



**NAYANE APARECIDA ARAUJO DIAS**

**AVALIAÇÕES MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-  
QUÍMICA DE MORTADELAS ELABORADAS  
COM ÓLEOS ESSENCIAIS E INOCULADAS  
COM *Clostridium perfringens* TIPO A**

**LAVRAS - MG**

**2011**

**NAYANE APARECIDA ARAUJO DIAS**

**AVALIAÇÕES MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE  
MORTADELAS ELABORADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS E  
INOCULADAS COM *Clostridium perfringens* TIPO A**

Dissertação 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 Mestre.

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS - MG**

**2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Dias, Nayane Aparecida Araujo.

Avaliações microbiológica e físico-química de mortadelas elaboradas com óleos essenciais e inoculados com *Clostridium perfringens* tipo A / Nayane Aparecida Araujo Dias. – Lavras : UFLA, 2011.

111 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Produto cárneo. 2. Nitrito de sódio. 3. Aditivos naturais. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.9296

**NAYANE APARECIDA ARAUJO DIAS**

**AVALIAÇÕES MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE  
MORTADELAS ELABORADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS E  
INOCULADAS COM *Clostridium perfringens* TIPO A**

Dissertação 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 Mestre.

APROVADA em 29 de julho de 2011.

Dra. Alcinéia de Lemos Souza Ramos	UFLA
Dr. Alexandre Tourino Mendonça	UNINCOR
Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA
Dr. Eduardo Mendes Ramos	UFLA

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2011**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar ao meu lado iluminando meu caminho.

À minha mãe, Sueli, e ao tio Luis que sempre me apoiaram independente dos obstáculos que isso acarreta e pelo amor incondicional.

Ao meu namorado, Eduardo, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e fazendo acreditar que um sonho pode se concretizar.

A toda minha família que me apoiou e por acreditar 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 a 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 prof. Alexandre Tourino Mendonça que se disponibilizou a contribuir com este trabalho.

Ao prof. Disney Ribeiro Dias que sempre foi muito prestativo e pela contribuição com esta dissertação.

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.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Ao prof. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas por me acolher quando eu ainda era sua orientada de lato-sensu, por ter me apoiado e contribuído para a realização desta etapa tão importante.

A Eliane, técnica do laboratório, pela disponibilidade, amizade e auxílio.

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

A Luciana, que me auxiliou em todas as etapas do experimento, e principalmente pela amizade.

A Cecília e Nilson pelo carinho, paciência e amizade.

A Priscila pelo auxílio nas análises.

Ao Cleiton, pelo auxílio nas análises.

A todos do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência dos Alimentos que estiveram presentes durante essa caminhada, obrigada pelo carinho e auxílio, em especial a Maíra, Danilo, Silvia, Alcilene, Glécia, Tenille, Query, Nádia, Nathália, Keila e Talita.

A todos do Laboratório de Carnes e Pescado, pelos ensinamentos, auxílio e amizade, em especial a Monalisa, Gissele e Cristiane;

As amigas Abiah, Cristiane, Daniela, Juliana, Monique e Nathália pela amizade e paciência, sem vocês a caminhada seria mais difícil.

A Patrícia Rodrigues Costa pelas correções e amizade.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram e torceram pela realização desta etapa em minha vida. Muito obrigada!

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

Johann Wolfgang von Goethe

## RESUMO

*Clostridium perfringens* é um bastonete Gram-positivo, não móvel, anaeróbico, aerotolerante e produtor de endósporos e, está diretamente associado à intoxicação alimentar. Devido ao crescimento do interesse dos consumidores por alimentos ditos “naturais”, os óleos essenciais surgem como alternativa, reduzindo o uso de aditivos artificiais como o nitrito. Objetivou-se com este trabalho verificar a atividade antibacteriana de diversos óleos essenciais e a combinação dos óleos essenciais de orégano, tomilho, cravo-da-índia e capim-limão sobre *C. perfringens* tipo A, além de avaliar o crescimento de *C. perfringens* inoculado em mortadelas adicionadas de nitrito de sódio e diferentes combinações de óleos essenciais, assim como estabelecer a concentração de nitrito residual e avaliar a cor objetiva e oxidação lipídica do produto. Para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) tanto dos óleos essenciais individuais como das respectivas combinações foi utilizado o método de difusão de disco. Após este procedimento foi elaborada uma mortadela, as amostras foram separadas, embaladas a vácuo e armazenadas a 25°C/20 dias. Foram inoculadas com 5 log UFC/g de *C. perfringens* ATCC 13124 em amostras destinadas às análises microbiológicas. Os óleos essenciais de capim-limão, orégano, tomilho e o composto químico carvacrol, apresentaram CMI a 3,12%, os óleos de bálsamo, cravo-da-índia e o composto eugenol a 6,25% e os óleos de canela e pimenta chinesa a 12,5%, entretanto, os óleos essenciais de alecrim, manjerição, funcho-doce, gengibre, *grapefruit*, limão-siciliano, sálvia e tangerina não apresentaram atividade antibacteriana em nenhuma das concentrações testadas sobre *C. perfringens* tipo A. Ao avaliar as combinações entre os óleos testados foram observados maiores halos inibitórios em concentrações mais altas de óleo essencial de orégano e concentrações mais baixas de óleo essencial de capim-limão. Na mortadela constatou-se maior efeito inibitório do tratamento contendo 3,1% de óleo essencial de orégano; entretanto foi observado efeito pró-oxidante dos óleos essenciais sobre a mortadela e alterações na cor objetiva do produto.

Palavras-chave: Produto cárneo. Nitrito de sódio. Aditivos naturais.



## ABSTRACT

*Clostridium perfringens* is a rod-shaped, gram-positive, anaerobic, non-motile, spore-forming and oxygen tolerant bacterium and it is directly associated to food-poisoning. Since the growth of customers' interest on "natural" foods, essential oils are perceived as an alternative for the use of artificial additives as nitrite, diminishing its use. The aim of this work was to verify the antibacterial activity of several essential oils and the blend from oregano, thyme, clove and lemongrass on *C. perfringens* type A and also evaluate the growth of *C. perfringens* inoculated on mortadella added with sodium nitrite and different combinations of essential oils, as well as to establish the concentration of residual nitrite and evaluate the objective color and lipid oxidation of the product. The disk diffusion method was used to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of individual essential oils and of their blend. After this procedure, a mortadella was prepared and its samples was divided, vacuum packed and stored on 25°C/20days. The samples were inoculated with 5 log UFC/g of *C. perfringens* ATCC 13124 destined to the microbiological analysis. The essential oils from lemongrass, oregano, thyme and the chemical compound known as carvacrol, have a MIC of 3.12%, oils from balsam of Peru, clove and the compound known as eugenol have 6.25% and oils from cinnamon and *Litsea cubeba* have 12.5%; however, essential oils from rosemary, basil, order fennel, ginger, grapefruit, Sicilian lemon, clary sage and mandarin orange did not have antibacterial activity in anyone of the tested concentration of *C. perfringens* type A. After evaluating the oils blends tested was perceived larger inhibitory halos in higher concentration of oregano essential oil and small concentration on lemongrass essential oil. A higher inhibitory effect of the treatment containing 3.1% of oregano essential oil was evidenced on the mortadella; however it was observed pro-oxidant effect of essential oils on mortadella and modification on the objective color of the product.

Key-words: Meat product. Sodium nitrite. Natural additives.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários, Adaptada de Simões et al. (2007).....	19
Figura 2	Ação dos óleos essenciais na célula bacteriana, adaptado de Burt (2004).....	25
Figura 3	Mecanismo de autoxidação, segundo Ramalho e Jorge (2006).....	28
Figura 4	Mecanismo de ação para antioxidantes primários, creditando a óleos essenciais e seus componentes, segundo Ramalho e Jorge (2006).....	29
Figura 5	Fluxograma das etapas da fabricação e preparo das amostras dos tratamentos da mortadela .....	56
Figura 6	Halo inibitório das combinações de óleos essenciais sobre <i>C. perfringens</i> tipo A .....	65
Figura 7	Pesos de Análise de Compostos Principais (PCA) das combinações dos óleos essenciais de orégano, tomilho, capim-limão e cravo-da-índia sobre <i>C. perfringens</i> tipo A .....	66
Figura 8	Crescimento de <i>C. perfringens</i> tipo A ATCC 16124 em mortadelas adicionado de nitrito de sódio e diferentes combinações de óleos essenciais armazenado a 25°C por 20 dias ....	67
Figura 9	Mortadelas adicionadas de nitrito de sódio e diferentes combinações de óleos essenciais no primeiro e vigésimo dia de armazenamento. ....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Toxinas utilizadas para classificação de <i>C. perfringens</i> bem como a presença de enterotoxina e sua localização genética .....	44
Tabela 2	Planejamento experimental para avaliação da combinação de três óleos essenciais, considerando a proporção referente à CMI de cada óleo analisado .....	53
Tabela 3	Formulação padrão utilizada na elaboração do modelo de emulsão cárnea do tipo mortadela.....	54
Tabela 4	Proporções de diferentes combinações de óleos essenciais e concentrações de nitrito de sódio adicionados em mortadelas, baseados nas CMI de cada óleo essencial .....	54
Tabela 5	Espécies, com respectivo nome popular, composto majoritário, concentração mínima inibitória (CMI) e valor médio do halo de inibição de diferentes óleos essenciais sobre <i>Clostridium perfringens</i> tipo A.....	61
Tabela 6	Atividade de água em mortadelas adicionadas de nitrito de sódio e diferentes combinações de óleos essenciais armazenadas a 25 <sup>o</sup> C durante 20 dias.....	72
Tabela 7	Nitrito residual em mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais armazenadas a 25 <sup>o</sup> C durante 20 dias.....	73
Tabela 8	Níveis de TBARs durante o armazenamento de mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais armazenados a 25 <sup>o</sup> C durante 20 dias .....	76
Tabela 9	Índices de TBARs de mortadelas com diferentes concentrações/combinações de óleos essenciais e nitrito.....	76
Tabela 10	Valores de luminosidade (L*) em mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais armazenadas a 25 <sup>o</sup> C durante 20 dias.....	79
Tabela 11	Índice de vermelho (a*) em mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais armazenadas a 25 <sup>o</sup> C durante 20 dias.....	81
Tabela 12	Índice de amarelo (b*) em mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais armazenados a 25 <sup>o</sup> C durante 20 dias.....	83
Tabela 13	Ângulo de tonalidade (h*) em mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais armazenados a 25 <sup>o</sup> C durante 20 dias.....	85

Tabela 14 Índice de saturação (C*) em mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais armazenados a 25 <sup>0</sup> C durante 20 dias.....	86
Tabela 15 Índice de descoloração em mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais armazenados a 25 <sup>0</sup> C durante 20 dias.....	87

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
2.1	Óleos essenciais .....	16
2.2	Biossíntese de metabolitos secundários .....	17
2.3	Aplicações dos óleos essenciais .....	20
2.4	Atividade antibacteriana dos óleos essenciais .....	22
2.5	Atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	26
2.6	Descrição botânica e óleos essenciais.....	31
2.6.1	Alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) .....	31
2.6.2	Basilicão/Manjeriço ( <i>Ocimum basilicum</i> ) .....	32
2.6.3	Canela ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ).....	33
2.6.4	Capim-limão ( <i>Cymbopogon citratus</i> ) .....	33
2.6.5	Cardamomo ( <i>Elettaria cardamomum</i> ) .....	34
2.6.6	<i>Citrus</i> .....	34
2.6.7	Cravo-da-índia ( <i>Syzygium aromaticum</i> ) .....	35
2.6.8	Funcho doce ( <i>Foeniculum vulgare dulce</i> ) .....	36
2.6.9	Gengibre ( <i>Zingiber officinale</i> ).....	37
2.6.10	Sálvia ( <i>Salvia sclarea</i> ).....	37
2.6.11	Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ) .....	38
2.6.12	Tomilho ( <i>Thymus vulgaris</i> ) .....	39
2.7	Emulsão cárnea.....	40
2.7.1	Micro-organismos em embutidos cárneos .....	41
2.8	<i>Clostridium perfringens</i> .....	42
2.8.1	<i>Clostridium perfringens</i> em alimentos.....	44
2.9	Emprego do nitrito em produtos cárneos.....	46
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	50
3.1	Local e condução do experimento .....	50
3.2	Óleos essenciais avaliados .....	50
3.3	Micro-organismo padrão e obtenção do inóculo.....	51
3.4	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI).....	52
3.5	Combinações entre óleos essenciais .....	52
3.6	Elaboração das amostras da emulsão cárnea.....	53
3.7	Análises microbiológicas.....	56
3.8	Análises físico-químicas .....	57
3.8.1	Atividade de água .....	57
3.8.2	Concentração de nitrito residual .....	57
3.8.3	Índice de TBARs.....	58
3.8.4	Análise da cor objetiva.....	59
3.9	Análise estatística.....	59

4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	60
4.1	Concentração Mínima Inibitória (CMI) .....	60
4.2	Combinação entre óleos essenciais .....	64
4.3	Atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre <i>C. perfringens</i> tipo A inoculados em mortadela.....	67
4.4	Atividade de água .....	72
4.5	Nitrito Residual.....	73
4.6	Oxidação lipídica (Índice de TBARS) .....	75
4.7	Análise da cor objetiva.....	78
4.7.1	Avaliação do índice de Luminosidade (L*) .....	79
4.7.2	Avaliação do índice de vermelho (a*).....	80
4.7.3	Avaliação do índice de amarelo (b*).....	82
4.7.4	Avaliação do ângulo de tonalidade (h*) .....	84
4.7.5	Avaliação do índice de saturação (C*) .....	85
4.7.6	Avaliação do índice de descoloração .....	87
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	91
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	92

## 1 INTRODUÇÃO

A mortadela já foi considerada fonte de proteína de origem animal destinada a populações que não possuíam condições econômicas para suprir a quantidade protéica recomendada, entretanto, hoje é um produto apreciado e consumido por todas as classes sociais.

Produtos cárneos curados, como a mortadela, apresentam como constituintes a carne bovina, suína, toucinho e aditivos como nitrito de sódio, ascorbatos e fosfatos. O nitrito de sódio ou potássio possui finalidades básicas como contribuir para o desenvolvimento de cor e sabor característicos, inibir o desenvolvimento de micro-organismos e atuar como antioxidantes. Todavia, o ácido nitroso, oriundo da hidratação do óxido de nitrito produzido pela redução do nitrito de sódio, pode reagir com aminas em produtos cárneos curados para formação de compostos N-nitrosos, em especial as nitrosaminas, as quais possuem efeito tóxico, mutagênico, neuro e nefrotóxico e carcinogênicos.

A principal justificativa para o emprego do nitrito na elaboração de produtos cárneos baseia-se no fato de prevenir o aparecimento de formas vegetativas, impedindo tanto a germinação quanto a multiplicação dos endósporos de *Clostridium* sp., principalmente *Clostridium botulinum*.

As doenças causadas por micro-organismos veiculados por alimentos é uma preocupação tanto para consumidores quanto para a indústria, sendo a toxinfecção alimentar causada por *Clostridium perfringens* tipo A, uma das mais comuns no mundo industrializado e os surtos estão diretamente relacionados a carnes, produtos carneos e aves.

Óleos essenciais são aditivos que podem ser utilizados em substituição e/ou complementando aditivos alimentares artificiais na indústria de alimentos, sendo preferidos por possuírem atividade antimicrobiana e antioxidante,

podendo ser usados também como flavorizantes, aromáticos, antissépticos, carminativos, antiespasmódicos e expectorantes.

Diante disto, objetivou-se verificar a atividade antibacteriana *in vitro* de diferentes óleos essenciais e o efeito inibitório das combinações dos óleos essenciais de orégano, tomilho, cravo e capim-limão sobre células vegetativas de *C. perfringens* tipo A ATCC 16124 e avaliar em mortadelas com baixo teor de nitrito de sódio e óleos essenciais o crescimento de *C. perfringens* tipo A e os efeitos sobre o desenvolvimento da cor, concentração de nitrito residual e oxidação lipídica do produto.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Óleos essenciais

Desde os primórdios da humanidade o homem depende das plantas para a sua existência, utilizando-as como alimento, medicamento, construção de abrigo, no aquecimento, dentre outros. As primeiras referências históricas importantes sobre a utilização dos óleos essenciais provêm do Oriente, especialmente do Egito, onde eram usados em rituais religiosos, para tratamento farmacológico e conservação de alimentos.

Segundo a Resolução – RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação à pressão reduzida ou outro método adequado) (BRASIL, 2007).

Estas substâncias são conhecidas como essência, óleo essencial ou óleo etéreo. Entretanto, sua principal característica é a volatilidade, diferindo, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas obtidos, geralmente, de sementes. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos essenciais, os quais são solúveis em solventes orgânicos apolares, geralmente são incolores ou ligeiramente amarelados e instáveis, principalmente em presença de ar, luz, calor, umidade e metais; a maioria dos óleos voláteis possui índice de refração e é opticamente ativo, cujas propriedades são usadas na sua identificação e controle da qualidade (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais são constituídos, em sua maioria, de derivados de fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo esses últimos predominantes. Apresentam-se como uma mistura de diferentes concentrações de hidrocarbonetos terpênicos, alcóois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas,

cumarinas e compostos de enxofre. Normalmente, um deles é o composto majoritário, havendo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços). São produzidos no metabolismo secundário das plantas, variando a intensidade e a composição de acordo com a espécie, fatores ambientais e o estágio de desenvolvimento da planta (OUSSALAH et al., 2007).

## **2.2 Biossíntese de metabolitos secundários**

Os seres vivos possuem metabolismo que origina metabólitos primários e secundários. Enquanto os primários são secretados e essenciais a todos os organismos, os secundários são produzidos apenas por alguns, em sua maioria vegetais e garantem as funções biológicas de perpetuação e defesa (SANTOS, 2007). Logo, os compostos orgânicos produzidos ou transformados pelos vegetais que não possuem ação direta conhecida em seus processos vitais, tais como fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, assimilação, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos são conhecidos como metabólitos secundários (GUIMARÃES, 2007).

