86,3%), trans-cariofileno (8,2), acetato de eugenila (3,6%) e  $\alpha$ -humuleno (0,8%). Segundo Oussalah et al. (2007), os constituintes do óleo essencial de cravo-da-índia foram: 78% de eugenol e 8% de acetato de eugenila.

### **3.2 Concentração Mínima Bactericida (CMB) da quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia sobre a *Listeria monocytogenes* in vitro**

A concentração mínima bactericida para a *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 foi de 1% de quitosana (densidade de 0,30 g/mL, grau de desacetilação >85,0%). Resultados diferentes foram reportados por Bento et al. (2009), em que o efeito de diferentes concentrações de quitosana de *Mucor rouxii* UCP 064 foram testadas para CMB sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, onde foi reportado uma CMB de 0,5%, tal dado pode ter se apresentado diferente devido à metodologia utilizada, uma vez que, estes autores utilizaram a diluição da quitosana em ácido acético a 1%. Em nosso trabalho, a intenção foi suprimir os ácidos fracos, a fim da eliminação de possíveis interferentes nos resultados.

Rhoades; Roller (2000) destacam que mesmo os valores de concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida da quitosana sendo considerados elevados em comparação com outros compostos antimicrobianos (por exemplo, óleos essenciais, compostos fenólicos, bacteriocinas), amplo espectro de atividade antimicrobiana e baixa toxicidade para as células de mamíferos torna um composto antimicrobiano promissor para ser aplicado em alimentos.

O óleo essencial de cravo-da-índia apresentou CMB de 0,3%. A concentração mínima bactericida é citada pela maioria dos pesquisadores como a medida do desempenho antimicrobiano dos óleos essenciais (Burt, 2004).

A atividade antibacteriana depende do tipo, composição e concentração da espécie ou do óleo essencial, a composição do substrato, o processamento e condições de estocagem e tipo do microrganismo em questão (Bertini et al., 2005). Considerando o número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, é muito provável que a sua atividade antimicrobiana não seja atribuível a um mecanismo específico, mas que existem vários alvos na célula, como as alterações da membrana citoplasmática, perturbações sobre a força próton

motriz, no fluxo de elétrons, no transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula. Nem todos esses mecanismos atingem alvos separados, podendo alguns ocorrer em consequência de outro mecanismo (Burt, 2004).

Em trabalho realizado por Salimena (2010), o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* foi o que obteve melhor resposta antimicrobiana dentre todos os óleos essenciais testados, orégano e basilicão, frente à *Listeria monocytogenes* com um MIC de 0,78%. Resultado este acima do encontrado no nosso trabalho, que foi de 0,3%.

A bactéria utilizada neste estudo, *Listeria monocytogenes*, é Gram positiva, o que pode facilitar a ação dos óleos, ou seja, há maior incorporação do aditivo na parede celular (Harpaz et al., 2003). Em estudo usando o mesmo teste realizado *in vitro*, Dorman & Deans (2000) utilizaram óleos essenciais de cravo-da-índia, orégano, gerânio e pimenta, para avaliar suas atividades sobre 25 espécies de bactérias Gram positivas e negativas. Esses autores observaram que bactérias Gram positivas realmente eram mais suscetíveis aos óleos essenciais estudados do que as Gram negativas. O óleo extraído da espécie *Syzygium aromaticum* apresentou significativa atividade antimicrobiana sobre as culturas reveladoras, apresentando halos inibitórios maiores em “slots” com concentrações menos diluídas. Craveiro (1981) atribui as excelentes propriedades do cravo-da-índia ao eugenol, componente majoritário encontrado em 80-90% do óleo essencial desta planta. O eugenol, principal constituinte químico dos óleos essenciais da espécie *S. aromaticum* (Oussalah et al., 2007), exhibe comprovadas atividades como antimicrobiano, antiinflamatório, anestésico, anti-séptico, antioxidante e repelente (Gobbo-Neto; Lopes, 2007).

### 3.3 Caracterização das mortadelas

Tanto no primeiro dia de armazenamento, ou seja, após 24 horas do processamento, quanto após 30 dias de armazenamento, os componentes linear e quadrático da quitosana afetaram significativamente ( $p < 0,10$ ) o pH das mortadelas (Tabela 3).

**Tabela 31** Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o pH em mortadela adicionada de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, no tempo zero e tempo trinta

Variáveis	pH Tempo 0		pH Tempo 30	
	CR	EP	CR	EP
Constante	6,415079***	0,050525	6,409536***	0,035931
(1) Óleo essencial de cravo-da-índia (linear)	-0,029598	0,033953	-0,002101	0,024146
Óleo essencial de cravo-da-índia (quadrática)	-0,013407	0,038252	-0,012233	0,027203
(2) Quitosana (linear)	0,196140***	0,030762	0,142591***	0,021877
Quitosana (quadrática)	0,109689***	0,038568	0,047260	0,027428
1 L by 2 L	-0,035229	0,040663	-0,002934	0,028918
R <sup>2</sup>	0,9079		0,9055	

\*\*\* $p < 0,10$ .