Os vegetais possuem elevada capacidade biossintética de metabolitos secundários, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade numa mesma espécie (POSER; MENTZ, 2007), embora estes não sejam necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sobrevivência e para perpetuação de sua espécie em seu ecossistema (CASTRO et al., 2004).

As plantas apresentam diversas vias metabólicas secundárias que levam à formação de compostos, cuja distribuição é restrita a algumas famílias, gêneros ou mesmo espécies. O conjunto de compostos secundários nas plantas é resultado do balanço entre a formação e eliminação desses compostos durante seu crescimento, sendo esse equilíbrio influenciado por fatores genéticos (que

são fixos) e ambientais como luz, temperatura, tipo de solo e água, os quais são variáveis. Eles são comumente concentrados em uma região em particular da planta e, quando ocorrem em várias partes destas, possuem diferentes perfis de composição (OUSSALAH et al., 2007).

Os óleos essenciais podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pelos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquisolísigenas (Pinaceae, Rutaceae). Os óleos essenciais podem estar estocados em certos órgãos, tais como flores (laranjeira e bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou ainda nas cascas do caule (canelas), madeira (sândalo, pau-rosa), raízes, rizomas (cúrcuma, gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho, erva-doce) ou sementes (noz-moscada). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar segundo a localização (OUSSALAH et al., 2007).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo, geralmente, específica para um determinado órgão e característica para seu estágio de desenvolvimento. Entretanto, as condições ambientais são capazes de causar variações significativas (WILLIANS; STOCKLEY, 1998). Temperatura, umidade relativa, período de exposição ao sol e regime de ventos exercem uma influência direta, sobretudo sobre as espécies que possuem estruturas de estocagem de óleo essencial em sua superfície (SALGADO, 2005).

A origem de todos os metabolitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dos intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (Figura 1). O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabolitos secundários aromáticos, tais como: taninos hidrolisáveis, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos

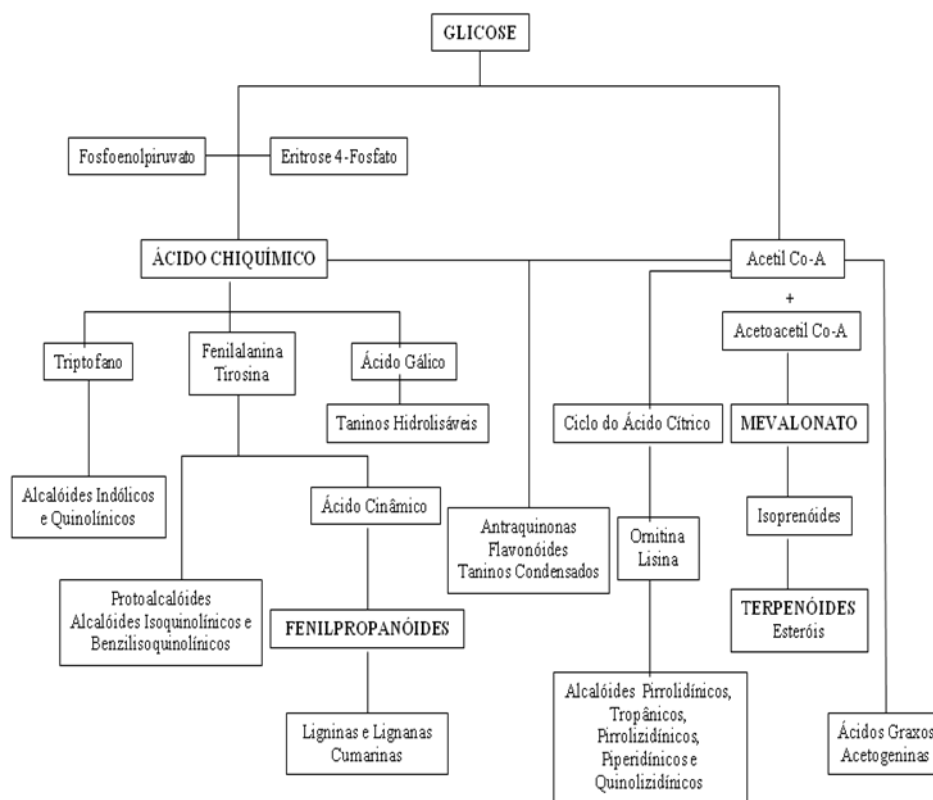


Figura 1 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários, Adaptada de Simões et al. (2007)

(triptofano e fenilalanina/tirosina) e os fenilpropanóides. A combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato origina as antraquinonas, flavonóides e os taninos condensados. Os derivados do acetato podem ser produzidos pela via ciclo do ácido cítrico, dando origem aos alcalóides derivados dos aminoácidos alifáticos, ornitina e lisina, e aos glicosídeos e glicosinolatos; pela via do mevalonato, originam os derivados do isopreno e, pela condensação da acetilCoA, formam-se os ácidos graxos e acetogeninas (SIMÕES et al., 2007).

Logo, os constituintes químicos dos óleos essenciais estão distribuídos em duas classes químicas distintas: terpenóides e fenilpropanóides, sendo os terpenóides produzidos com maior abundância e mais frequentemente, enquanto que os fenilpropanóides são indispensáveis para características flavorizantes e odorizantes (SANGWAN et al., 2001). Outros compostos como álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre também são encontrados nos óleos essenciais (SIMÕES et al., 2007).

### **2.3 Aplicações dos óleos essenciais**

Estima-se que aproximadamente 3.000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importante, especialmente para a indústria de alimentos, farmacêutica, cosméticos e agricultura (NEDOROSTOVA et al., 2009).

Os óleos essenciais têm atraído a atenção de pesquisadores, devido ao potencial antioxidante, antimicrobiano, flavorizante, aromático, antisséptico, carminativo, antiespasmódico e expectorante (JAKIEMI, 2008). Os óleos essenciais ou seus componentes são utilizados como produtos de perfumaria, higiene pessoal, na agricultura, aditivos em alimentos, como remédios naturais, dentre várias outras aplicações, com um mercado apresentando crescimento acima de 11% ao ano (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). São empregados também para mascarar odores desagradáveis em ambientes de trabalho e instalações sanitárias, além de serem usados como insumos em diversos produtos das indústrias de plásticos, tintas, borrachas, inseticidas e dentre outros (CAVICCHIOLI, 1986).

Alguns componentes dos óleos essenciais têm sido registrados pela Comissão Européia para utilização como aromatizante em gêneros alimentícios,

estes são caracterizados por não apresentarem qualquer risco à saúde do consumidor e incluem o carvacrol, carvona, cinamaldeído, citrato, *p*-cimeno, eugenol, mentol e timol (*Comission Decision of 23 January, 2009*).

Entretanto, alguns autores afirmam que a ingestão oral de doses elevadas de alguns compostos naturais pode promover graves problemas de toxicidade, sendo necessário encontrar um equilíbrio entre a dose efetiva e a que pode causar toxicidade (DUSAN et al., 2006). Alguns óleos essenciais podem induzir problemas alérgicos e dermatite de contato estando este problema relacionado com a natureza lipofílica e a sua capacidade de penetrar na pele (CARSON; RILEY, 2001).

Existe a perspectiva de substituir aditivos sintéticos por conservantes naturais presentes em condimentos (BARA, 1992). Deans e Ritchie (1987) afirmam que a substituição de aditivos sintéticos por naturais, dependerá fundamentalmente da determinação de uma concentração ideal, porém, segundo Shelef (1984), as concentrações normalmente empregadas para realçar o aroma e sabor variam de 0,5 a 1%, contudo, não inibem o desenvolvimento microbiano que depende de concentrações superiores a 1%.

O crescente interesse em compostos antimicrobianos naturais tem aumentado devido a mudanças no comportamento dos consumidores em relação ao uso de agentes sintéticos de preservação de alimentos, detergentes e sanificantes que possuem impacto negativo no ambiente (LEBERT; LEROY; TALON, 2007). Espera-se elevação do consumo de produtos contendo óleos essenciais no futuro, devido ao aumento do “consumismo verde”, o qual estimula o uso e desenvolvimento de produtos derivados de plantas (TULEY, 1996), podendo ser aplicado ao setor de alimentos, cosméticos e produtos medicinais.

O mercado de óleos essenciais é próspero para países que dispõem de grande biodiversidade, como o Brasil, e condições de agregar valor às suas

matérias-primas. Os principais óleos essenciais produzidos e exportados pelo Brasil são por ordem de importância: Laranja, limão, eucalipto, pau-rosa, lima e capim-limão.

#### **2.4 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais**

A ação dos óleos essenciais depende da composição química destes, que é determinada por fatores genéticos e influenciada por condições ambientais e agrônômicas bem como, por características do micro-organismo (GARDINI et al., 2009).

A determinação da concentração ideal que exerça, simultaneamente, efeito antimicrobiano e realçador de sabor e aroma dos alimentos é primordial para a utilização dos óleos essenciais de plantas, em substituição aos aditivos sintéticos para alimentos.

As variações referentes à determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles, a técnica aplicada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da coleta, extratos preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de óleos testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL et al., 2004).

Ao avaliar o efeito de 28 óleos essenciais nas concentrações 0,003, 0,006, 0,013, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4% sobre *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, Oussalah et al. (2007) observaram efeito antibacteriano para os óleos essenciais de *Corydothymus capitatus* (orégano espanhol), *Cinnamomun cassia* (canela-da-china), *Origanum heracleoticum* (orégano), *Satureja Montana* (segurelha) e *Cinnamomum verum* (canela). Essa atividade foi atribuída ao carvacrol

(composto majoritário dos óleos essenciais de *Corydothymus capitatus* e *Origanum heracleoticum*), aldeído cinâmico, (composto majoritário do óleo de *Cinnamomun cassia* e *Cinnamomum verum*) e ao timol presente no óleo de *Satureja montana*.

Nedorostova *et al.* (2009) testaram os óleos essenciais de 27 espécies de plantas sobre *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *S. Enteritidis* ATCC 13076. Destes, apenas 13 foram ativos sendo que apenas os óleos essenciais de *Allium sativum* (alho) e *Armoracia rusticana* foram capazes de inibir todas as bactérias, contudo *S. aureus* foi inibida por todos os óleos ativos, seguida de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* e *P. aeruginosa*.

Pereira *et al.* (2008) constaram em testes *in vitro* que os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Origanum vulgare* (orégano) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) inibiram as bactérias *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 8739 e concluíram que o efeito antibacteriano foi devido à presença dos compostos majoritários citral, terpen-4-ol e eugenol encontrados nesses óleos, respectivamente. Ademais, quando avaliaram o efeito sinérgico dos óleos sobre as mesmas bactérias, não observaram diferenças significativas.

Rota *et al.* (2008) sugeriram que óleos essenciais de *Thymus hyemalis*, *T. zygis* e *T. vulgaris* possuem propriedades antimicrobianas e são considerados fontes potenciais de ingredientes para a indústria de alimentos, uma vez que todos apresentaram uma forte inibição em relação a 9 das 10 linhagens bacterianas analisadas. Dimitrijevic *et al.* (2007) afirmam que óleos essenciais de orégano, tomilho e alecrim estão entre os mais ativos antimicrobianos.

Embora a atividade antibacteriana tenha sido relatada em numerosos trabalhos, poucos estudos têm relacionado o mecanismo de ação destes produtos naturais na célula.



Considerando a variabilidade de grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, observa-se que sua atividade antibacteriana não é atribuída somente a um mecanismo específico, havendo vários alvos na célula microbiana (CARSON; MEE; RILEY, 2002). Os óleos essenciais são capazes de agir na superfície celular causando degradação da parede celular (HELANDER et al., 1998); danos na membrana citoplasmática (OOSTERHAVEN; POOLMAN; SMID, 1995), atuando principalmente nas proteínas de membranas (ULTEE; KETS; SMID, 1999); liberação do conteúdo celular (LAMBERT et al., 2001); coagulação do citoplasma (GUSTAFSON et al., 1998) e afetar diretamente a força próton motiva (ULTEE; SMID, 2001) como observado na Figura 2.

Segundo Conner e Beuchat (1984), os óleos essenciais, provavelmente, danificam vários sistemas enzimáticos, inclusive os envolvidos na produção de energia celular e síntese de compostos estruturais. A presença de óleos essenciais interfere também no mecanismo de reparo necessário para a divisão celular. Sugere-se, ainda, que cause danos ou lesões na membrana citoplasmática, permitindo que os componentes antimicrobianos dos óleos migrem mais rapidamente para o interior da célula, alterando seu metabolismo normal.

Moreira et al. (2005), afirmam que os compostos fenólicos dos óleos essenciais se ligam à bicamada fosfolipídica da membrana celular aumentando sua permeabilidade e extravasando os constituintes intracelulares ou danificando o sistema enzimático da célula. Souza et al. (2010) afirmam que mesmo pequenas mudanças ocorridas na estrutura da membrana citoplasmática podem afetar o metabolismo, incluindo a síntese de macromoléculas.

Lambert et al. (2001) e Bakkali et al. (2008), citam que os compostos lipofílicos encontrados nos óleos essenciais são mais ativos em bactérias gram-positivas, pois são capazes de romper a membrana composta de diferentes

polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, podendo também danificar a parede celular e levar à liberação de macromoléculas e lise celular. Em bactérias gram-positivas, a parede celular é constituída por grossa camada de peptidoglicano (polissacarídeo), com teor de lipídeos nulo ou muito baixo.

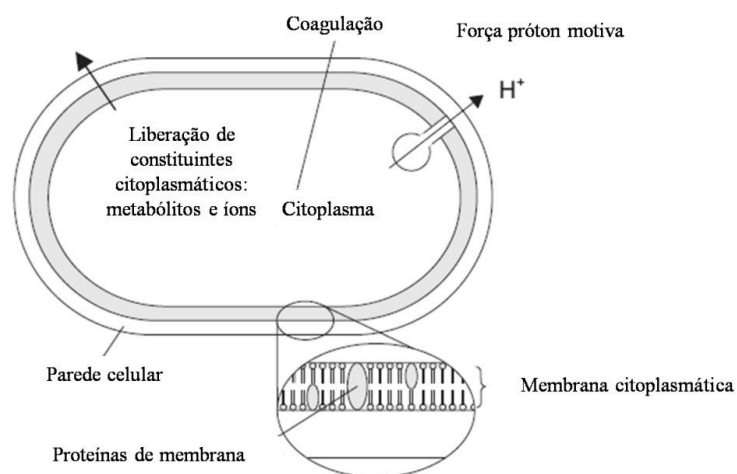


Figura 2 Ação dos óleos essenciais na célula bacteriana, adaptado de Burt (2004)

Estudos como o de Sharififar et al. (2007) afirmam que o timol e o carvacrol apresentaram maior bioatividade sobre bactérias gram-negativas devido à maior afinidade deste pela estrutura lipídica da membrana que as envolve. Helander et al. (1998) afirmam que esses compostos são capazes de desintegrar a membrana externa de bactérias gram-negativas, liberando lipopolissacarídeos e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática; enquanto que, Ultee, Bennink e Moezelaar (2002) observaram distorção da estrutura física da membrana, o que pode causar uma expansão e desestabilização, aumentando sua fluidez e sua permeabilidade.

## 2.5 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

Radicais livres são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante processos metabólicos e atuam como mediadores da transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes ao metabolismo (SHAMI; MOREIRA, 2004).

A geração de radicais livres constitui uma ação contínua e fisiológica cumprindo funções biológicas essenciais, sendo formados em cenário de reações de óxido-redução, provocando ou resultando dessas reações. Podem ceder o elétron solitário e ser oxidados; ou podem receber outro elétron e ser reduzidos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A oxidação lipídica é responsável por desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para consumo, além de provocarem outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos (CALLUCCI et al., 2003).

A avaliação do índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) diz respeito ao grau de oxidação das amostras, que proporcionam sabor e odor característicos de ranço. O malonaldeído corresponde a um aldeído de cadeia curta proveniente dos processos de decomposição de hidroperóxidos lipídicos, ou seja, produtos de oxidação, e sua concentração pode ser medida pela reação com o ácido tiobarbitúrico, por meio da formação de produtos de condensação com coloração avermelhada medidos por espectofotometria. Apesar de a metodologia ser baseada na reação entre o ácido tiobarbitúrico e malonaldeído, diversos componentes de alimentos incluindo proteínas, produtos da degradação de açúcares e de reações de Maillard podem influenciar na

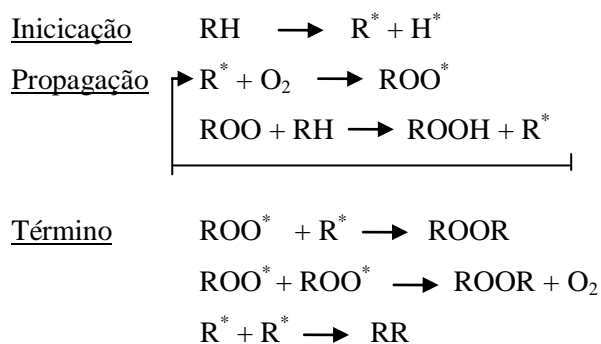
determinação do TBARs, por isto sua definição como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (GORDON, 2001).

As reações de oxidação lipídica representam aspecto determinante da qualidade de carnes e produtos cárneos, pois estão diretamente relacionados com seus aspectos sensoriais, características de extrema importância para os consumidores.