A partir do modelo ajustado para os coeficientes significativos (Tabela 4), foi possível construir a Superfície de Resposta das emulsões em função das concentrações de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia (Figura 1).

**Tabela 4** Modelo ajustado para os coeficientes significativos para o pH no tempo zero e tempo trinta

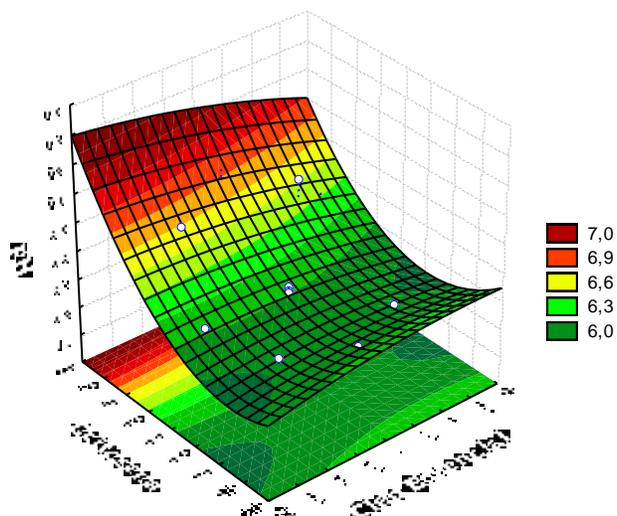
Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R <sup>2</sup>
pH Tempo 0	$Y=6,41 - 0,02x_1 - 0,01x_1^2 + 0,19x_2 + 0,10x_2^2 - 0,03x_1x_2$	0,01	0,9079
pH Tempo 30	$Y=6,40 - 0,004x_1 - 0,02x_1^2 + 0,28x_2 + 0,094x_2^2 - 0,005x_1x_2$	0,003	0,9055

X1= variável codificada para óleo essencial de cravo-da-índia; X2= variável codificada para quitosana.

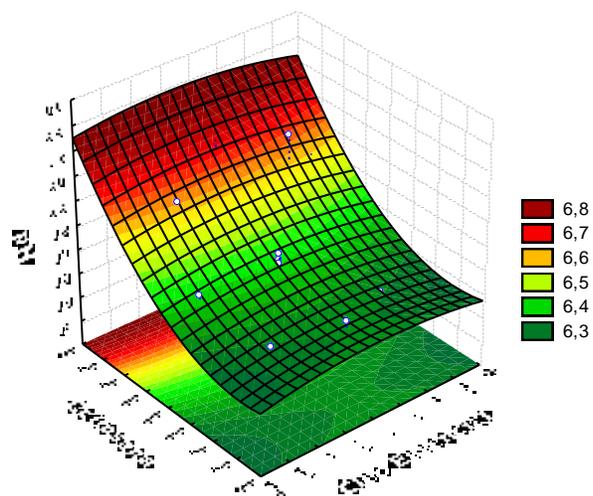
A concentração de quitosana influenciou os valores do pH para as mortadelas em estudo, tanto no primeiro dia de armazenamento quanto após os trinta dias (Figura 1A e 1B). Onde, observou-se que quanto maior a concentração de quitosana presente nas amostras maiores os valores do pH. Tal fato se deve, possivelmente, a quitosana ser fibra de origem animal derivada da quitina que se caracteriza por possuir grupos amínicos livres, solubilidade em soluções ácidas, insolubilidade em pH superior a 6,5, capacidade de formar soluções viscosas com formação de geleificação e de solubilizar-se em misturas de água e álcool (Muzzarelli; Rocchetti, 1986).

A concentração hidrogeniônica que determina o pH dos alimentos é fator de importância fundamental na limitação dos tipos de microrganismos capazes de se desenvolver no alimento, exercendo influência sobre o crescimento, a sobrevivência ou a destruição desses microrganismos (Silva, 2000). Neste trabalho, o pH das mortadelas ao longo do tempo, encontraram-se na faixa de 6,28 a 6,86, portanto as mortadelas em estudo podem ser consideradas como alimentos de baixa acidez ( $\text{pH} > 4,5$ ). Este pH é propício ao crescimento da grande maioria dos microrganismos patogênicos, inclusive a *Listeria monocytogenes* que cresce numa faixa de pH de 4,0 a 9,0. Portanto, é importante ressaltar a importância da tecnologia de barreiras e o controle da temperatura de refrigeração ao longo do armazenamento.

**Figura 1** Superfície de resposta para o pH das mortadelas acrescidas de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, armazenadas a 7 °C por 24 horas (A) e por 30 dias (B).



A



B

No tempo zero e após o período final de armazenamento das mortadelas, o modelo não pode ser ajustado para o potencial de oxi-redução (Eh) e para a atividade de água (Aw), não sendo, portanto, possível verificar a influência das variáveis em estudo sobre as amostras. Tal fato ocorreu, provavelmente, devido à baixa variação nos valores de Eh e Aw dentre os tratamentos. Onde, o Eh variou, ao longo do período de armazenamento de 26 a 49 mV, o Eh observado em todas as amostras analisadas foi positivo, onde o controle apresentou maiores valores. Quanto mais oxidada está uma substância, mais positivo é seu potencial elétrico, e microrganismos aeróbios necessitam de valores oxidantes de Eh para crescer (Jay, 2005). Já a atividade de água variou ao longo do tempo de 0,931 a 0,955, valores favoráveis ao crescimento de diversos microrganismos, inclusive da *Listeria monocytogenes*, uma vez que esta cresce a Aw superior a 0,90.

Quando verificados os resultados para nitrito residual ao longo do período de armazenamento, tanto para o Tempo 0, quanto para o tempo 30, o componente linear da quitosana afetou significativamente ( $p < 0,10$ ) o nitrito residual dos tratamentos (Tabela 5).

**Tabela 5** Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o nitrito residual em mortadela adicionada de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, no tempo zero e tempo trinta

Variáveis	Nitrito residual Tempo 0		Nitrito residual Tempo 30	
	CR	EP	CR	EP
Constante	29,22831***	2,413626	10,27518***	2,226260
(1) Óleo essencial de cravo-da-índia (linear)	-1,29206	1,621988	-1,39676	1,496075
Óleo essencial de cravo-da-índia (quadrática)	-0,02223	1,827336	-0,35377	1,685483
(2) Quitosana (linear)	4,56539***	1,469526	4,60790***	1,355448
Quitosana (quadrática)	3,73099	1,842443	3,11893	1,699417
1 L by 2 L	-1,09123	1,942517	-0,67966	1,791722
R <sup>2</sup>	0,7357		0,7503	

\*\*\* $p < 0,10$ .

A partir do modelo ajustado para os coeficientes significativos (Tabela 6), foi possível construir a Superfície de Resposta das emulsões em função das concentrações de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia (Figura 2).

**Tabela 6** Modelo ajustado para os coeficientes significativos para o nitrito residual no tempo zero e tempo trinta

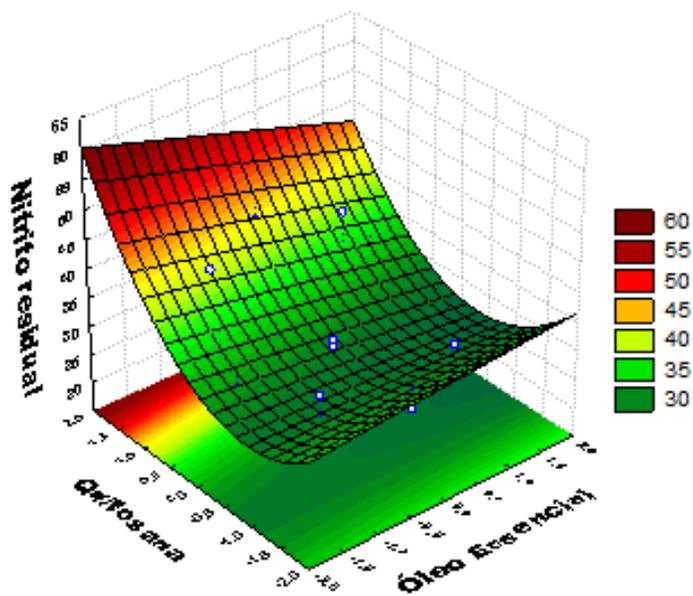
Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R <sup>2</sup>
Nitrito residual	$Y=29,22 - 1,29x_1 - 0,02x_1^2 + 4,56x_2 + 3,73x_2^2 - 1,09x_1x_2$	0,01	0,7357
Tempo 0			
Nitrito residual	$Y=10,27 - 1,39 x_1 - 0,35 x_1^2 + 4,60 x_2 + 3,11 x_2^2 - 0,67 x_1x_2$	0,01	0,7503
Tempo 30			

X1= variável codificada para óleo essencial de cravo-da-índia; X2= variável codificada para quitosana.