Os lipídeos podem ser oxidados por diferentes caminhos. A rancificação hidrolítica é catalisada pelas enzimas lípases ou pela ação de calor e umidade, com formação de ácidos graxos livres. A oxidação por via enzimática ocorre pela ação das enzimas lipoxigenases que atuam sobre os ácidos graxos poliinsaturados, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poliinsaturada, formando peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas que podem envolver-se em diferentes reações degradativas. O mecanismo de fotoxidação de gorduras insaturadas é promovido essencialmente pela radiação UV em presença de fotossensibilizadores (clorofila, mioglobina, riboflavina e outros) que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e a transferem para o oxigênio tripleto ( $^3\text{O}_2$ ), gerando o estado singlete ( $^1\text{O}_2$ ). O oxigênio singlete reage diretamente com as ligações duplas por adição formando hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência de luz e de sensibilizadores, e que por degradação posterior originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

A autoxidação é o principal mecanismo de oxidação dos óleos e refere-se a uma série extremamente complexa de reações químicas, envolvendo ácidos graxos insaturados e oxigênio. Por conveniência, essas reações são divididas em três diferentes estágios: iniciação, propagação e terminação. A reação inicial ocorre quando o átomo de hidrogênio é removido do grupo metileno do ácido graxo insaturado, formando radical livre. Este processo ocorre a partir de grande variedade de diferentes iniciadores presentes no alimento, incluindo peróxidos,

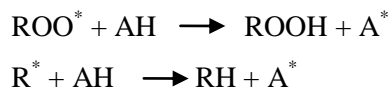
íons metálicos de transição, luz UV, calor e enzimas. Uma vez formado, o radical livre reage com o oxigênio formando o radical peroxila. Esses radicais são altamente reativos e capazes de remover átomos de hidrogênio de outros ácidos graxos insaturados, propagando, portanto, a reação de oxidação. A reação terminal ocorre com a interação de dois radicais livres formando um não-radical e, assim, finalizando a sua participação na reação (ARAÚJO, 2006), como é detalhado na Figura 3.



Legenda: RH: Ácido graxo insaturado; R\*: Radical livre;  
 ROO\*: Radical peróxido; ROOH: Hidroperóxido

Figura 3 Mecanismo de autoxidação, segundo Ramalho e Jorge (2006)

Os antioxidantes são substâncias capazes de sequestrar ou impedir a formação de radicais livres, ou seja, são doadores de prótons. Os principais antioxidantes lipídico-solúveis, atualmente utilizados em alimentos, são os fenóis polihídricos e monohídricos. O mecanismo de ação dos antioxidantes está bem elucidado, ou seja, a substância é eficiente na redução das reações da autoxidação se inibir a formação de radicais livres na iniciação (antioxidante primário) na cadeia de oxidação ou se interromper a propagação (antioxidante secundário) da cadeia de radicais livres (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2007) (Figura 4).



Onde:  $\text{ROO}^*$  e  $\text{R}^*$ : Radicais livres; AH: Antioxidante com átomo de hidrogênio ativo;  $\text{A}^*$ : Radical inerte.

Figura 4 Mecanismo de ação para antioxidantes primários, creditando a óleos essenciais e seus componentes, segundo Ramalho e Jorge (2006)

Os antioxidantes estão presentes de forma natural ou intencional nas gorduras e alimentos para retardar o aparecimento dos fenômenos de oxidação, mantendo intactas suas características sensoriais. Os antioxidantes que se adicionam aos alimentos não devem causar efeitos fisiológicos negativos, produzir cores, odores, nem sabores anômalos, devem ser lipossolúveis, resistentes aos tratamentos a que seja submetido o alimento, ativos em baixas temperaturas e econômicos. Os antioxidantes sintéticos que são utilizados com maior frequência na indústria de alimentos são os compostos fenólicos butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e galato de propila (GP). O TBHQ é estável em altas temperaturas e é considerado, em geral, mais eficaz em óleos vegetais que o BHA, o BHT e o GP. Não confere cores anômalas e é muito eficiente no armazenamento de óleos refinados e desodorizados, por isso, seu uso é muito difundido nos países produtores e exportadores de óleos vegetais (ORDÓÑEZ et al., 2005).

O TBHQ é considerado o melhor antioxidante sintético para óleos sob temperaturas elevadas, pois resiste ao aquecimento, mas estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade desse antioxidante apresentar efeito carcinogênico em experimentos com animais. Por esse motivo, o uso de antioxidantes sintéticos é restringido em vários países, visto que existe a

possibilidade de terem efeitos indesejáveis para a saúde humana (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000).

No Brasil, o uso de antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde que limita a no máximo 200 mg.kg<sup>-1</sup> para BHA e TBHQ e 100 mg.kg<sup>-1</sup> para BHT (BRASIL, 2001).

O emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade. Sendo assim, pesquisas são realizadas em busca de compostos naturais que apresentem esta propriedade funcional, podendo atuar como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e diminuir o uso dos antioxidantes sintéticos (RAMALHO; JORGE, 2006).

A atividade antioxidante das especiarias e de seus extratos é atribuída aos compostos fenólicos que podem atuar como sequestrantes de radicais livres no organismo reduzindo os riscos de doenças crônicas (GUERRA; LAJOLO, 2005).

Lee et al. (2005) encontraram no óleo essencial das folhas de manjeriço e tomilho a presença dos componentes majoritários timol e carvacrol, que demonstraram ser eficientes antioxidantes, tanto que essa propriedade foi comparada à atividade da vitamina E (alfa-tocoferol) e BHT.

Dentre as inúmeras fontes de antioxidantes naturais estão incluídos cereais, sementes e casca de frutas cítricas, cogumelos, ervas, especiarias e plantas medicinais (SOUSA et al., 2007). Segundo Bonanni et al. (2007), diferentes tipos de condimentos processados como anis, funcho, manjeriço, hortelã, estragão e manjerona apresentaram elevada capacidade antioxidante. Zheng e Wang (2001) afirmam que além da atividade antimicrobiana, os terpenos presentes no óleo essencial de orégano também possuem importante atividade antioxidante.

No número crescente de pesquisas realizadas visando à utilização de antioxidantes naturais, muitas especiarias têm sido estudadas e tem-se observado que o alecrim e o orégano possuem grande atividade antioxidante (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000).

Importantes aspectos tecnológicos e nutricionais podem ser destacados com o uso de antioxidantes naturais, como a conservação da qualidade do alimento, podendo substituir antioxidantes sintéticos; a preservação da saúde humana, por minimizar danos oxidativos principalmente em algumas doenças; a presença de componentes bioativos, caracterizando os alimentos como funcionais, além das especiarias possuírem posição especial em relação às outras fontes naturais de antioxidantes, por serem usadas tradicionalmente como ingredientes nos alimentos.

## **2.6 Descrição botânica e óleos essenciais**

Os óleos essenciais podem ser extraídos de uma grande diversidade de vegetais, tais como orégano, tomilho, cravo-da-índia, capim-limão, cardamomo, sálvia e alecrim.

### **2.6.1 Alecrim (*Rosmarinus officinalis*)**

As folhas de *Rosmarinus officinalis* Linn. (alecrim) têm sido utilizadas popularmente por suas propriedades anti-hipertensiva e digestiva (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007), sendo encontrada atividade antimicrobiana sobre fungos e bactérias gram-positivas e gram-negativas, como *S. aureus*, *S. albus*, *Vibrio colere*, *E. coli*, *Corinebacterium*, *Lactobacillus brevis*, *P. fluorenses*, *Rhodotorula glutinis* e *Kluyveromyces bulgaricus*,



*Micrococcus luteus*, *Salmonella* sp. e *L. monocitogens* (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 2002).

Quimicamente os óleos essenciais são constituídos de 16-20% borneol, 27-30% cineol, 10% canfora, 2-7% acetato de bornil e baixas porcentagens de  $\alpha$ -pineno, canfeno, terpineol e verbenone. O borneol é responsável pela pungência, odor canforado e gosto amargo; o cineoleno pelo frescor, semelhante a eucalipto; o  $\alpha$ -pineno é responsável pela quentura, semelhante ao pinho; o cânfor contribui com um frescor, penetrante, semelhante à menta; e o acetato de bornil pelo frescor doce, suave, semelhante a pinho (FARREL, 1995)

### **2.6.2 Basilicão/Manjericão (*Ocimum basilicum*)**

*Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) é conhecido popularmente como manjericão, basílico, erva real, alfavaca, etc., tem seu nome derivado do grego osme, odorífico, fragrante (NEPOMUCENO, 2007).

Faz parte de um grupo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares de grande valor econômico, muito utilizado para diversos fins, como ornamental, condimentar, medicinal, aromático, na indústria de perfumaria e de cosméticos. O óleo essencial extraído de várias partes da planta tem apresentado atividade antimicrobiana sobre várias bactérias como *B. cereus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* dentre outras (CAROVIC-STANKO et al., 2010).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de manjericão tem sido associada, em parte, à presença de elevadas quantidades do componente linalol (HUSSAIN et al., 2008).

### 2.6.3 Canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

A espécie *Cinnamomum zeylanicum* é uma planta aromática e medicinal pertencente à família Lauraceae, originária de algumas regiões da Índia e do Ceilão. É encontrada e conhecida no Brasil como canela-da-índia e canela-do-ceilão. O óleo essencial da canela pode ser obtido tanto das cascas como das folhas, sendo que a composição dos dois é completamente distinta. O óleo obtido da casca é utilizado na aromatização de alimentos, ao passo que o das folhas é utilizado na cosmética e na aromaterapia. O óleo presente na casca é de cor amarelo-amarronzada. É usado por seus efeitos antiespasmódicos, anti-inflamatório, antipirético, carminativo, antibacteriano, antisséptico, larvicida, mio-relaxante, sedante, anti-hipertensivo e inseticida (GROSSMAN, 2005).

É encontrado no óleo essencial da casca a presença de aldeído cinâmico (55%), seguido do eugenol (12%), enquanto que em folhas da canela, encontraram eugenol (94%) como composto majoritário e traços de aldeído cinâmico (1%) (KOKETSU et al., 1997).

### 2.6.4 Capim-limão (*Cymbopogon citratus*)

A espécie *Cymbopogon citratus* é conhecida nacionalmente como capim-cidreira, capim-limão, capim-santo ou capim-cidrão, e internacionalmente como *lemongrass*, pertence à família Poaceae, com longas folhas aromáticas, estreitas, agudas e ásperas com nervura central proeminente (LEAL et al., 2003).

Apresenta atividade farmacológica para vários distúrbios, tais como: insônia, nervosismo, má-digestão, flatulência, além de, antiespasmódico de tecidos uterinos e intestinais, antitérmico, diurético, antialérgico e analgésico, também há propriedades inseticidas (AKISUE et al., 1996).

É largamente empregado como aromatizante em perfumaria e cosmética, na preparação de colônias, sabonetes e desodorantes. Porém, seu maior emprego tem sido na indústria farmacêutica, servindo de material de partida para síntese de importantes compostos como iononas, metil-iononas e vitamina A (PRINS et al., 2008), tendo como principal componente o citral composto pela mistura dos isômeros geranial e neral (65-80%), além de limoneno, citronelal, mirceno e geraniol (LEAL et al., 2003).

As atividades antibacterianas e antifúngicas do óleo essencial de *C. citratus* foram atribuídas ao citral (GUERRA et al., 2000). O mirceno não apresentou atividade antimicrobiana, mas, quando associado ao citral potencializou seu efeito (ONAWUNMI; YISAK; OGUNLANA, 1984).

#### **2.6.5 Cardamomo (*Elettaria cardamomum*)**

O óleo essencial de cardamomo (*Elettaria cardamomum*) é usado para a indigestão, flatulência e para estimular o apetite. As sementes também são indicadas para tosse, resfriados, bronquite e asma. Além disso, possuem propriedades antibacterianas, antisséptico, carminativa e antiespasmódica (AL-ZUHAIR et al., 1996).

Os principais componentes do óleo essencial de cardamomo são 1,8-cineol,  $\alpha$ -acetato terpinyl, limoneno e linalol e mirceno, geralmente descrito como olfativo doce, picante, quente, levemente canforado e cítrico (BOISVERT; HUBERT, 1998).

#### **2.6.6 Citrus**

*Citrus* é um gênero de plantas da família Rutaceae, ordem Sapindales, originárias do sudeste tropical e subtropical da Ásia. Seus frutos são dentre as

espécies arbóreas as frutas mais importantes do mundo. O gênero *Citrus* é muito diversificado e é composto de numerosas espécies tais como: *Citrus sinensis* (Laranja), *Citrus paradisi* (*Grapefruit* – conhecida no Brasil por Toranja e, mais especificamente, na região sul por Pomelo), *Citrus deliciosa* (Mandarim), *Citrus limon* (Limão), *Citrus reticulata* (Tangerina) e *Citrus aurantifolia* (Lima) (SAIDANI; DHIFI; MARZOUK, 2004). Os frutos deste gênero são produzidos em vários países, dentre eles, os Estados Unidos lideram o mundo com um rendimento médio de 30 toneladas por hectare, seguido pelo Brasil e China com 20-25 e 18-20 toneladas respectivamente (ANWAR et al., 2008).

Seu uso farmacológico remonta da antiguidade e 23 indicações que lhe eram atribuídas nessa época são confirmadas por estudos atuais (ARIAS; RAMÓN-LACA, 2005). Possuem diversas ações terapêuticas conhecidas na medicina popular, como adstringente, alcalinizante do sangue e da urina, antianêmica, antibiótica, antisséptica, antiemética, antidepressiva, antiescorbútica, anti-inflamatória, antiespasmótica, antitérmica, bactericida, depurativa, diurética, expectorante, sedativa, sudorífera e vermífuga, também tem importância comercial, devido a seu uso na indústria dos licores, da perfumaria e confeitaria (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

Os óleos essenciais do gênero *Citrus* apresentaram como componentes principais o limoneno, alfa e beta pineno e sabineno (ATTAWAY; PIERINGER; BARABAS, 1966), concordando com Craveiro et al. (1981) que afirmam que maioria dos óleos essenciais dos frutos possui como componente principal o monoterpeno, limoneno, que é utilizado como matéria-prima para a obtenção de solventes, tintas, resinas e plásticos.

### **2.6.7 Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*)**

O cravo-da-índia, espécie *S. 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; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Entre os usos do eugenol destaca-se o emprego como antisséptico em odontologia e na fabricação de pastas dentais, em perfumaria, saboaria e como clarificador em histologia. O eugenol é também usado como matéria prima para a obtenção de vanilina, empregada na aromatização de doces, chocolates, sorvetes e tabacos (AMORIN, 1989).

#### **2.6.8 Funcho doce (*Foeniculum vulgare dulce*)**

O *Foeniculum vulgare*, denominado vulgarmente por funcho doce ou erva doce, pertence à família das Apiáceas. Distingue-se do funcho amargo pelo sabor doce e anisado das folhas e frutos. É uma planta espontânea da região mediterrânea, Norte de África e Oeste da Ásia. A sua utilização remonta aos tempos da antiga Grécia e Roma, não só pelas propriedades terapêuticas que lhe são atribuídas, como também pelas suas propriedades aromáticas (FONT-QUER, 1993).

Na indústria alimentar é utilizada toda a planta, entanto, atualmente, o produto com maior utilização é o óleo essencial do fruto seco, o qual tem vasta aplicação nas indústrias farmacêutica, cosmética e de perfumaria. Entre as principais propriedades farmacêuticas atribuídas ao óleo essencial do fruto do funcho doce destacam-se a ação carminativa, nas cólicas abdominais, expectorante e antiespasmódica, na bronquite e asma, e ainda a ação anti-

inflamatória, diurética e anti-séptica (PROENÇA-DA-CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003).

Os óleos essenciais apresentam como componentes majoritários o anetol (folha 47,8% e fruto 60,7%), a fenchona (folha 12,6% e fruto 22,8%) e o estragol (folha 10,0% e fruto 3,5%). O óleo da folha apresentou ainda uma quantidade apreciável de  $\alpha$ -felandreno (9,4%) ao contrário do óleo do fruto, no qual este composto foi minoritário (1,0%), assim como o mirceno (1,1%) e o  $\alpha$ -pineno (0,9%). Como componentes minoritários do óleo da folha, encontraram-se o sabineno (2,2%), o 1,8-cineol (1,6%), o  $\beta$ -pineno (1,3%) e o mirceno (1,2%) (TINOCO; MARTINS; CRUZ-MORAIS, 2007).

#### **2.6.9 Gengibre (*Zingiber officinale*)**

*Zingiber officinale*, também conhecido gengibre possui propriedades carminativas, digestivas, sudoríficas, antigripais e estimulantes. É utilizado para tratar dispepsias e cólicas intestinais, excelente quando adicionado a infusões a quente, muito útil contra gastrites alcoólicas. O odor do gengibre está diretamente relacionado ao seu óleo essencial, tendo rendimento que pode variar de 1% a 3%. Cerca de 50 componentes presentes no óleo já foram caracterizados, sendo a maioria monoterpenos (EVANS; SAUNDERS, 2002).

O óleo essencial de *Z. officinales* tem como constituintes químicos o gingerol, zingibereno,  $\beta$ -bisaboleno, zingerona,  $\beta$ -felandreno, citral, canfeno e cineol, entre outros (MARTINS et al., 1998).

#### **2.6.10 Sálvia (*Salvia sclarea*)**

A *Salvia sclarea*, pertencente à família Lamiaceae, é originária do Mediterrâneo. É considerada uma planta aromática e com propriedades

medicinais, sendo usada como condimento e na medicina doméstica (MARTINS et al., 1998). Diferentes espécies de sálvia foram estudadas para a especificação de suas atividades biológicas, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes, espasmódicas e colinérgicas (CAPASSO et al., 2004). Os compostos presentes no óleo essencial são biologicamente ativos e possuem ação farmacológica (DUKE, 2002).