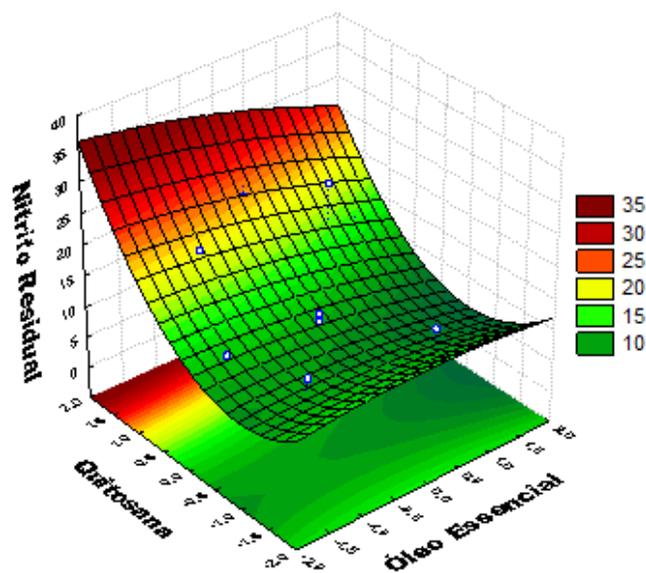
A queda nos valores de nitrito após ser adicionado em sistema cárneo ocorre devido à sua oxidação de, aproximadamente 1% a 10% para nitrato (NO<sub>3</sub>), e reações com a mioglobina (5% a 10%), com os grupos sulfidrilas das proteínas (5% a 15%), com gordura (1% a 5%), com proteína (20% a 30%) e cerca de 1% a 5% transformam-se em gás e se desprendem do produto (Cassens, 1997). Em consequência, essas reações complexas do nitrito podem contribuir para a variação na quantidade residual de nitrito em produtos cárneos. Fato este constatado neste estudo, na figura 2 (2A e 2B) observa-se, claramente, uma menor redução da concentração do nitrito residual quando em maiores concentrações de quitosana. Provavelmente, a quitosana ligou-se ao nitrito de forma que este reagiu menos e se perdeu menos.

A atividade sobre *Clostridium botulinum* do nitrito em carnes curadas é mais importante, em termos de saúde pública, do que para a cor e o desenvolvimento de sabor, atributos relacionados à aceitação do produto pelos consumidores. Para o desenvolvimento de cor e sabor, baixas dosagens, como 30 a 60 ppm, se mostram adequadas para diversos produtos cárneos. O efeito antibotulínico requer ao menos 120 ppm em bacon, presunto curado e em carne enlatada (Feiner, 2006). Esse é o motivo pelo qual as autoridades sanitárias de diversos países, entre eles o Brasil, permitem valores residuais máximos de 150 ppm em produtos curados. Devido à adição de antimicrobianos naturais, nossos tratamentos foram adicionados na fabricação de apenas 75 ppm de nitrito de sódio, com a finalidade da verificação do comportamento antimicrobiano.

**Figura 2** Superfície de resposta para o nitrito residual das mortadelas acrescidas de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, armazenadas a 7 °C por 24 horas (A) e por 30 dias (B).



A



B

A presença dos antimicrobianos naturais, óleo essencial de cravo-da-índia e quitosana, afetaram significativamente ( $p < 0,10$ ) o TBARs das mortadelas (Tabela 7). No primeiro dia de armazenamento, ou seja, após vinte e quatro horas do processamento, a variável significativa foi o óleo essencial linear. Já no decorrer dos 30 dias de armazenamento os componentes óleo essencial linear e quitosana linear e quadrática afetaram a oxidação lipídica dos tratamentos.

**Tabela 7** Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o TBARs em mortadela adicionada de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, no tempo zero e tempo trinta

Variáveis	TBARs Tempo 0		TBARs Tempo 30	
	CR	EP	CR	EP
Constante	1,189696***	0,066387	0,642374***	0,022194
(1) Óleo essencial de cravo-da-índia (linear)	-0,124608***	0,044613	-0,077034***	0,014915
Óleo essencial de cravo-da-índia (quadrática)	-0,086536	0,050261	0,006118	0,016803
(2) Quitosana (linear)	-0,093844	0,040419	-0,060701***	0,013513
Quitosana (quadrática)	-0,093559	0,050677	0,107699***	0,016942
1 L by 2 L	0,122975	0,053429	0,018425	0,017862
R <sup>2</sup>	0,83		0,9430	

\*\*\* $p < 0,10$ .

A partir do modelo ajustado para os coeficientes significativos (Tabela 8), foi possível construir a Superfície de Resposta das emulsões em função das concentrações de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia (Figura 3).

**Tabela 8** Modelo ajustado para os coeficientes significativos para o pH no tempo zero e tempo trinta

Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R <sup>2</sup>
TBARs Tempo 0	$Y=1,18 - 0,12x_1 - 0,08x_1^2 - 0,09x_2 - 0,09x_2^2 + 0,12x_1x_2$	0,13	0,83
TBARs Tempo 30	$Y=0,64 - 0,07x_1 - 0,006x_1^2 - 0,06x_2 + 0,10x_2^2 - 0,01x_1x_2$	0,001	0,9430

X1= variável codificada para óleo essencial de cravo-da-índia; X2= variável codificada para quitosana.

Quanto a oxidação lipídica para o tempo 0, apenas o óleo essencial apresentou-se significativo, ou seja, apenas esta variável afetou significativamente o TBARs dos tratamentos (Figura 3A). Pode-se observar que as maiores concentrações do óleo essencial de cravo-da-índia apresentou ação antioxidante.

Os compostos responsáveis pela atividade antioxidante de alguns óleos essenciais são principalmente aqueles que possuem um ou mais grupos hidroxila (-OH), ou metoxila (-CH3O) ligados ao anel aromático, insaturações e elétrons para serem doados provendo assim a inativação dos radicais livres (Carvalho, 2004).

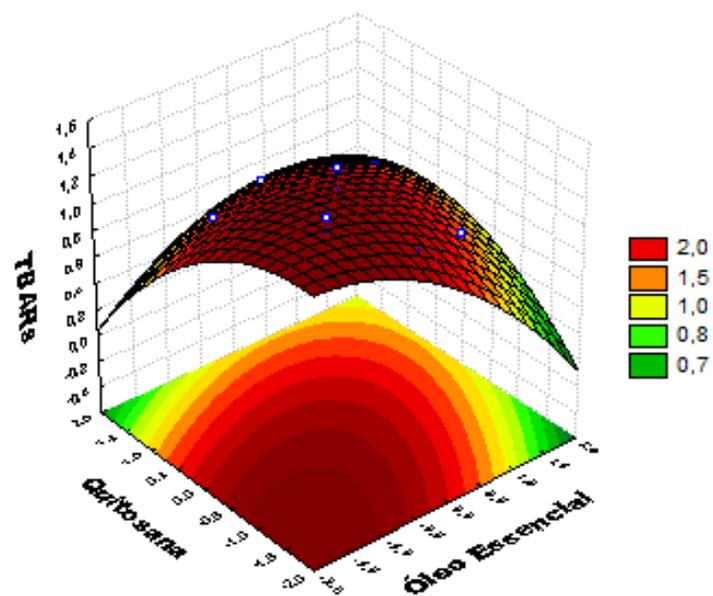
Em condimentos, ervas e seus óleos essenciais podem ser encontrados diferentes compostos antioxidantes; no cravo-da-índia é possível encontrar galatos, biflorina, isômeros de eugenol, acetato de eugenila (Lee; Shibamoto, 2001); em alecrim e salvia encontra-se carnosol, ácido carnósico, rosmanol, rosmaridifenol, rosmadial, rosmariquinona, ésteres de etil e metil (Pizzale et al., 2002) e em óregano carvacrol e isômeros monoterpênicos fenólicos timol (Peter, 2000).

Contudo, analisando ainda a Figura 3A, constata-se que maiores concentrações de quitosana também reduziram o TBARs, mesmo este não

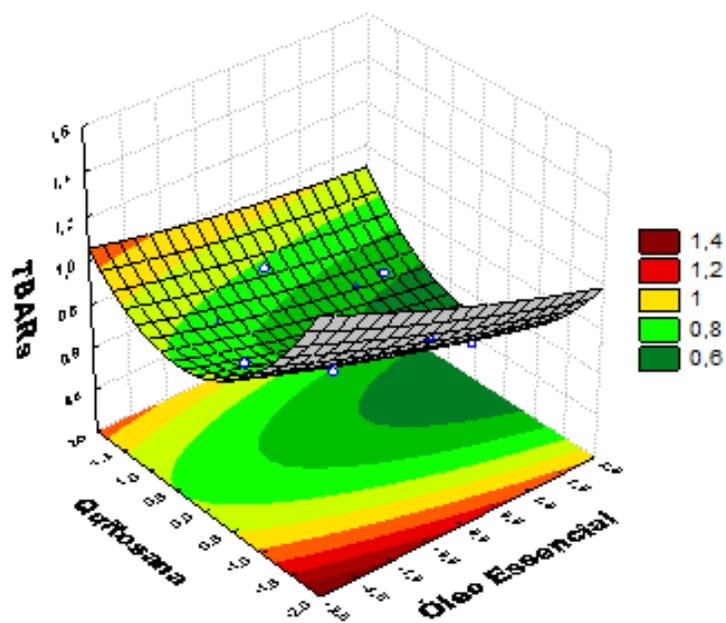
apresentando-se significativo. O mecanismo de ação antioxidante da quitosana em produtos cárneos é atribuído à sua capacidade de quelar íons metálicos, tais como o ferro, ligado às moléculas de hemoglobina e mioglobina, o qual age como catalisador desta reação (Kamil et al., 2002; Barreteau et al., 2006).

Conhecendo a atividade antioxidante dos antimicrobianos naturais em estudo e analisando a Figura 3B, onde ambos afetaram significativamente o TBARs dos tratamentos, verifica-se que ao longo do período de armazenamento predominou-se a atividade antioxidante do óleo essencial de cravo-da-índia nas maiores concentrações, porém, para atividade máxima antioxidante da combinação de ambas as variáveis, os melhores resultados apresentaram-se quando a quitosana encontrava-se nas concentrações médias e não máximas como observada na Figura 3A.