O rendimento do óleo essencial é acima de 2,5%, embora possa apresentar rendimento menor, dependendo das condições climáticas de crescimento, colheita e local de origem. A cor é amarela pálida, odor forte, aromático, doce, fresco, quente, canforado, eucalipto, com um aroma e gosto ardente (FARREL, 1995).

Pierozan et al. (2009) identificaram o linalol, acetato de linalil e  $\alpha$ -terpineol como compostos majoritários da *S. sclarea*.

### **2.6.11 Orégano (*Origanum vulgare*)**

O gênero *Origanum* é uma erva anual, perene, nativa de regiões do mediterrâneo, Euro-Sibéria e Irano-Sibéria. Um total de 38 espécies de *Origanum* é reconhecido no mundo, sendo a maioria destas espécies, mais de 75%, concentradas na sub-região Leste-mediterrânea. As espécies de *Origanum* crescem abundantemente em encostas e montanhas rochosas numa ampla faixa de altitudes (0–4.000 m). Devido à variabilidade de características químicas e aroma, plantas de *Origanum*, pertencentes a diferentes espécies e ecotipos (biotipos), são amplamente utilizados na agricultura, indústria farmacêutica e cosmética, como erva culinária, aromatizando produtos alimentícios, bebidas alcoólicas e perfumaria devido à fragrância picante. Também tem sido usado como um remédio tradicional para tratar distúrbios convulsivos, digestivos e problemas menstruais (SAHIN et al., 2004).

A espécie *O. vulgare* é uma planta perene, aromática e condimentar conhecida como orégano, orégão, manjerona-silvestre ou manjerona-rasteira (SILVA JÚNIOR; VERONA, 1997).

O orégano emana um perfume fresco, intenso, herbáceo, sendo utilizado para fins aromáticos e condimentares. Seu óleo essencial é reconhecido cientificamente como potente bactericida e fungicida (CASTRO, 2004).

A atividade antimicrobiana do orégano é atribuída aos seus óleos essenciais que contêm terpenos como o carvacrol e timol, o  $\gamma$ -terpinene e o p-cimeno são precursores do timol e carvacrol, respectivamente, portanto, sua concentração no produto é proporcional aos teores de seus precursores (BURT, 2004).

Além da atividade antimicrobiana, os terpenos presentes no óleo essencial de orégano possuem também importante atividade antioxidante (ZHENG; WANG, 2001), pois são capazes de doar elétrons aos radicais livres reativos, tornando as moléculas mais estáveis ou não reativas (DORMAN et al., 2003).

#### **2.6.12 Tomilho (*Thymus vulgaris*)**

A espécie *T. vulgaris*, pertencente à família Lamiaceae, é uma planta semiarbustiva, de ciclo perene, que atinge até 50 cm de altura. Desenvolve-se formando touceiras com caules lenhosos, rasteiros e tortuosos. As folhas são pequenas, opostas, sésseis, de formato linear-lanceolado ou oblongo e com bordos enrolados para baixo. As flores são pequenas de coloração rosada, branca e agrupadas em inflorescência, em formato tipo espiga. O aroma é herbáceo e o sabor levemente picante, sendo amplamente empregado na culinária como condimento (NAGRAES, 2003).



As folhas e flores são usadas como condimento. Já a planta, sem a raiz, é utilizada para a extração do óleo essencial, que corresponde a um líquido vermelho amarelado, com ricos aromas doces, quentes e pungentes. Seu óleo essencial é rico em timol, apresentando traços de carvacrol, potentes bactericidas e fungicidas (ESSAWI; SROUR, 2000). Outros compostos fenólicos, como taninos e flavonóides, foram encontrados em extratos da planta, responsáveis pelas atividades antioxidantes, expectorantes, digestivas e anti-inflamatórias (SHAN, 2002).

Os óleos essenciais retirados de diferentes partes do *T. vulgaris* mostraram presença considerável de flavonóides e vitamina E, compostos de grande interesse na indústria alimentícia por sua atividade antioxidante (GUILLÉN; MANZANOS, 1998).

## **2.7 Emulsão cárnea**

Entre os produtos emulsionados mais consumidos no Brasil está a mortadela, a qual é caracterizada por apresentar como ingredientes principais a carne bovina, suína, toucinho, e aditivos como nitrito de sódio, ascorbatos e fosfatos.

A legislação brasileira define mortadela como um produto cárneo industrializado, obtido de uma emulsão das carnes de animais de açougue, acrescido ou não de toucinho, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, em diferentes formas e submetido ao tratamento térmico adequado (BRASIL, 2000).

Quando carne, gordura, água e sal são misturados e submetidos à alta velocidade, uma massa é formada, com características de emulsão óleo em água. A formação da emulsão cárnea típica consiste em entumescimento das proteínas, de gordura e água (HEDRICK et al., 1994).

A tecnologia aliou a funcionalidade da proteína cárnea a propriedades sensoriais que fizeram da mortadela um produto apreciado e consumido por todas as classes sociais (YUNES; BORON, 2006).

### **2.7.1 Micro-organismos em embutidos cárneos**

Os alimentos, quando não são manipulados adequadamente, podem veicular diversos micro-organismos, muitas vezes patógenos para o ser humano, como as bactérias *C. perfringens*, *S. aureus* e *E. coli* ou também deteriorantes, como *Pseudomonas fluorescens* e várias espécies de fungos (*Aspergillus* sp, *Fusarium* sp) causando diversos prejuízos para as indústrias alimentícias e problemas de saúde pública. Em se tratando de toxinfecções alimentares, o enfoque ocorre na contaminação bacteriana, uma vez que essa é a maior causa desse tipo de enfermidade (PEREIRA, 2006).

Geralmente, as bactérias são as principais responsáveis pela deterioração ou contaminação de carnes e produtos cárneos em função da alta atividade de água (entre 0,98 e 0,99), do pH relativamente elevado (entre 5,5 e 5,7) e por possuírem ótimas fontes de nutrientes (PORTO, 2006).

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece limites microbiológicos em mortadelas para os seguintes micro-organismos: *Salmonella* (ausência em 25 g), Clostrídios sulfitorredutores (máximo de  $5 \times 10^2$  UFC.g<sup>-1</sup>), Estafilococos coagulase positiva (máximo de  $3 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup>) e Coliformes termotolerantes (máximo de  $10^3$  micro-organismos/g de amostra).

A conservação de alimentos tornou-se um problema complexo para as indústrias, pois os produtos constantemente introduzidos no mercado exigem vida útil mais longa e maior garantia de segurança contra patógenos de origem alimentar. O uso excessivo de conservantes químicos é questionado em virtude de seu potencial carcinogênico, atributos teratogênicos e toxicidade residual.

Logo, há uma pressão sobre os fabricantes de alimentos para substituição destes agentes por alternativas de preservação classificadas como naturais, ademais os alimentos devem ser elaborados a partir de padrões sanitários que apresentem boa qualidade e segurança física, química e biológica.

## **2.8 *Clostridium perfringens***

*Clostridium perfringens* é caracterizado como bastonete anaeróbio, gram-positivo, formador de esporo oval-subterminal, encapsulado e não-móvel.

Para o cultivo, a bactéria requer pH ótimo de crescimento de 7,2, com mínimo entre 5,5 e 5,8 e máximo entre 8,8 e 9,0; são necessários 13 aminoácidos limitantes para seu crescimento; a atividade de água está compreendida na faixa de 0,93 a 0,97 e em concentrações de cloreto de sódio a 6% não há multiplicação (CATO; GEORGE; FINEGOLD, 1986).

Pode crescer entre 12-50°C, com crescimento lento na temperatura de 20°C. Em temperatura ótima de crescimento, 37-45°C, as colônias de *C. perfringens* crescem rapidamente, atingindo tempo de geração de 8-10 min e apresentando vigorosa produção de gás (ADAMS; MOSS, 1995).

*Clostridium Perfringens* é uma bactéria sulfito redutora, fermentadora de lactose, reduz o nitrato e hidroliza a gelatina. Seu crescimento é estimulado pela presença de carboidrato fermentável e inibido por 20% de bile (SILVA et al., 2007).

Apesar de ser classificado como micro-organismo anaeróbio, *C. perfringens* pode sobreviver e crescer em presença de oxigênio, sendo, portanto, anaeróbio aerotolerante (QUINN et al., 2005). Pode sobreviver em condições físico-químicas adversas, formando endósporos resistentes por diferenciação da célula bacteriana vegetativa, que exigem maior resistência e baixo metabolismo da bactéria. Em geral, na forma esporulada, os clostrídios podem sobreviver às

condições extremas como variações de temperatura, acidez do meio, radiação e agentes químicos (CATO; GEORGE; FINEGOLD, 1986).

A conversão do esporo em célula vegetativa é chamada de germinação e envolve três etapas: ativação, germinação e crescimento. A ativação pode ser alcançada por aquecimento a temperaturas subletais, respondem também a pH e álcool e diversos nutrientes como aminoácidos, açúcares, lactato e nicotinamida. Os endósporos de *C. perfringens* podem completar sua germinação em 20 minutos quando estão em presença de L-asparagina e íons  $k^+$  (PAREDES-SABJA et al., 2008). No período da germinação, o centro dos endósporos é transformado em citoplasma com ribossomos e área nuclear definida, enquanto o período de crescimento é caracterizado pela síntese de RNA, proteínas, membranas, parede celular e DNA (MITCHELL, 2001).

Comumente encontrado na microbiota intestinal dos humanos e de animais sadios, o aparecimento de patologias provocadas por esse microorganismo é dependente de circunstâncias que favoreçam o crescimento e a produção em doses elevadas de suas toxinas (GOMES et al., 2008).

*Clostridium perfringens* pode produzir mais de 13 toxinas diferentes, embora cada cepa produza apenas um número limitado destas. São classificados como tipos toxigênicos A, B, C, D ou E com base na produção de quatro toxinas principais: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ) e iota ( $\iota$ ) como apresentado na Tabela 1 (CARMAN et al., 2008).

*Clostridium perfringens* tipo A, C e D são patógenos humanos, enquanto os tipos B, C, D e E são patógenos de animais. O tipo A causa gangrena gasosa em homens, animais e toxinfecção alimentar em humanos; o tipo B é responsável por disenteria em alguns animais; o tipo C causa enterite necrótica (NE) em animais e humanos, além de enterotoxemia em bezerras, leitões e ovelhas; os tipos D e E causam enterotoxemia em carneiros, cordeiros e gado (FORSYTHE, 2002).

Tabela 1 Toxinas utilizadas para classificação de *C. perfringens* bem como a presença de enterotoxina e sua localização genética

Tipo	$\alpha$ -toxina	$\beta$ -toxina	$\epsilon$ -toxina	$\iota$ -toxina	Enterotoxina
A	+	-	-	-	+
B	+	+	+	-	+
C	+	+	-	-	+
D	+	-	+	-	+
E	+	-	-	+	+
Gene	<i>Plc</i>	<i>cpb1</i> <i>cpb2</i>	<i>Etx</i>	<i>iap</i> <i>ibp</i>	<i>Cpe</i>
Localização genética	Cromossomo	Plasmídeo	Plasmídeo	Plasmídeo	Plasmídeo/ Cromossomo

Fonte: Brynestad; Granum (2002).

### 2.8.1 *Clostridium perfringens* em alimentos

A toxinfecção alimentar causada por *C. perfringens* tipo A, é uma das mais comuns no mundo industrializado (restaurantes, hospitais e asilos), caracterizados por preparar grandes quantidades de refeições que são resfriadas lentamente ou insuficientemente reaquecidas, aumentando o número de bactérias, contribuindo para surtos alimentares. Os endósporos sobreviventes são responsáveis pela rara, mas severa enterite necrótica, devido à produção no intestino delgado da enterotoxina causando colapso nas propriedades de permeabilidade da membrana (BRYNESTAD; GRANUM, 2002).

*Clostridium perfringens* não é capaz de produzir 13 dos 20 aminoácidos padrão, logo, surtos relacionados a esse micro-organismo estão associados a alimentos ricos em proteínas onde, cerca de 75% dos casos são atribuídos à carne, produtos cárneos e aves (OLSEN et al., 2000).

A sensibilidade de *C. perfringens* ao oxigênio é menos acentuada do que a dos outros clostrídios, podendo crescer no interior de alimentos, pois apesar de não possuir a enzima catalase, possui as enzimas superóxido dismutase (SOD) e

NADH/NADPH peroxidase, que são amplamente distribuídas, removendo superóxidos e peróxidos (MITCHELL, 2001).

A produção de enterotoxina do *C. perfringens* (CPE) é associada à formação de endósporos *in vivo* estimulada pelas condições ácidas do estômago e pelos sais biliares do intestino. Durante o processo de esporulação, as células produzem enterotoxina CPE, que é acumulada no citoplasma da célula e liberada no organismo juntamente com endósporo maduro. A intoxicação pode ser ocasionada após a ingestão de  $10^7$  células vegetativas ou mais (BRYNESTAD; GRANUM, 2002).

A enterotoxina CPE liga-se aos receptores localizados no bordo em escova da célula epitelial intestinal de forma irreversível, interagindo com a membrana e causando o surgimento de poros pelos quais extravasa o conteúdo celular, induzindo a secreção de grande quantidade de líquidos, resultando em diarreia. Há grande eliminação de sódio e potássio e, a absorção de glicose é inibida. Contudo, é pouco provável que a toxina pré-formada em um alimento venha causar intoxicação, uma vez que grandes quantidades destas (8 a 10mg) são necessárias para o desenvolvimento dos sintomas. Além disso, a enterotoxina não resiste ao pH ácido do trato gastrointestinal, nem à ação das enzimas digestivas, sendo também termolábil (destruída a 60°C por 10 minutos). A doença é, na maioria das vezes, auto-limitante com duração de aproximadamente 24 horas, e o óbito pode ocorrer devido à desidratação, principalmente em idosos, crianças e imunodeprimidos. Devido ao caráter brando da doença e do tempo curto de duração dos sintomas, a maioria das pessoas não entra em contato com as autoridades sanitárias, e provavelmente o número de casos não é corretamente estimado. Somente adequadas rotinas de desinfecção e atenção às boas práticas de fabricação e manipulação irão eliminar esse problema (SILVA, 2000).

## 2.9 Emprego do nitrito em produtos cárneos

O nitrito é um sal de um ácido relativamente fraco e de uma base forte, constituindo uma substância cristalina, muito solúvel em água (ROÇA, 2005). A adição de nitrito, de sódio ou de potássio, em produtos curados apresenta três finalidades básicas: contribuir para o desenvolvimento de cor e sabor característicos de carnes curadas, inibir o desenvolvimento de micro-organismos e atuar como antioxidante (CASSENS, 1995)

Azanza e Rustia (2004) relatam que a principal finalidade do nitrato e do nitrito é atuar como agentes antimicrobianos e não como um aditivo para melhorias na cor, textura e flavor. Manhoso e Rudge (1999) concordam com a afirmação acima, relatando que a principal justificativa para o emprego do nitrito na elaboração de produtos cárneos se baseia no fato de prevenir o aparecimento de formas vegetativas e impedindo tanto a germinação quanto a multiplicação dos endósporos de *Clostridium* sp.

O nitrito de sódio e o nitrato de sódio possuem limites máximos para uso de 150 e 30 ppm, respectivamente, sendo que a quantidade residual máxima é expressa como nitrito de sódio. A mescla de aditivos com igual função pode ser utilizada, desde que a soma de todos os limites não seja superior ao limite máximo de nenhum deles (BRASIL, 1998).

O nitrito adicionado ao produto reage com a mioglobina e outros compostos presentes na carne e, portanto, uma parcela do nitrito é consumida por estas reações. Para que haja um controle eficaz sobre várias bactérias, dentre elas o *C. botulinum*, alguns autores consideram necessários aproximadamente 10 ppm de nitrito residual no produto final e afirmam que valores de adição inferiores a 150 ppm são insuficientes para se alcançar este nível residual e, portanto, não previnem o desenvolvimento deste micro-organismo (CASSENS, 1997).

Entretanto, Townsend e Olson (1984) e Muller (1991) citam valores de adição entre 75 a 150 ppm de nitrito para ação conservante, sendo a ação contra *C. botulinum* garantida apenas com a adição combinada de 1,5% a 2,0% de sal (NaCl) e cozimento até temperatura de 71°C. Na ausência de sal, o efeito inibitório do nitrito de sódio sobre micro-organismos diminui, visto que foram necessários níveis de nitrito acima 400 a 800 ppm para obter a ação protetora do nitrito contra micro-organismos.

Segundo suas propriedades bacteriostáticas, a ação inibitória do nitrito sobre micro-organismos está relacionada com a forma não associada do ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), um composto ativo (FEINER, 2006), o nitrito reage nas ligações das enzimas que apresentam ferro e enxofre em sua estrutura, impedindo a síntese de ATP (adenosina trifosfato) a partir do piruvato (essas enzimas atuam sobre o transporte de elétrons, na quebra do piruvato, originando ATP,  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$ ) (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Carpenter et al. (1987), analisando os efeitos do nitrito sobre o micro-organismo *C. botulinum* *in vivo* e *in vitro*, concluíram que os efeitos inibitórios foram, ao menos, em parte da inativação da piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFO) e da ferredoxina. Esses autores concluíram que a inibição foi resultado da destruição dos centros de ferro-enxofre das enzimas, devido à formação de complexos ferro-enxofre-óxido nítrico (Fe-S-NO).

De acordo com Feiner (2006), os sabores e aromas relacionados ao processo de cura são originados das reações entre o óxido nítrico (NO) e numerosas substâncias presentes em carnes como aldeídos, álcool e inosina, e para obter uma coloração característica, intensa e estável de produtos curados, são necessários de 30 a 50 ppm de nitrito por produto.

O nitrito também 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 reduções do  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$  que reduz o



número de íons ferro livre  $\text{Fe}^{3+}$  catalisadores da oxidação lipídica, sendo necessários cerca de 20 a 60 ppm de nitrito para que este atue como antioxidante (PEGG; SHAHID, 2000).