**Figura 3** Superfície de resposta para o TBARs das mortadelas acrescidas de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, armazenadas a 7 °C por 24 horas (A) e por 30 dias (B).



A



B

### 3.4 Enumeração de *Listeria monocytogenes* nas mortadelas

A presença dos antimicrobianos naturais, óleo essencial de cravo-da-índia e quitosana, afetaram significativamente ( $p < 0,10$ ) a contagem da *Listeria monocytogenes* das mortadelas (Tabela 9). No primeiro dia de armazenamento, as variáveis significativas foram o óleo essencial linear, a quitosana linear e a interação entre eles. Já no decorrer dos 30 dias de armazenamento os componentes óleo essencial linear e quitosana linear influenciaram a enumeração do microrganismo alvo nos tratamentos.

**Tabela 9** Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para a enumeração de *Listeria monocytogenes* em mortadela adicionada de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, no tempo zero e tempo trinta

Variáveis	<i>Listeria monocytogenes</i> Tempo 0		<i>Listeria monocytogenes</i> Tempo 30	
	CR	EP	CR	EP
	Constante	4,393766***	0,057988	3,442796
(1) Óleo essencial de cravo-da-índia (linear)	-0,298141***	0,038969	-0,265506	0,072392
Óleo essencial de cravo-da-índia (quadrática)	0,112783	0,043902	0,169394	0,081557
(2) Quitosana (linear)	-0,379357***	0,035306	-0,427953	0,065588
Quitosana (quadrática)	0,000477	0,044265	-0,049905	0,082232
1 L by 2 L	4,393766***	0,046670	-0,167924	0,086698
R <sup>2</sup>	0,9877		0,9437	

\*\*\* $p < 0,10$ .

A partir do modelo ajustado para os coeficientes significativos (Tabela 10), foi possível construir a Superfície de Resposta das emulsões em função das concentrações de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia (Figura 4).

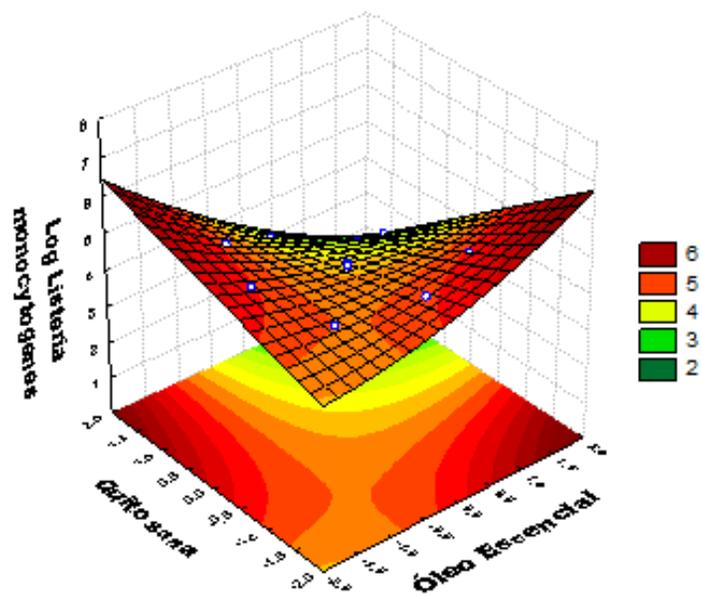
**Tabela 10** Modelo ajustado para os coeficientes significativos para o pH no tempo zero e tempo trinta

Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R <sup>2</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i> Tempo 0	$Y=4,39 - 0,29x_1 + 0,11x_1^2 - 0,37x_2 - 0,00x_2^2 + 0,43x_1x_2$	0,01	0,9877
<i>Listeria monocytogenes</i> Tempo 30	$Y=3,34 - 0,26x_1 + 0,16x_1^2 - 0,42x_2 - 0,04x_2^2 - 0,16x_1x_2$	0,3	0,9437