O nitrito ( $\text{NO}_2$ ), tanto de potássio quanto de sódio, é o agente ativo de cura; em contraste, o nitrato ( $\text{NO}_3$ ) não é um agente ativo, sendo reduzido a nitrito pela ação de bactérias nitrato redutoras, naturalmente presentes na carne (ZANARDI et al., 2002).

O nitrito é convertido a ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) e a óxido nítrico (NO). O NO formado se combina com a porção heme da metamioglobina para originar o pigmento de nitrosometamioglobina ( $\text{MbFe}^{+3}\text{NO}$ ), altamente instável e que é rapidamente reduzido à forma química de nitrosomioglobina ( $\text{MbFe}^{+2}\text{NO}$ ) (MOLLER; SKIBSTED, 2002).

Em ausência de oxigênio, o pigmento de nitrosomioglobina é estável, embora na presença de oxigênio a estabilidade do complexo é altamente dependente da taxa de dissociação do NO, visto que o oxigênio reage apenas com o NO livre, oxidando-o rapidamente a  $\text{NO}_2$ . Dessa forma, o pigmento de nitrosomioglobina ( $\text{MbFe}^{+2}\text{NO}$ ) é considerado instável, uma vez que a concentração de oxigênio, geralmente, é muito maior, substituindo o NO assim que este se dissocia da mioglobina (LIVINGSTON; BROWN, 1981). Além disso, outros oxidantes reagem com o NO, convertendo-o novamente a nitrato ( $\text{NO}_3$ ), que deverá ser convertido a nitrito ( $\text{NO}_2$ ) e deste novamente a NO, para então reagir com a mioglobina, ilustrando a natureza cíclica de oxirredução das reações de cura (MOHLER, 1982).

O complexo  $\text{MbFe}^{+2}\text{NO}$  é estabilizado através da desnaturação da molécula de globina pelo aquecimento (50-60°C), formando o pigmento nitrosoemocromo, que apresenta cor rósea, característica de produtos curados cozidos (RAMOS; GOMIDE, 2007).

O ácido nitroso, oriundo da hidratação do óxido de nitrito produzido pela redução do nitrito de sódio, pode reagir com aminas em produtos cárneos curados para formação de compostos N-nitrosos, em especial as nitrosaminas, sendo que estas possuem efeito tóxico, mutagênico, neuro, nefrotóxico e carcinogênicos (RYWOTYCKI, 2002). Sendo que, a formação de N-nitrosaminas em alimentos é controlada pela concentração residual de nitrito, já que a velocidade de sua formação é diretamente proporcional ao quadrado da concentração de nitrito (HILL, 1988).

Em adultos sadios, os nitratos e os nitritos são absorvidos pelo trato gastrointestinal, sendo o nitrato rapidamente excretado pela via renal. Os nitritos, por sua vez, podem combinar-se com a hemoglobina, transformando-a em meta-hemoglobina, por processo de oxidação do íon ferroso a íon férrico no complexo porfirínico. A metaemoglobina ( $\text{HbFe}^{+3}$ ) é incapaz de transportar oxigênio (CORTAS; WAKID, 1991). Níveis de  $\text{HbFe}^{+3}$  de 10% podem produzir cianose assintomática e, com níveis entre 20% e 30%, ocorre o aparecimento de cianose com sinais de hipoxia, astenia, dispneia, cefaleia, taquicardia e inconsciência, concentrações em níveis superiores a 50% podem ser fatais (BORONAT; PADROS; ALONSO, 1982).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local e condução do experimento

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, a produção das mortadelas e análise físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Carnes e Pescado do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras.

O experimento foi conduzido em três etapas. Inicialmente, verificou-se o efeito antibacteriano *in vitro* dos diversos óleos essenciais sobre *C. perfringens* Tipo A ATCC 13124, em seguida foram analisadas as combinações dos óleos essenciais de orégano, capim-limão, tomilho e cravo-da-índia sobre o micro-organismo estudado. A terceira etapa foi caracterizada pela fabricação de mortadelas contendo nitrato de sódio e óleos essenciais e suas combinações em concentrações pré-estabelecidas e, foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas durante o período de estocagem a 25 °C.

#### 3.2 Óleos essenciais avaliados

Os óleos essenciais de *Litsea cubeba* (pimenta chinesa), *Zingiber officinale* (gengibre), *Citrus limon* (limão-siciliano), *Citrus paradisi* (grapefruit), *Origanum vulgare* (orégano), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Myroxylon pereirae* (bálsamo), *Citrus reticulata* (tangerina), *Foeniculum vulgare Dulce* (funcho doce), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Syzygium officinalis* (sálvia), *Ocimum basilicum* (manjeriço/basilicão), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Thymus vulgaris* (tomilho) foram adquiridos da empresa

FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda e os constituintes químicos eugenol e carvacrol, foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

### 3.3 Micro-organismo padrão e obtenção do inóculo

A cepa utilizada no trabalho foi *C. perfringens* tipo A ATCC 13124, cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

As culturas estoque foram armazenadas em meio de congelamento (15 mL de glicerol; 0,5 g de peptona bacteriológica; 0,3 g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl e 100 mL de água destilada) e congeladas durante o período de execução do experimento.

A reativação da cepa foi realizada inoculando-se 10 µL de cada cultura em tubos contendo 10 mL de caldo clostridium suplementado com 0,5% de glicose e incubados a 37°C/24h em condições anaeróbicas. Após a incubação, retirou-se 10 µL dos inóculos e transferidos para 100 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) HIMEDIA<sup>®</sup> suplementado com 0,5% de glicose e incubados a 37°C/24h. A cada nova reativação a pureza foi verificada por meio de crescimento em meio seletivo e diferencial Ágar SPS (*Sulfite Polymyxin Sulfadiazine*) e coloração de Gram.

A padronização do inóculo foi realizada por meio da elaboração de curva de crescimento, o desenvolvimento do micro-organismo foi monitorado por espectrometria por meio da densidade ótica a 620nm e contagem direta em placas contendo BHI Ágar suplementado com 0,5% de glicose.

### 3.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Para a determinação da concentração mínima inibitória a metodologia utilizada foi a Difusão em Disco (NCCLS, 2000). Inoculou-se  $10^7$  UFC/mL de *C. perfringens* em meio de cultura, BHI Ágar, este foi vertido em placa e após a solidificação do meio adicionou-se discos de papel com 6 mm de diâmetro, que foram preenchidos com 5 µL de óleo essencial em diferentes concentrações. As diluições dos óleos essenciais foram preparadas com etanol, nas concentrações de 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0% sendo este último o controle negativo, para controle positivo foi utilizado solução de cloranfenicol com 1.000mg/L.

O procedimento foi realizado em três repetições em triplicata para cada óleo essencial e as placas foram incubadas a 37°C/24h em atmosfera anaeróbica, com auxílio de jarras de anaerobiose e geradores de atmosfera anaeróbica PROBAC®. Após esse intervalo, a mensuração dos halos de inibição formados foi realizada com paquímetro digital DIGIMESS®.

A concentração mínima inibitória foi definida como sendo a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento visível do micro-organismo testado.

### 3.5 Combinações entre óleos essenciais

Os óleos essenciais de orégano, tomilho, cravo-da-índia e capim-limão, foram selecionados dentre todos os óleos essenciais testados anteriormente devido ao efeito inibitório exercido sobre *C. perfringens*, sendo utilizados em sua concentração mínima inibitória (CMI), definido no item anterior, em combinações de três óleos. A Tabela 2 demonstra as diferentes proporções de óleos essenciais utilizadas em cada experimento.

Para avaliação do efeito inibitório da combinação entre os óleos essenciais utilizou-se a metodologia Difusão em Disco (NCCLS, 2000). As análises foram realizadas em três repetições em triplicata e as placas foram incubadas a 37°C/24h em condições anaeróbicas, com auxílio de jarras de anaerobiose e geradores de atmosfera anaeróbica PROBAC<sup>®</sup>. A mensuração dos halos de inibição foi realizada com paquímetro digital DIGIMESS<sup>®</sup>.

Tabela 2 Planejamento experimental para avaliação da combinação de três óleos essenciais, considerando a proporção referente à CMI de cada óleo analisado

Ensaio	Óleo A	Óleo B	Óleo C
1	1,00	-	-
2	-	1,00	-
3	-	-	1,00
4	0,50	0,50	-
5	0,50	-	0,50
6	-	0,50	0,50
7	0,67	0,17	0,17
8	0,17	0,67	0,17
9	0,17	0,17	0,67
10	0,33	0,33	0,33

Onde: 1,00 refere-se a CMI de cada óleo estudado, demais números representam as proporções dos óleos utilizadas baseando-se na CMI

### 3.6 Elaboração das amostras da emulsão cárnea

Para a fabricação da emulsão cárnea, utilizou-se a formulação típica de mortadela (Tabela 3) preparada com as mesmas concentrações de carne bovina, toucinho, gelo, fécula de mandioca, sal, fosfato, ácido ascórbico, para todos os tratamentos, variando as concentrações de nitrito de sódio, sendo 150 ppm o limite de nitrito permitido pela legislação e 75 ppm a metade desta concentração visando a utilização junto a óleos essenciais, sendo estas baseadas nos ensaios

microbiológicos *in vitro* (Tabela 4). Foram conduzidos três repetições por tratamento.

Tabela 3 Formulação padrão utilizada na elaboração do modelo de emulsão cárnea do tipo mortadela

Ingredientes	(%)
Carne bovina	58,5
Sal	1,9
Polifosfatos Foxmax	0,5
Ácido ascórbico	0,05
Água/gelo	20
Fécula de mandioca	5
Toucinho	14

Tabela 4 Proporções de diferentes combinações de óleos essenciais e concentrações de nitrito de sódio adicionados em mortadelas, baseados na CMI de cada óleo essencial

Ingredientes	Nitrito (ppm)	Orégano (%)	Tomilho (%)	Cravo (%)	Capim-Limão (%)
TRAT 1	150	-	-	-	-
TRAT 2	75	-	-	-	-
TRAT 3	75	3,1	-	-	-
TRAT 4	75	-	1,0	2,0	1,0
TRAT 5	75	2,5	0,3	0,6	-

Adicionou-se ao *cutter* para emulsificação a carne bovina previamente moída, sal, fosfato, nitrito, ácido ascórbico, água/gelo, fécula de mandioca, os óleos essenciais e o toucinho, seguindo esta ordem. Após a emulsificação a massa foi embutida manualmente em tripas sintéticas da marca CALEBRE e embaladas.

A cocção foi realizada por imersão em banho-maria conforme a seguinte programação: 60°C/2h; 70°C/1h; 80°C/20min. Todo o processo de cozimento foi monitorado com uso de termômetro para garantir uma temperatura final de

71<sup>0</sup>C no ponto frio da amostra. Após o cozimento as mortadelas foram mantidas em banho-de-gelo por 20 min.

Para cada repetição por tratamento foi fabricado um quilo da emulsão, embutidas em duas tripas com 500 gramas cada, uma destinada às análises físicas e químicas e outra para análises microbiológicas.

As mortadelas foram trituradas e as amostras destinadas as análises microbiológicas foram inoculadas com 10<sup>5</sup> UFC/g de *C. perfringens* ATCC 13124, homogenizadas em Stomacher Metroterm®, separadas em porções de 10g e seladas a vácuo em embalagens plásticas. As amostras destinadas à análise físico-químicas foram embaladas em porções de 30 gramas e seladas a vácuo, sem adição do inóculo.

As amostras foram armazenadas em estufa tipo BOD a 25<sup>0</sup>C, retiradas para análise nos tempos 1, 10 e 20 dias (Figura 5).



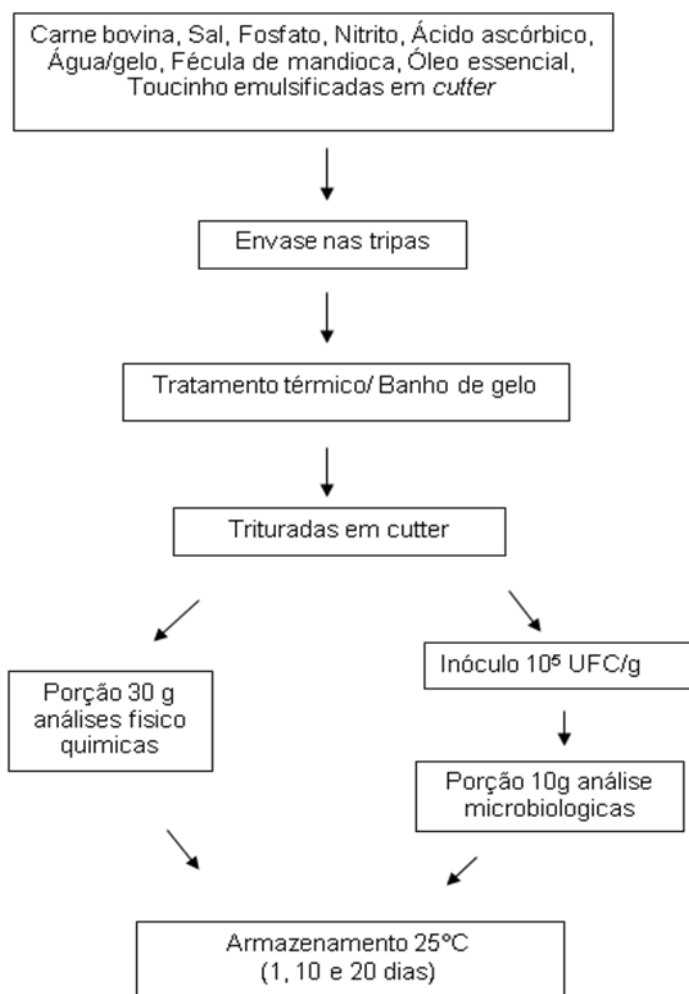


Figura 5 Fluxograma das etapas da fabricação e preparo das amostras dos tratamentos da mortadela

### 3.7 Análises microbiológicas

As embalagens contendo cerca de 10g do produto foram abertas de modo asséptico e homogenizadas em 90mL de água peptonada a 0,1% em Stomacher Metroterm<sup>®</sup> (490golpes/2min). Após diluições seriadas em água

peptonada 0,1%, alíquotas de 1 mL das diluições adequadas foram semeadas em ágar SPS (Sulfito Polimixina Sulfadiazina), seletivo para *Clostridium*, empregando-se a técnica de plaqueamento em sobrecamada. As análises foram realizadas em triplicata e, as placas incubadas a 37°C/24h. Após a incubação foram realizadas a Contagem Total em Placas.

### **3.8 Análises físico-químicas**

Dentre as análises físico-químicas foram avaliadas atividade de água, nitrito residual, oxidação lipídica e cor objetiva.

#### **3.8.1 Atividade de água**

A atividade de água (Aa) foi determinada em aparelho AQUALAB® (modelo CX2, Dacagon Devices Inc.), que utiliza a técnica de determinação do ponto de orvalho em espelho encapsulado para medir a atividade de água de um produto.

#### **3.8.2 Concentração de nitrito residual**

A concentração de nitrito residual no produto foi determinada segundo a metodologia oficial nº 973.31 da AOAC (1995). Aproximadamente 10 g de amostra foram pesadas e homogeneizadas em 40 mL de água destilada a 80°C. A solução foi transferida para um balão de 500 mL, com lavagens sucessivas, utilizando-se água destilada a 80°C até o volume de ±300mL. Em seguida, o balão foi submetido a banho-maria, a 80°C, por 2 horas, sendo agitado ocasionalmente. Após esse período, os balões foram retirados e resfriados à temperatura ambiente, o volume do balão foi completado com água destilada e a

solução foi filtrada. Em seguida, transferiu-se 45 mL do filtrado para tubo Falcon de 50 mL, sendo adicionados 2,5 mL de sulfanilamida, homogenizado, e após 5 minutos, 2,5 mL de reagente NED (N-(1-naftil) etilenodiamino) foi adicionado e a mistura homogenizada. A solução foi mantida em repouso por 15 minutos e em seguida, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A análise das amostras foi realizada em triplicatas.

Os valores de nitrito residual foram expressos em partes por milhão (ppm), por meio da curva padrão de nitrito de sódio.

### **3.8.3 Índice de TBARs**

O grau de oxidação lipídica foi mensurado por meio do índice de TBAR, seguindo a metodologia proposta por Raharjo et al. (1992) com pequenas modificações. Três porções de 10g de amostra foram coletadas, trituradas, adicionadas de 40 mL de ácido tricloroacético a 5% (TCA 5%) e 1 mL de antioxidante BHT 0,15% (em etanol) e homogeneizadas, por 1 minuto, em Politron. A seguir, procedeu-se a filtração e o volume foi ajustado para 50 mL, em balão volumétrico, com TCA 5%. Alíquotas de 2 mL foram retiradas, adicionadas de 2 mL do reagente de TBA 0,08 M, homogeneizadas e submetidas a banho-maria fervente por exatos 5 minutos. Após resfriar em água corrente, foi conduzida a leitura da absorbância a 531 nm.

Os valores foram expressos em miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra (mg de MA/kg) por meio do cálculo: valor da absorbância lida x 7,38 (fator de conversão).

### 3.8.4 Análise da cor objetiva

As leituras de cor das amostras foram obtidas em um espectrofotômetro Konica Minolta CM-5. Para o cálculo dos índices de cor, foram estabelecidos o iluminante A e o sistema de cor CIELAB luz especular excluída.

Os parâmetros de cor luminosidade ( $L^*$ ), índice de vermelho ( $a^*$ ), índice de amarelo ( $b^*$ ), índices de saturação ( $C^*$ ) e o ângulo de tonalidade ( $h^*$ ) foram obtidos considerando-se o valor médio de cinco leituras realizadas em diferentes pontos das amostras embaladas a vácuo. Para acompanhar as mudanças de cor nas amostras, avaliou-se o índice de descoloração, utilizando as razões de reflectâncias 650/570nm como sugeridas por Ramos e Gomide (2007).

### 3.9 Análise estatística

A análise da combinação dos óleos essenciais foi submetida à análise dos componentes principais (Principal component analysis, PCA). Os dados foram pré-processados por autoescalamento antes das análises e foram realizados no software MATLAB (Versão 7.5, 2007).

As análises microbiológicas e físico-químicas foram dispostas em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 5x3, sendo cinco tratamentos (nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais) em três tempos de armazenamento com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e superfícies de respostas foram realizadas com o software STATISTICA versão 5.0, da STATSOFT, sendo a comparação entre as médias estabelecidas pelo teste de Tukey, adotando um nível de 5% de significância.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A capacidade das especiarias e óleos essenciais em inibir o crescimento bacteriano permite que os mesmos sejam utilizados como antimicrobianos naturais nas indústrias de alimentos. Neste contexto, foi necessário verificar em quais concentrações os mesmos devem ser utilizados. Para tal, testes *in vitro* que determinem as concentrações que apresentam efeito bacteriostático ou inibitório foram realizados.

### 4.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Os óleos essenciais de capim-limão, orégano, tomilho e o composto químico carvacrol, promoveram zona de inibição com CMI de 3,12%, como pode ser observado na Tabela 5, enquanto os óleos essenciais de bálsamo, cravo-da-índia e o composto químico eugenol com CMI de 6,25% e os óleos de canela e pimenta chinesa apresentaram atividade antibacteriana a 12,5%.

Entretanto, os óleos essenciais de alecrim, manjerição, funcho doce, gengibre, grapefruit, limão-siciliano, sálvia e tangerina não apresentaram atividade antibacteriana em nenhuma das concentrações testadas sobre *C. perfringens* tipo A.

O halo inibitório médio do controle positivo (solução de cloranfenicol 1000mg/L) foi de aproximadamente 16,5 mm, não sendo observado formação de halos inibitórios no controle negativo (etanol 95%), os valores dos halos inibitórios médio de todos os óleos essenciais testados podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5 Espécies, com respectivo nome popular, composto majoritário, concentração mínima inibitória (CMI) e valor médio do halo de inibição de diferentes óleos essenciais sobre *Clostridium perfringens* tipo A

	Nome popular	Compostos majoritários	CMI	Halo inibitório (mm)
<b>Composto Químico</b>				
			3,12%	2,04
			6,25%	1,12
<b>Espécie</b>				
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim-limão	Citral	3,12%	0,85
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Carvacrol	3,12%	1,37
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho	Timol	3,12%	0,76
<i>Myroxylon pereirae</i>	Balsamo	Benzoato de benzila	6,25%	3,37
<i>Syzygium aromaticum</i>	Cravo-da-índia	Eugenol	6,25%	2,47
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Canela	Aldeído cinâmico	12,5%	4,62
<i>Litsea cubeba</i>	Litsea cubeba/ Pimenta chinesa	Citral	12,5%	6,65
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	1-8 cineol	-	-
<i>Ocimum basilicum</i>	Basilicão/Manjerição	Linalol	-	-
<i>Elettaria cardamomum</i>	Cardamomo	Alfa-terpineol	-	-
<i>Foeniculum vulgare Dulce</i>	Funcho doce	Anetol	-	-
<i>Zingiber officinale</i>	Gengibre	Zingibereno	-	-
<i>Citrus paradise</i>	Grapefruit	Limoneno	-	-
<i>Citrus limon</i>	Limão-siciliano	Limoneno	-	-
<i>Sálvia Sclarea</i>	Sálvia	Linalol	-	-
<i>Citrus reticulata</i>	Tangerina	Limoneno	-	-

Devido à variabilidade de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, observa-se que sua atividade antibacteriana não é atribuída somente a um mecanismo específico, havendo diferentes alvos na célula bacteriana (CARSON et al., 2002), como são lipofílicos, atravessam a parede celular e a membrana citoplasmática, desestabilizando estruturas como camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, podem induzir a coagulação do citoplasma e provocarem danos aos lipídios e proteínas intracelulares, afetando diretamente a força próton motiva (BURT, 2004).

Confirmando os resultados encontrados nesse experimento, alguns estudos demonstram que os óleos essenciais contendo carvacrol, timol e eugenol possuem maior atividade antimicrobiana que outros óleos essenciais que não possuem estes compostos (OUATTARA et al. 1997).

O óleo essencial de orégano, o qual contém aproximadamente 70% de carvacrol, apresentou a mesma CMI de seu composto majoritário carvacrol (3,12%). Observou-se o mesmo com o cravo-da-índia, que contém cerca de 70% de eugenol e, apresentou a mesma CMI do seu composto majoritário (6,25%). Os óleos essenciais contendo limoneno como composto majoritário (*grapefruit*, limão-siciliano e tangerina) não apresentaram atividade antibacteriana em nenhuma das concentrações testadas.

Houve diferença entre as CMI dos óleos essenciais de capim-limão e *litsea cubeba*, os quais têm como composto majoritário o citral. A diferença observada entre os óleos essenciais de capim-limão e *litsea cubeba* pode ser decorrente da concentração destes componentes no óleo essencial, tendo como componente majoritário o citral composto pela mistura dos isômeros geranial e neral que representa 30-43% do óleo essencial de *litsea cubeba*, enquanto representa 65-80% do óleo essencial de capim-limão.

Alguns estudos foram encontrados com os mesmos óleos essenciais testados neste trabalho, porém há poucos relatos referentes ao *C. perfringens*,

provavelmente devido à dificuldade em se trabalhar com esta bactéria por ser anaeróbica.

Coutinho et al. (2010) testaram o óleo essencial de *Satureja montana* L. em várias concentrações, tendo a CMI de 1,56% sobre *C. perfringens* tipo A, enquanto Oussalah et al. (2007) ao avaliar 28 óleos essenciais sobre *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, observaram efeito antibacteriano atribuídos ao carvacrol (composto majoritário dos óleos essenciais de *Corydothymus capitatus* e *Origanum heracleoticum*), aldeído cinâmico (composto majoritário do óleo de *Cinnamomun cassia* e *Cinnamomum verum*) e ao timol presente no óleo de *Satureja montana*.

Rota et al. (2008) mostram que óleos essenciais de várias espécies de *Thymus* possuem propriedades antimicrobianas e são considerados ingredientes importantes para a indústria de alimentos, visto que todos proporcionaram grande inibição de várias espécies de bactérias.

Alguns estudos demonstraram que óleos essenciais de orégano, tomilho e alecrim estão entre os antimicrobianos existentes mais ativos (DIMITRIJEVIC et al., 2007).

Diferentemente dos resultados encontrados neste estudo, Koroch, Juliani e Zygadlo (2007) observaram que atividade antibacteriana tanto sobre bactérias gram-positivas quanto para gram-negativas.

A atividade antibacteriana de óleos essenciais de orégano, tomilho, manjeriço, manjerona, capim-cidreira, gengibre e cravo foi investigada desafiando linhagens gram-positivas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*) e gram-negativas (*E. coli* e *S. Enteritidis*), os valores da CMI variaram de 0,05% (óleo de capim-cidreira) a 0,46% (óleo de manjerona) para bactérias gram-positivas e de 0,10% (óleo de cravo) para 0,56% (óleo de gengibre) para linhagens gram-negativas (BARBOSA et al., 2009). Assim como o óleo essencial de manjeriço tem apresentado atividade antibacteriana sobre diversas bactérias, (*Bacillus*



*cereus*, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* dentre outras) (CAROVIC-STANKO et al., 2010), mas não se mostrou efetiva contra *C. perfringens* utilizado neste experimento.

#### 4.2 Combinação entre óleos essenciais

A Figura 6A demonstra o efeito inibitório das combinações dos óleos essenciais de orégano, tomilho e cravo-da-índia sobre *C. perfringens*. As concentrações de óleos essenciais que proporcionaram maior halo de inibição foram aquelas contendo as maiores proporções de óleo essencial de orégano.

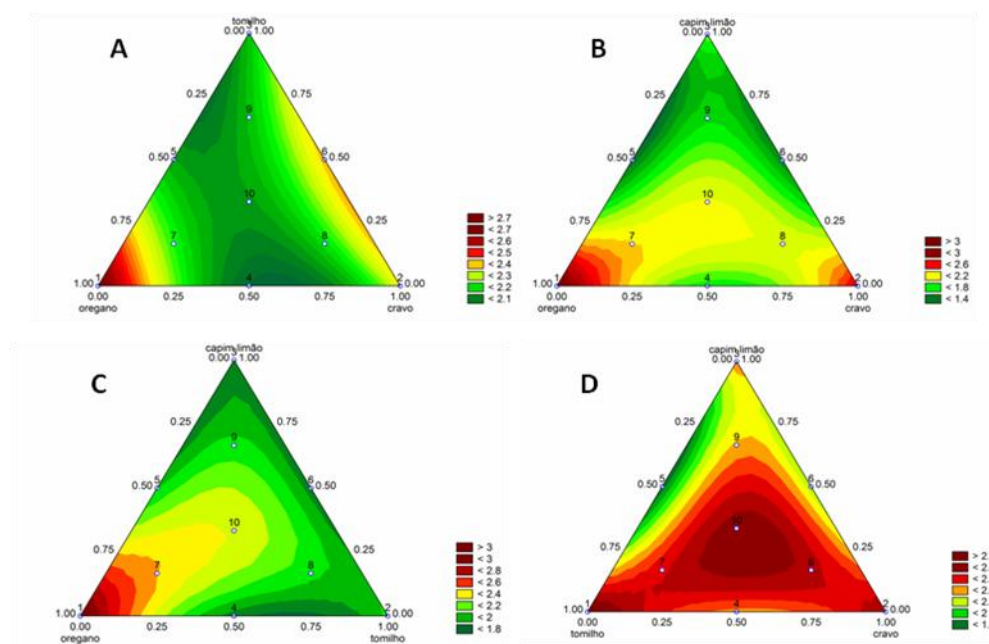
Entre as combinações dos óleos essenciais de orégano, capim-limão e cravo-da-índia, observou-se maior efeito inibitório quanto maiores as proporções do óleo de orégano. Houve pequena zona de inibição convergindo para o cravo-da-índia, enquanto maior a proximidade de maiores concentrações do óleo essencial de capim-limão houve menor zona de inibição (Figura 6B).

A Figura 6C representa o efeito antibacteriano da combinação dos óleos essenciais de orégano, capim-limão e tomilho. Pôde-se observar maior efeito inibitório de acordo com o aumento das concentrações de óleo essencial de orégano e redução das proporções de óleo essencial de capim-limão, não sendo observados efeito sinérgico nem antagônico da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre o *C. perfringens* tipo A.

A Figura 6D demonstra o efeito antibacteriano das combinações dos óleos essenciais de tomilho, capim-limão e cravo-da-índia sobre *C. perfringens* tipo A. As concentrações de óleos que proporcionaram maior halo de inibição foram aquelas contendo as menores proporções de óleo essencial de capim-limão.

Os resultados das combinações dos óleos essenciais de orégano, tomilho, capim-limão e cravo-da-índia demonstraram que o óleo essencial de

orégano foi o que mais contribuiu para a inibição do *C. perfringens* tipo A, dentre os óleos testados.



**A:** Óleos essenciais de orégano, tomilho e cravo-da-índia; **B:** Óleos essenciais de orégano, capim-limão e cravo-da-índia; **C:** Óleos essenciais de orégano, capim-limão e tomilho; **D:** Óleos essenciais de tomilho, capim-limão e cravo-da-índia sobre *C. perfringens* tipo A.

Figura 6 Halo inibitório (mm) das combinações de óleos essenciais sobre *C. perfringens* tipo A

A Figura 7 representa os pesos para análise dos componentes principais (PCA), confirmando os resultados anteriores ao indicar maiores halos inibitórios em proporções mais altas de óleo essencial de orégano e proporções mais baixas de óleo essencial de capim-limão.

Os óleos essenciais de cravo e tomilho apresentaram efeitos de menor intensidade sobre a inibição de *C. perfringens* quando comparados ao óleo

essencial de orégano, entretanto são mais eficientes que o óleo essencial de capim-limão.

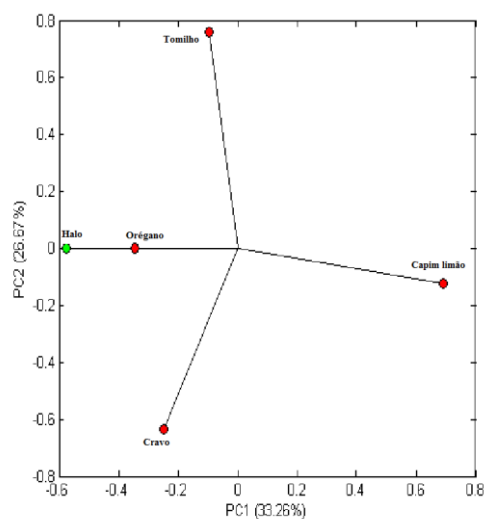
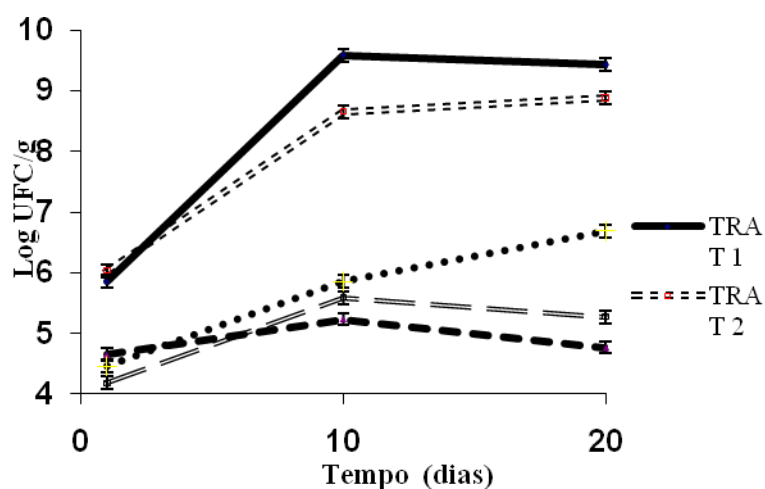


Figura 7 Pesos de Análise de Componentes Principais (PCA) das combinações dos óleos essenciais de orégano, tomilho, capim-limão e cravo-da-índia sobre *C. perfringens* tipo A

Bakkali et al. (2008) afirma que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é atribuída principalmente aos seus compostos majoritários. Entretanto, existem evidências de que componentes minoritários têm importante papel na atividade antimicrobiana do óleo essencial, promovendo ação sinérgica entre os demais (BURT, 2004). Alguns estudos têm concluído que os óleos essenciais têm maior atividade antibacteriana quando em combinação, pois um componente pode ter efeito mínimo quando isolado e quando em combinação pode ter seu efeito potencializado (CAIXETA, 2010).

### 4.3 Atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre *C. perfringens* tipo A inoculados em mortadela

As contagens de células viáveis de *C. perfringens* em mortadelas, armazenadas a 25°C por 20 dias são apresentados na Figura 8.



TRAT 1: 150 ppm nitrito de sódio; TRAT 2: 75 ppm nitrito de sódio; TRAT 3: 75 ppm nitrito de sódio e óleo essencial de orégano (3,1%); TRAT 4: 75ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de tomilho (1%), cravo-da-índia (2%) e capim-limão (1%); TRAT 5: 75ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de orégano (2,5%), tomilho (0,3%) e cravo-da-índia (0,6%).

Figura 8 Crescimento de *C. perfringens* tipo A ATCC 16124 em mortadelas adicionadas de nitrito de sódio e diferentes combinações de óleos essenciais armazenado a 25°C por 20 dias

A adição de 150 e 75 ppm de nitrito (TRAT 1 e 2) no produto não inibiu o crescimento de *C. perfringens* no primeiro dia de armazenamento. Porém, no mesmo período de tempo, nos tratamentos onde diferentes combinações de óleos essenciais foram adicionadas (TRAT 3, 4 e 5) houve redução do número de *C. perfringens*. Observou-se que entre os tratamentos contendo também óleos

essenciais, aquele com orégano, tomilho e cravo-da-índia (TRAT 5) promoveu a maior redução de *C. perfringens* no produto.

Como o observado no primeiro dia de armazenamento a presença do nitrito, tanto na concentração de 75ppm quanto na de 150 ppm, não inibiram o crescimento de *C. perfringens* na mortadela durante todo o tempo de seu armazenamento a 25°C, ocorrendo aumento de 3,72 e 2,62 log de UFC/g após 10 dias para o TRAT 1 e 2 respectivamente, não sendo observado aumento significativo do número de células viáveis após este período.

Também foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) do número de UFC/g de *C. perfringens* nos tratamentos contendo óleos essenciais, exceto no TRAT 3, após 10 dias de armazenamento a 25°C, contudo esse incremento foi significativamente menor que aquele observado nos tratamentos contendo apenas nitrito.

A adição à mortadelas, contendo 75ppm de nitrito, de combinações de três óleos, TRAT 4: tomilho, cravo-da-índia e capim-limão, e TRAT 5: orégano, tomilho e cravo-da-índia, não inibiu o contínuo aumento de número de UFC/g de *C. perfringens*, que chegou a 2,22 (TRAT4) e 1,11 log UFC/g (TRAT 5). Entretanto esses valores foram menores que aqueles obtidos nos tratamentos sem óleos essenciais.

Apenas no TRAT 3 (3,1% de óleo essencial de orégano) não foi observado aumento significativo ( $P > 0,05$ ) do número de UFC/g de *C. perfringens* durante todo o tempo de armazenamento, evidenciando o efeito inibitório do óleo essencial de orégano sobre a bactéria, corroborando os resultados obtidos no ensaio in vitro (CMI) onde o óleo essencial de orégano mostrou-se o mais efetivo dentre todos os óleos e suas combinações testados.