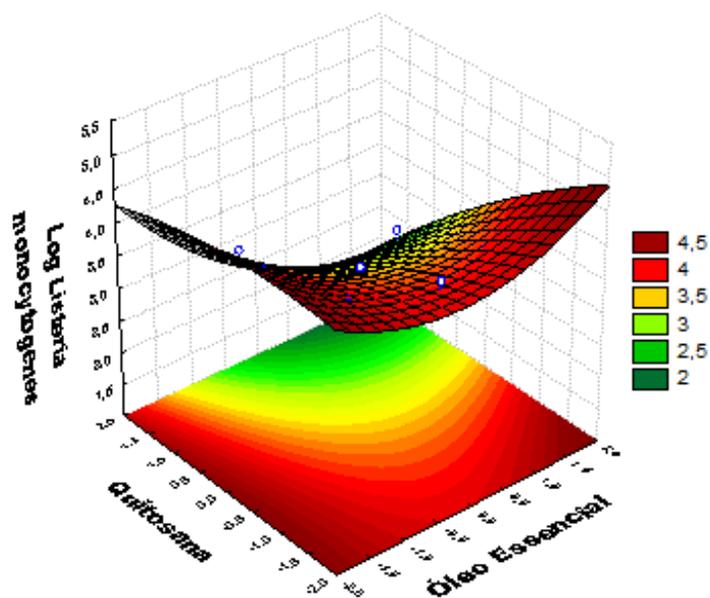
X1= variável codificada para óleo essencial de cravo-da-índia; X2= variável codificada para quitosana.

As maiores concentrações de óleo essencial de cravo-da-índia e quitosana influenciaram a contagem de *Listeria monocytogenes* dos tratamentos, tanto no primeiro dia de armazenamento quanto após os trinta dias (Figura 4A e 4B). Constatando-se uma atividade antimicrobiana dos antimicrobianos naturais sobre a bactéria adicionada.

**Figura 4** Superfície de resposta para a enumeração de *Listeria monocytogenes* das mortadelas acrescidas de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia, armazenadas a 7 °C por 24 horas (A) e por 30 dias (B).



A



B

O mecanismo de ação da quitosana sobre os microrganismos não está completamente elucidado, contudo, várias propostas são sugeridas. Alguns pesquisadores correlacionam a atividade antimicrobiana da quitosana à formação de complexos polieletrólíticos, uma vez que, seus grupos amínicos protonados provavelmente se ligam seletivamente à superfície negativamente carregada dos microrganismos, o que interfere na atividade celular e na permeabilidade da membrana e resulta na perda de componentes intracelulares com consequente inibição microbiana (Tsai, Hwang, 2004).

Estudos mais recentes que os anteriores revelam, ainda, que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas das soluções, concentração utilizada e tempo de exposição, além das características inerentes à membrana do microrganismo em questão (Costa et al., 2006).

Neste sentido, pesquisas demonstram que a atividade antimicrobiana contra bactérias *Gram*-positivas aumenta quanto maior a massa molecular do polímero, enquanto que, para bactérias *Gram*-negativas, quanto menor a massa molecular, maior o potencial antimicrobiano. Desprende-se assim a sugestão de que os efeitos da quitosana são distintos nos dois tipos de bactérias: nas *Gram*-positivas, a hipótese é que a quitosana de alta massa molecular forma películas ao redor da célula que acabam por inibir a absorção de nutrientes, enquanto a de baixa massa molecular penetra mais facilmente em bactérias *Gram*-negativas, ligando-se ao DNA e impedindo assim que o RNA e, conseqüentemente, as proteínas, sejam sintetizados causando distúrbios no metabolismo celular (Devlieghere et al., 2004; Harish et al., 2007). Em adição, sabe-se que a quitosana também apresenta a função de agente quelante de íons metálicos, e dessa forma é sugerido ainda que a molécula pudesse interferir na produção de toxinas e crescimento microbiano (Amarim et al., 2005).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais ainda não foram totalmente elucidados (Lambert et al., 2001), considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presente nos óleos essenciais, é mais provável que sua atividade antibacteriana não seja atribuída a um mecanismo específico, mas sim a vários alvos na célula (Figura 1) (Burt, 2004; Carson; Mee; Riley, 2002).

#### **4 CONCLUSÃO**

A adição de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia não alteraram de forma significativa a atividade de água e o potencial de oxi-redução das mortadelas. Quanto ao pH, constatou-se uma diferença significativa das amostras ao longo do tempo, onde as amostras contendo maiores concentrações de quitosana, apresentaram maiores índices de pH. Com relação à oxidação lipídica, os resultados do trabalho mostraram que as amostras contendo diferentes concentrações de quitosana apresentaram menores valores de substâncias reativas ao TBARs, portanto, reduzindo-a. Para a análise de nitrito residual houve diferença significativa para todas as amostras em estudo, sendo verificada queda da concentração deste para todos os tratamentos.

Já quanto à enumeração de *Listeria monocytogenes* nas mortadelas, constatou-se uma redução do número de microrganismos nas amostras contendo maiores concentrações de quitosana e óleo essencial, demonstrando uma possível atividade antimicrobiana.

Assim, os resultados do presente trabalho permitem concluir que existe viabilidade tecnológica, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana em relação a um patógeno de grande interesse na indústria cárnea, na adição de quitosana e óleo essencial de cravo-da-índia em produtos cárneos, conseguindo obter, ainda, um produto fonte de fibras.

#### **AGRADECIMENTOS**

A equipe agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

Amorim, R. V. S.; Souza, W.; Fukushima, K. (2001). Faster chitosan production by Mucoralean strains in submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 20-23.