A utilização de nitrito em produtos cárneos tem como objetivo principal inibir o crescimento de *C.botulinum*, contudo trabalhos mostram que ele também pode inibir o crescimento de *C. perfringens* (FEINER, 2006).

O nitrito adicionado ao produto pode reagir com outros compostos presentes na carne, portanto Cassens (1997) considera necessário aproximadamente 10 ppm de nitrito residual no produto final para que este atue como antimicrobiano, este resultado é encontrado neste estudo, onde as mortadelas contendo óleos essenciais tiveram maior concentração de nitrito residual que as demais e conseqüentemente melhor efeito antibacteriano.

A Portaria nº 1.004, de 11 de dezembro de 1998 da ANVISA estabelece o limite de 150 ppm de nitrito de sódio ou potássio em produtos cárneos. Assim, foi utilizada essa concentração nas mortadelas inoculadas com *C. perfringens*, sendo considerado esse o tratamento controle. Entretanto, nas condições utilizadas o nitrito não foi efetivo em inibir o crescimento da bactéria.

Sabe-se que o nitrito reage com a enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductase (PFO) pertencente ao sistema fosforoclástico de *C. botulinum* (CARPENTER et al., 1987). Entretanto pode não ser efetivo contra *C. perfringens* uma vez que já foi demonstrado que o nitrito pode não reagir com a PFO dessa bactéria (McMINDES; SIEDLER, 1988).

Contudo, Coutinho *et al.* (2011) mostraram que a adição de 100 ppm de nitrito em emulsão cárnea reduziu o crescimento de *C. perfringens* em relação ao produto sem adição do nitrito após um dia de armazenamento, evidenciando a ação bacteriostática do nitrito sobre o *C. perfringens*, e em mortadelas elaboradas com 100 ppm de nitrito e 0,78% de óleo essencial de *Satureja montana*, estes autores observaram uma pequena redução sobre o *C. perfringens*, tornando possível a redução de nitrito de sódio quando associado ao óleo essencial. Entretanto também observaram aumento no número de células viáveis de *C. perfringens* nas mortadelas durante seu armazenamento, sendo este fato atribuído a temperatura de estocagem (25<sup>o</sup>C) e aos fatores intrínsecos do produto.

Vários estudos têm demonstrado a eficiência da utilização de óleos essenciais como antimicrobianos naturais e são considerados fontes potenciais de aditivos para a indústria de alimentos (COUTINHO *et al.* 2011; ISMAIEL; PIERSON, 1990; MEJLHOLM; DALGAARD, 2002; ROTA *et al.*, 2008; ULTEE; SMID, 2001).

A concentração de bactérias do ácido láctico em carnes foi reduzida em 4 log UFC/g quando essas foram adicionadas de 0,4% de óleo essencial de orégano (ZAIKA; KISSINGER; WASSERMAN, 1983). A vida útil de carne de cordeiro foi alterada quando adicionada de 0,1% de óleo essencial de tomilho sendo de 7 dias quando embaladas em atmosfera modificada, 9-10 dias quando adicionadas de 0,1% de óleo essencial de tomilho e 21-22 dias quando adicionadas de 0,1% de óleo essencial de tomilho e embaladas sob atmosfera modificada (KARABAGIAS; BADEKA; KONTOMINAS, 2011).

A atividade do óleo essencial de orégano sobre endósporos de *C. botulinum* foram estudadas em carne suína embaladas a vácuo, e concentrações de 0,4 µg/mL não influenciaram significativamente o número de endósporos ou reduziram o crescimento de bactérias. Entretanto combinado com pequenas concentrações de nitrito, houve redução significativa na formação de endósporos e crescimento bacteriano (ISMAIEL; PIERSON, 1990). Também foi observado redução de 2-3 log UFC/g na microbiota inicial de filés de carne bovina após a adição de 0,8% de óleo essencial de orégano (TSIGARIDA; SKANDAMIS; NYCHAS, 2000).

Juntamente com a inibição do crescimento de células vegetativas, o carvacrol (composto químico majoritário do óleo essencial de orégano) mostrou-se eficiente na inibição da produção de toxinas de *B. cereus*. As teorias para a limitação da síntese de toxinas são: insuficiência de ATP e força próton motiva para exportar a toxina para o meio intracelular e/ou um maior consumo de

energia para manutenção da viabilidade celular, prejudicando os estoques energéticos para a síntese da toxina (ULTEE; SMID, 2001).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais ainda é discutido, provavelmente, danificam vários sistemas enzimáticos, inclusive os envolvidos na produção de energia celular e síntese de compostos estruturais. A presença de óleos essenciais interfere também no mecanismo de reparo necessário para a divisão celular. Sugere-se, ainda, que cause danos ou lesões na membrana citoplasmática, permitindo que os componentes antimicrobianos dos óleos migrem mais rapidamente para o interior da célula, alterando o metabolismo normal (CONNER; BEUCHAT, 1984). O estudo do proteoma de *Salmonella* cultivada em concentrações sub letais de timol mostrou que esse composto majoritário presente em vários óleos essenciais ativa mecanismos de proteção ao estresse térmico, oxidativo e osmótico, influencia o sistema de absorção de glicose, diminuindo sua atividade, e estimula o sistema de efluxo (DI PASQUA et al., 2010).

Contudo as aplicações de óleos essenciais em alimentos geralmente apresentam sua eficácia reduzida por certos componentes (GLASS; JOHNSON, 2004). Em geral, supõe-se que elevados níveis de gordura e/ou proteínas presentes nos alimentos podem proteger as bactérias da ação dos óleos essenciais, reduzindo a disponibilidade destes (MEJLHOLM; DALGAARD, 2002), já os carboidratos não parecem proteger as bactérias das ações de óleos essenciais tanto quanto a gordura e as proteínas, entretanto elevada atividade de água e altas concentrações de sal facilitam a ação destes antimicrobianos (TSIGARIDA; SKANDAMIS; NYCHAS, 2000). Visto que as mortadelas apresentam um percentual de aproximadamente 9,95% de gordura (COUTINHO, 2010), estas podem favorecer a redução do efeito inibitório dos óleos essenciais testados neste estudo.



Devido à elevada concentração de *C. perfringens* inoculado, as mortadelas apresentaram-se completamente deterioradas ao final dos 20 dias de armazenamento, apresentando odor desagradável característico e presença de gás, resultado da característica da bactéria que é sacarolítica, portanto fermenta carboidratos produzindo ácidos butíricos e acético, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> (SCOTT; ANDERSON; WANG, 2001).

#### 4.4 Atividade de água

A atividade de água (Aa) não foi afetada significativamente ( $P > 0,05$ ) pela quantidade de nitrito de sódio e óleos essenciais adicionadas as mortadelas, observando em todos tratamentos Aa superior a 0,97. Entretanto houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os dias de armazenamento, com um pequeno aumento da atividade de água no décimo dia como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 Atividade de água em mortadelas adicionadas de nitrito de sódio e diferentes combinações de óleos essenciais armazenadas a 25<sup>o</sup>C durante 20 dias

Dia	Aa
1	0,98 <sup>x</sup>
10	0,99 <sup>y</sup>
20	0,98 <sup>x</sup>

Médias seguidas de uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

A atividade de água presente em todos os tratamentos das mortadelas durante o armazenamento foram acima de 0,97 favorecendo o crescimento de vários micro-organismos, dentre eles *C. perfringens*, cuja Aa está compreendida acima de 0,93, como observado neste estudo.

A atividade de água limitante para o crescimento de determinado micro-organismo depende ainda de outros fatores intrínsecos, como pH, potencial de oxido-redução, entre outras características que podem agir simultaneamente, e quando esses fatores provocam um afastamento das condições ótimas para a multiplicação de determinado micro-organismo, mais alto será o valor de  $A_w$  necessária para seu crescimento (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

#### 4.5 Nitrito residual

Foram observados efeitos significativos ( $P < 0,05$ ) da interação entre os tratamentos e tempo de estocagem das mortadelas para o nitrito residual das amostras, os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 Nitrito residual em mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais armazenadas a 25°C durante 20 dias

Tratamento	Nitrito residual (ppm)		
	Dia 1	Dia 10	Dia 20
TRAT 1	39,83 <sup>ax</sup>	14,37 <sup>ay</sup>	7,19 <sup>az</sup>
TRAT 2	27,05 <sup>bx</sup>	17,55 <sup>ay</sup>	4,97 <sup>az</sup>
TRAT 3	30,33 <sup>bx</sup>	26,92 <sup>by</sup>	18,18 <sup>bz</sup>
TRAT 4	18,73 <sup>c</sup>	17,93 <sup>a</sup>	15,32 <sup>b</sup>
TRAT 5	35,14 <sup>ax</sup>	20,10 <sup>ay</sup>	18,87 <sup>by</sup>

TRAT 1: 150 ppm nitrito de sódio; TRAT 2: 75 ppm nitrito de sódio; TRAT 3: 75 ppm nitrito de sódio e óleo essencial de orégano (3,1%); TRAT 4: 75 ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de tomilho (1%), cravo-da-índia (2%) e capim-limão (1%); TRAT 5: 75 ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de orégano (2,5%), tomilho (0,3%) e cravo-da-índia (0,6%). Médias seguidas por letras diferentes (a,b,c,d,e) na coluna, e na linha (x,y,z) diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey

No último dia de armazenamento os TRATs 1 e 2 contendo apenas nitrito de sódio sem óleos essenciais não se diferiram entre si ( $P > 0,05$ ), assim como os TRATs 3, 4 e 5.

Houve uma redução gradativa do nitrito residual com o período de armazenamento em todos os tratamentos das mortadelas. Nos TRATs 1, 2 e 3 foi

observada uma redução do primeiro ao último dia de armazenamento, enquanto no TRATs 4 foram observadas reduções significativas durante toda a estocagem, entretanto no TRAT 5 houve uma redução do nível de nitrito a partir do décimo dia de armazenamento e manteve sem alterações significativas até o fim da estocagem.

Até o décimo dia foram conseguidos níveis de nitrito residual acima de 10 ppm em todos os tratamentos, entretanto após este período somente os tratamentos contendo óleos essenciais mantiveram esta quantidade de nitrito residual.

Portanto, foi observado um fator positivo entre a adição de óleos essenciais e a manutenção de nitrito residual entre as amostras, possivelmente porque os óleos essenciais reagiram com o nitrito impedindo que estes se ligassem a outros componentes, ou os óleos essenciais reagiram com os pigmentos da carne deixando o nitrito disponível.

O nitrito adicionado ao produto reage com a mioglobina e outros compostos presentes na carne e, portanto, uma parcela deste é consumida por estas reações. Para que haja um controle eficaz sobre várias bactérias, dentre elas o *C. botulinum*, alguns autores consideram necessários aproximadamente 10 ppm de nitrito residual no produto final e afirmam que valores de adição inferiores a 150 ppm são insuficientes para se alcançar este nível residual e, portanto, não previnem o desenvolvimento deste micro-organismo (CASSENS, 1997).

Depois do nitrito ( $\text{NO}_2$ ) ser adicionado ao sistema cárneo, aproximadamente de 1% a 10% é oxidado a nitrato ( $\text{NO}_3$ ); de 5% a 10% reage com a mioglobina; de 5% a 15% com os grupos sulfidrilas das proteínas; de 1% a 5% com gordura; de 20% a 30% com proteína e cerca de 1% a 5% transformam-se em gás e se desprendem do produto. Como consequência, essas reações complexas do nitrito podem contribuir para a variação na quantidade

residual de nitrito em produtos cárneos, portanto apenas 10% a 20% do nitrito adicionado podem ser detectado após o processamento de produtos curados e este nível reduz gradualmente com o armazenamento (CASSENS, 1997), corroborando com Pardi et al. (1995), ao afirmar que após sete dias de armazenamento, menos de 10% do nitrito permanece no produto. Entretanto, Amin e Oliveira (2006) observaram que, após seis dias de armazenamento, cerca de 26% de nitrito ainda permanecia em linguiça bovina.

Neste experimento foi observado que após vinte dias de armazenamento 4,79% de nitrito permaneceu no produto que foi fabricado com 150ppm de nitrito; 6,63% de nitrito permaneceram nas mortadelas fabricadas com 75ppm de nitrito e uma média de 23,25% permaneceram nas mortadelas contendo 75ppm de nitrito e óleos essenciais.

Estes resultados podem ser correlacionados com os dados obtidos na análise microbiológica deste estudo, onde foram observados maiores efeitos inibitórios sobre *C. perfringens* nas mortadelas contendo nitrito de sódio adicionadas das combinações de óleos essenciais.

#### **4.6 Oxidação lipídica (Índice de TBARs)**

Não foi observada interação significativa entre os dias de armazenamento e os tratamentos da mortadela, entretanto houve efeito isolado do tratamentos e do tempo, sendo os resultados analisados separadamente.

Pôde-se observar um aumento significativo da oxidação lipídica para todos os tratamentos das mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais avaliados durante o tempo de armazenamento, onde os índices de TBARs foram superiores ao final de sua estocagem, como demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 Níveis de TBARs durante o armazenamento de mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais armazenados a 25°C durante 20 dias

Dia	(mg MA/Kg)
1	0,68 <sup>x</sup>
10	1,07 <sup>y</sup>
20	1,65 <sup>z</sup>

Médias seguidas de uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Os valores de índice TBARs demonstram que para o tratamento com maior concentração de nitrito sem adição de óleo essencial (TRAT 1) foram observados índices inferiores de TBARs, enquanto não foram observadas diferenças estatísticas entre os TRATs 2, 3 e 5, entretanto o TRAT 4 apresentou maior oxidação lipídica dentre todas as amostras (Tabela 9).

Tabela 9 Índices de TBARs de mortadelas com diferentes concentrações/combinações de óleos essenciais e nitrito

Tratamentos	(mg MA/Kg)
TRAT 1	0,75 <sup>a</sup>
TRAT 2	0,99 <sup>ab</sup>
TRAT 3	1,27 <sup>ab</sup>
TRAT 4	1,39 <sup>b</sup>
TRAT 5	1,25 <sup>ab</sup>

TRAT 1: 150 ppm nitrito de sódio; TRAT 2: 75 ppm nitrito de sódio; TRAT 3: 75 ppm nitrito de sódio e óleo essencial de orégano (3,1%); TRAT 4: 75ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de tomilho (1%), cravo-da-índia (2%) e capim-limão (1%); TRAT 5: 75ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de orégano (2,5%), tomilho (0,3%) e cravo-da-índia (0,6%). Médias seguidas por letras diferentes (a,b) na coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey

Os óleos essenciais utilizados no experimento foram os óleos de orégano, tomilho, capim-limão e cravo-da-índia e apresentam como constituintes majoritários o carvacrol, timol, citral e eugenol, respectivamente. A atividade antioxidante destes compostos está relacionada à presença do radical hidroxil

ligado ao anel aromático, o qual é capaz de doar átomos de hidrogênio, estabilizando os radicais livres.

Lee et al. (2005) encontraram no óleo essencial das folhas de manjeriço e tomilho a presença dos componentes majoritários timol e carvacrol, que se mostraram eficientes antioxidantes, tanto que essa propriedade foi comparada à atividade da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e BHT. Zheng e Wang (2001) afirmam que além da atividade antimicrobiana, os terpenos presentes no óleo essencial de orégano possuem também importante atividade antioxidante, contrariando os resultados obtidos neste estudo, pois os tratamentos adicionados de óleos essenciais apresentaram oxidação lipídica superiores àqueles que não tinham estes compostos em sua constituição.

Este trabalho confirma a teoria de que o óleo essencial possui ação pró-oxidante ao invés de antioxidante quando adicionado a altas concentrações, pois estudos *in vitro* têm demonstrado que em doses elevadas de  $\alpha$ -tocoferol, este pode agir como pró-oxidante, caso não haja concentrações equivalentes de outros antioxidantes para regenerar o radical  $\alpha$ -tocoferila a  $\alpha$ -tocoferol (MUNTEANU; ZINGG; AZZI, 2004). Segundo Decker (1997) em geral, baixas concentrações do composto químico eugenol atuam como antioxidantes, mas em altas concentrações agem como pró-oxidantes levando ao dano tecidual, contudo os fatores que determinam estes processos ainda não estão elucidados.

Coutinho et al. (2010), analisaram um modelo alimentar cárneo do tipo mortadela com concentrações de óleo essencial de *Satureja montana* L. (0; 0,78; 1,56; 3,125%) e doses de nitrito (0, 100, 100, 200 ppm), estes afirmaram que em mortadelas fabricadas sem adição de nitrito e sem óleo essencial foram observados índices de TBARs significativamente superiores aos encontrados para os demais tratamentos. Entretanto neste mesmo estudo foram observados índices de TBARs superiores, em maiores concentrações do óleo essencial

(3,12%), ao final do armazenamento, tanto com 100 e 200 ppm de nitrito de sódio, fato também ocorrido com os resultados exibidos neste trabalho

O tratamento que apresentou menor oxidação lipídica das amostras de mortadelas foi aquele adicionado com 150 ppm de nitrito, sendo justificado por Pegg e Shahid (2000) que afirmam que o nitrito é capaz de retardar ou inibir reações de oxidação e sua atividade antioxidante é baseada na formação de compostos estáveis entre pigmentos heme e nitrito (oxidante), com reduções do  $Fe^{3+}$  para  $Fe^{2+}$  que reduz o número de íons ferro livre  $Fe^{3+}$  catalisadores da oxidação lipídica, sendo necessários de 20 a 60 ppm de nitrito para que este atue como antioxidante.

Al-Shuibi e Al-Abdullah (2002) analisaram mortadelas elaboradas contendo diferentes níveis de nitrito e armazenadas durante 14 semanas a 4 e 25°C. O resultado do experimento demonstrou índices de TBARs inferiores para as amostras que continham nitrito e índices superiores em amostras estocadas a 25°C.