AOAC (2002). Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC international. 17. ed., Washington.

Bakkali, F. et al. (2008). Biological effects of essential oils: a review. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, 46, 446-475.

Barreteau H.; Delattre C.; Michud P. (2006). Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 323.

Bento, R. A.; Stamford, T. L. M.; Campos-Takaki, G. M.; Stamford, T. C. M. Souza, E. L. (2009). Potential of chitosan from *Mucor rouxii* UCP064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria monocytogenes* / Potencial de quitosana de *Mucor rouxii* UCP 064 como componente alternativo para inibir *Listeria monocytogenes*. *Braz. j. microbial*, 40, 583-589.

Bertini, L.M. et al. (2005). Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Revista Infarma*, 17, 80-3.

Bostan, K.; Isin Mahan, F. (2011). Microbiological Quality and Shelf life of Sausage Treated with Chitosan. *J. Fac. Vet. Med. Istanbul Üniv*, 37, 117-126.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food: a review. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, 94, 223-253.

Carson, C. F.; Mee, B. J.; Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-Kill, lysis, leakage and tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Bethesda, 46, 1914-1920.

Carvalho, J. C. T. (2004). **Fitoterápicos anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos. Ribeirão Preto: Tecmedd, 480 p.

Cassens, R. G. (1997). Residual nitrite in cured meat. *Food Technology* 51, 53-55.

Costa Silva HSR, Dos Santos KSCR and Ferreira EI. (2006). Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, 29, 776-785.

Craveiro AA, Craveiro AC, Queiroz DC. (1999). “Quitosana: A fibra do futuro”, Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC). Fortaleza.

Devlieghere, F.; Vermeiren, L.; Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14, 273-285.

Dorman, H. J. D.; Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.

Dutra, M. P. et al. (2009). Efeito da radiação gama na cor objetiva de mortadelas elaboradas com diferentes concentrações de nitrito. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 5., 2009, São Paulo. Anais...Campinas: ITAL/CTC. 1 CD ROM.

Feiner, G. (2006). *Meat products handbook practical science and technology*. Boca Raton: CRC, 627.

Franco, L.O., Stamford, T.C.M., Stamford, N.P., Campos-Takaki, G.M. (2005). *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. *Revista Analytica*, 14, 40-44.

Gobbo-Neto L.; Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30, 374-381.

Harish Prashanth, K. V.; Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 117-131.

Harpaz, S. et al. (2003). Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater reared Asian sea bass fish (*Lateolabrax niloticus*). *Journal of Food Protection*, Des Moines, 66, 410-417.

Hitchins, A.D. (2003). *Listeria monocytogenes*. In: *Bacteriological Analytical Manual*. 7 ed. Arlington: AOAC International, 141-151.

JAY, J. M. (2005). *Microbiologia de alimentos*. 6. Ed. Porto Alegre: artmed, 711p.

Kamil J. Y. V. A., Jeon Y. J., Shahidi F. (2002). Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*). *Food Chemistry*, 79, 69-77.

Lambert, R. J. W. et al. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.

Lee, K. G.; Shibamoto, T. (2001). Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds. *Food Chemistry*, London, 74, 443-448.

Mazzafera, P. (2003). Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo da Índia e eugenol. *Revista Brasileira de Botânica*, 26, 231-238.

Muzzarelli, R. A. A.; Rocchetti, R. (1986). The determination of the degree of acetylation of chitosan by spectrophotometry. In: MUZZARELLI, R.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G. W. (Ed.). *Chitin in nature and technology*. New York: Plenum Press, 385-388.

Nagraes, P. (2003). Guia A-Z de plantas: condimentos. 4. ed. São Paulo: Bei Comunicação, p. 267.

Nascimento GGF, Locatelli J & Freitas PC. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31:247-256.

National Committee for clinical laboratory standards. (2003). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard. 8. ed. Wayne: NCCLS, (NCCLS Document M2 – A8).

Oussalah, M. et al. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 414–420.

Pereira, A. A. et al. (2008). Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, 32, 887-893.

Peter, M. G. (2000). Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *Pure Appl. Chem.* 32, 629-640.

Pizzale, L. et al. (2002). Antioxidant activity of sage and oregano extracts related to their phenolic compound content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1645–1651.

Rhoades, J.; Roller, S. (2000). Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 80-86.

Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F. (2003). Planejamento de experimentos e otimização de processo: uma estratégia sequencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326 p.

Salimena, A. P. S. (2010). Atividade biocida de óleos essenciais in vitro e em matriz alimentar láctea sobre *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. 2010. 142 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Silva, J. A. (2000). Tópicos da tecnologia de alimentos. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 227 p.

Simões, C. M. O. et al. (2007). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFSC, 1102 p.

Tsai, G. J.; Hwang, S. P. (2004) In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. *Fisheries Science*, 70, 675-681.