Viuda-Martos et al. (2010) testaram óleos essenciais de alecrim e tomilho a 0,02% sobre mortadelas armazenadas durante 24 dias e, assim como encontrado neste estudo, foi observado um aumento significativo dos índices de TBARs com o tempo de estocagem, porém foram observados índices inferiores para mortadelas adicionadas de óleos essenciais. Lee et al. (2010) também notaram um aumento significativo nos índices de TBARs em carne crua de porco moída e extrato de mostarda ao final do décimo quarto dia de armazenamento a 4°C.

#### **4.7 Análise da cor objetiva**

Foram observados efeitos significativos ( $P < 0,05$ ) da interação entre os tratamentos e tempo de estocagem das mortadelas para luminosidade ( $L^*$ ),

índice de vermelho ( $a^*$ ), índice de amarelo ( $b^*$ ), índice de saturação ( $C^*$ ), ângulo de tonalidade ( $h^*$ ) e índice de descoloração. Os efeitos para todos os parâmetros foram decompostos e analisados separadamente.

#### 4.7.1 Avaliação da Luminosidade ( $L^*$ )

A luminosidade ( $L^*$ ) caracteriza o grau de claridade da cor, variando do preto ao branco, indo de 0 (escuro) a 100 (claro). As variações do parâmetro  $L^*$  em cada tratamento em função do tempo de estocagem das mortadelas são representadas na Tabela 10.

Tabela 10 Valores de luminosidade ( $L^*$ ) em mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais armazenadas a 25<sup>0</sup>C durante 20 dias

Tratamento	Índice de luminosidade ( $L^*$ )		
	Dia 1	Dia 10	Dia 20
TRAT 1	50,09 <sup>ax</sup>	58,23 <sup>ay</sup>	59,18 <sup>ay</sup>
TRAT 2	58,60 <sup>b</sup>	59,37 <sup>a</sup>	59,82 <sup>a</sup>
TRAT 3	59,85 <sup>b</sup>	60,64 <sup>a</sup>	60,70 <sup>a</sup>
TRAT 4	61,07 <sup>bx</sup>	55,35 <sup>aby</sup>	54,66 <sup>aby</sup>
TRAT 5	59,37 <sup>b</sup>	60,98 <sup>a</sup>	60,82 <sup>a</sup>

TRAT 1: 150 ppm nitrito de sódio; TRAT 2: 75ppm nitrito de sódio; TRAT 3: 75 ppm nitrito de sódio e óleo essencial de orégano (3,1%); TRAT 4: 75 ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de tomilho (1%), cravo-da-índia (2%) e capim-limão (1%); TRAT 5: 75 ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de orégano (2,5%), tomilho (0,3%) e cravo-da-índia (0,6%). Médias seguidas por letras diferentes (a,b) na coluna, e na linha (x,y) diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey

Apenas o TRAT 1 se diferiu ( $P < 0,05$ ) dos demais TRATs no primeiro dia de armazenamento, porém no décimo e vigésimo dia de estocagem o TRAT 4 obteve índice de luminosidade inferior que as demais amostras.

Durante o período de armazenamento não foram observadas alterações ( $P > 0,05$ ) nos TRATs 2, 3 e 5, entretanto observou-se no TRAT 1 aumento da luminosidade do primeiro para o décimo dia de armazenamento e este manteve-



se constante durante o vigésimo dia, também foi observado uma redução do  $L^*$  do primeiro ao décimo dia de estocagem mantendo-se sem diferença significativa ( $P>0,05$ ) até o último dia de estocagem para o TRAT 4.

Scarpa et al. (2009) ao avaliar a aceitação de produtos comerciais curados, observaram que a luminosidade foi o atributo de cor que mais influenciou quanto a aceitação do produto, sendo que amostras mais claras são preferidas. Para Brewer et al. (2001) luminosidade é o parâmetro que melhor informa a intensidade visual da cor rósea, e segundo Garcia-Esteban et al. (2003) é o parâmetro de cor que governa a qualidade da carne e produtos cárneos.

Em mortadelas formuladas com 1,56% de óleo essencial de *Satureja montana* e 100 ppm de nitrito e formuladas com 3,125% do óleo essencial e 200 ppm de nitrito foi observado um aumento significativo para  $L^*$  entre o primeiro e vigésimo dia de estocagem (COUTINHO et al. 2011), corroborando com os resultados obtidos neste estudo, onde foram observados aumento da luminosidade em todos os tratamentos, exceto o TRAT 4, entretanto apenas o aumento no TRAT 1 do primeiro ao décimo dia foram significativos ( $P<0,05$ ).

#### **4.7.2 Avaliação do índice de vermelho ( $a^*$ )**

Os valores do parâmetro  $a^*$  representam a variação da intensidade da cor do verde ao vermelho, valores positivos de  $a^*$  ou  $a^+$  de 0 até +50 representam a cor vermelha da amostra, enquanto valores negativos de  $a^*$  ou  $a^-$  de 0 até -50 representam a coloração verde do produto (FEINER, 2006).

As variações de  $a^*$  das amostras de mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais em função do tempo de armazenamento estão representadas na Tabela 11.

Tabela 11 Índice de vermelho (a\*) em mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais armazenadas a 25°C durante 20 dias

Tratamento	Índice de vermelho (a*)		
	Dia 1	Dia 10	Dia 20
TRAT 1	20,12	18,08 <sup>a</sup>	19,26 <sup>a</sup>
TRAT 2	19,95	18,03 <sup>a</sup>	19,09 <sup>a</sup>
TRAT 3	19,32 <sup>x</sup>	13,07 <sup>by</sup>	10,60 <sup>bz</sup>
TRAT 4	19,38	21,27 <sup>c</sup>	20,13 <sup>a</sup>
TRAT 5	20,39 <sup>x</sup>	13,56 <sup>by</sup>	13,09 <sup>by</sup>

TRAT 1: 150 ppm nitrito de sódio; TRAT 2: 75 ppm nitrito de sódio; TRAT 3: 75 ppm nitrito de sódio e óleo essencial de orégano (3,1%); TRAT 4: 75ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de tomilho (1%), cravo-da-índia (2%) e capim-limão (1%); TRAT 5: 75ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de orégano (2,5%), tomilho (0,3%) e cravo-da-índia (0,6%). Médias seguidas por letras diferentes (a,b,c) na coluna, e na linha (x,y,z) diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey

Não houve diferença (P<0,05) no primeiro dia de armazenamento entre todos os tratamentos, entretanto no décimo dia as amostras contendo óleos essenciais se comportaram diferentemente daquelas sem a adição destes (TRAT 1 e 2), e este comportamento se manteve ao vigésimo dia, onde apenas os TRAT 3 e 5 tiveram índice de vermelho diferente dos tratamentos sem adição de óleos essenciais.

A estabilidade da cor vermelha foi afetada durante os dias de armazenamento para os tratamentos contendo óleos essenciais, houve redução de a\* para os TRATs 3 e 5, enquanto os demais tratamentos mantiveram a\* do primeiro ao vigésimo dia de estocagem.

Não foi observada diferença (P>0,05) em todos os dias de armazenamento entre os TRATs 1 e 2, fabricadas com 150 e 75 ppm de nitrito respectivamente, permitindo afirmar que a menor dose de nitrito foi suficiente para formar a tonalidade vermelha do produto.

O mesmo resultado foi encontrado por Dutra (2009) quando avaliou a formação da cor em mortadelas irradiadas e elaboradas com diferentes níveis de nitrito, observaram que 75 ppm de nitrito foram suficientes para a formação da

cor característica de produtos curados, não sendo verificadas diferenças perceptíveis para o parâmetro  $a^*$  entre tratamentos contendo 75 e 150 ppm de nitrito, observando valores inferiores de  $a^*$  para amostras fabricadas sem adição de nitrito.

Coutinho et al. (2010) testaram formulações de mortadela contendo 100 e 200 ppm de nitrito e sem a adição deste, sendo observado valores superiores de  $a^*$  para formulações contendo nitrito, indicando a participação deste na tonalidade da cor vermelha.

Estes resultados são esperados, pois de acordo com Feiner (2006) são suficientes de 30 a 50 mg de nitrito por Kg de produto para obter a cor característica de produtos curados.

Nas amostras adicionadas de nitrito, Dutra (2009) verificou que este conferiu um efeito protetor mantendo o índice de vermelho constante com o tempo, fato também ocorrido neste experimento nas amostras com adição de nitrito não contendo óleos essenciais.

A redução dos índices de vermelho nos produtos contendo óleos essenciais pode ser explicada pela possível interação entre o nitrito de sódio e os componentes químicos aromáticos presentes nos óleos essenciais, indisponibilizando o composto químico ( $\text{NO}_2$ ) para se ligar ao ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) da molécula de mioglobina e desempenhar seu papel na formação da cor (COUTINHO et al., 2010). Outra explicação seria a oxidação lipídica ocorrida nas amostras de mortadelas contendo óleos essenciais como pode ser observado de acordo com os índices de TBARs.

#### **4.7.3 Avaliação do índice de amarelo ( $b^*$ )**

O índice de amarelo ( $b^*$ ) representa tonalidades que vão do azul (valores negativos) ao amarelo (valores positivos). As variações de  $b^*$  dos diferentes

tratamentos das mortadelas armazenadas a 25<sup>o</sup>C por 20 dias são representadas na Tabela 12.

Tabela 12 Índice de amarelo (b\*) em mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais armazenados a 25<sup>o</sup>C durante 20 dias

Tratamento	Índice de amarelo (b*)		
	Dia 1	Dia 10	Dia 20
TRAT 1	15,22 <sup>a</sup>	16,52 <sup>a</sup>	16,26 <sup>a</sup>
TRAT 2	14,42 <sup>a</sup>	17,03 <sup>a</sup>	18,15 <sup>a</sup>
TRAT 3	14,45 <sup>a</sup>	15,12 <sup>a</sup>	16,46 <sup>a</sup>
TRAT 4	20,73 <sup>abx</sup>	30,03 <sup>by</sup>	28,26 <sup>by</sup>
TRAT 5	22,01 <sup>abx</sup>	15,22 <sup>ay</sup>	16,28 <sup>ay</sup>

TRAT 1: 150 ppm nitrito de sódio; TRAT 2: 75 ppm nitrito de sódio; TRAT 3: 75 ppm nitrito de sódio e óleo essencial de orégano (3,1%); TRAT 4: 75ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de tomilho (1%), cravo-da-índia (2%) e capim-limão (1%); TRAT 5: 75ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de orégano (2,5%), tomilho (0,3%) e cravo-da-índia (0,6%). Médias seguidas por letras diferentes (a,b) na coluna, e na linha (x,y) diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey

Não foram observadas alterações (P>0,05) para o índice de amarelo (b\*) nas mortadelas dos TRATs 1, 2 e 3, assim como para os TRATs 4 e 5 no primeiro dia de armazenamento, entretanto a partir do décimo dia apenas o TRAT 4 (combinação dos óleos essenciais de tomilho, cravo-da-índia e capim-limão) foi diferente das demais amostras, apresentando b\* superior a estas.

Durante o armazenamento foram observadas aumento (P<0,05) do índice de amarelo para o TRAT 4 do primeiro ao décimo dia mantendo-se constante ao vigésimo dia de estocagem, entretanto o TRAT 5 reduziu o b\* do primeiro ao décimo dia de armazenamento, sem diferença até o último dia de estocagem, não sendo observadas diferenças (P>0,05) nas demais amostras de mortadelas.

Segundo Cofrades et al. (2004) o aumento dos índices de amarelo (b\*) pode estar relacionado a mudanças no estado químico dos pigmentos heme, ocasionado pelas alterações de pH e condições pró-oxidantes, durante o armazenamento, alterando características de absorção e reflexão da luz. O

comportamento de  $b^*$  depende sobretudo das características dos alimentos, e alterações de pH, oxidação, atividade de água, dentre outros fatores.

Viuda-Martos et al. (2010) avaliaram a adição de óleos essenciais de tomilho e alecrim a 0,02% sobre mortadelas do tipo bologna, e foram observados aumentos significativos para luminosidade e índice de amarelo, enquanto houve reduções para o índice de vermelho associado a adição dos óleos essenciais, fato semelhante ao ocorrido neste experimento.

#### **4.7.4 Avaliação do ângulo de tonalidade ( $h^*$ )**

O ângulo de tonalidade ( $h^*$ ) é representado como a grandeza que caracteriza a qualidade da cor (vermelho, verde, amarelo, azul), permitindo diferenciá-la. As variações do parâmetro  $h^*$  dos tratamentos das mortadelas armazenadas a 25°C durante 20 dias estão representadas na Tabela 13.

Ao final do armazenamento as amostras contendo óleos essenciais (TRATs 3, 4 e 5) tiveram ângulo de tonalidade superiores ao TRATs 1 e 2.

Houve um aumento de  $h^*$  após o décimo dia de armazenamento para os TRATs 1, 2 e 4, sendo observado um aumento gradual do primeiro ao vigésimo dia de estocagem para o TRAT 3 e 5.

Os TRATs 3, 4 e 5 indicam maior participação da tonalidade de amarelo do que as amostras sem a adição de óleos essenciais aos 20 dias de estocagem.

Durante o período de armazenamento foi observado redução do índice de vermelho ( $a^*$ ) e aumento do índice de amarelo ( $b^*$ ) em praticamente todos os tratamentos, estas alterações são evidenciadas pelo aumento do ângulo de tonalidade ( $h^*$ ) do produto, indicando maior participação da tonalidade de amarelo, característica indesejável para as amostras de mortadela.

Coutinho et al. (2010) também observaram que a utilização de óleo essencial em mortadelas com concentração superior a 1,56% afetou

negativamente a cor do produto, com reduções do índice de vermelho ( $a^*$ ) e, aumento da participação da tonalidade amarelo (aumento de  $b^*$  e  $h^*$ ) corroborando com os resultados obtidos neste experimento.

Tabela 13 Ângulo de tonalidade ( $h^*$ ) em mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais armazenados a 25°C durante 20 dias

Tratamento	Ângulo de tonalidade ( $h^*$ )		
	Dia 1	Dia 10	Dia 20
TRAT 1	37,51 <sup>abx</sup>	41,94 <sup>ay</sup>	40,20 <sup>ay</sup>
TRAT 2	35,74 <sup>ax</sup>	43,79 <sup>ay</sup>	43,55 <sup>ay</sup>
TRAT 3	37,07 <sup>abx</sup>	50,58 <sup>by</sup>	57,25 <sup>bz</sup>
TRAT 4	47,98 <sup>bx</sup>	54,70 <sup>by</sup>	54,54 <sup>by</sup>
TRAT 5	46,07 <sup>abx</sup>	48,72 <sup>by</sup>	51,27 <sup>bz</sup>

TRAT 1: 150 ppm nitrito de sódio; TRAT 2: 75 ppm nitrito de sódio; TRAT 3: 75 ppm nitrito de sódio e óleo essencial de orégano (3,1%); TRAT 4: 75 ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de tomilho (1%), cravo-da-índia (2%) e capim-limão (1%); TRAT 5: 75 ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de orégano (2,5%), tomilho (0,3%) e cravo-da-índia (0,6%). Médias seguidas por letras diferentes (a,b,c,d) na coluna, e na linha (x,y,z) diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey

#### 4.7.5 Avaliação do índice de saturação ( $C^*$ )

O índice de saturação ( $C^*$ ) corresponde à intensidade ou quantidade de uma tonalidade, indicando o nível de mistura com o branco, preto ou cinza. As variações de  $C^*$  dos diferentes tratamentos das mortadelas armazenadas a 25°C durante 20 dias estão apresentados na Tabela 14.

Não houve diferença no índice de saturação dos TRATs 1, 2 e 3, assim como dos TRATs 4 e 5 no primeiro dia de armazenamento, já no décimo e vigésimo dia de estocagem apenas o TRAT 4 diferenciou-se ( $P < 0,05$ ) das demais amostras.

Tabela 14 Índice de saturação (C\*) em mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais armazenados a 25°C durante 20 dias

Tratamento	Índice de saturação (C*)		
	Dia 1	Dia 10	Dia 20
TRAT 1	25,18 <sup>a</sup>	25,14 <sup>a</sup>	25,21 <sup>a</sup>
TRAT 2	24,60 <sup>ax</sup>	24,95 <sup>ax</sup>	26,36 <sup>ay</sup>
TRAT 3	24,06 <sup>ax</sup>	20,06 <sup>ay</sup>	19,58 <sup>ay</sup>
TRAT 4	30,09 <sup>bx</sup>	36,77 <sup>by</sup>	34,69 <sup>by</sup>
TRAT 5	33,03 <sup>bx</sup>	20,61 <sup>ay</sup>	20,96 <sup>ay</sup>

TRAT 1: 150 ppm nitrito de sódio; TRAT 2: 75 ppm nitrito de sódio; TRAT 3: 75 ppm nitrito de sódio e óleo essencial de orégano (3,1%); TRAT 4: 75 ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de tomilho (1%), cravo-da-índia (2%) e capim-limão (1%); TRAT 5: 75 ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de orégano (2,5%), tomilho (0,3%) e cravo-da-índia (0,6%). Médias seguidas por letras diferentes (a,b) na coluna, e na linha (x,y) diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey

Durante o período de armazenamento não houve diferença significativa (P>0,05) entre os TRATs 1 (150 ppm nitrito de sódio), enquanto houve um aumento do índice de saturação no vigésimo dia do TRAT 2 e índices de C\* inferiores nos TRATs 3, 4 e 5 a partir do décimo dia de estocagem.

O TRAT 4 apresentou o maior índice de saturação de todas as amostras testadas, portanto pode ser observado claramente que houve aumento da participação da tonalidade amarelo, sendo confirmado com os valores elevados de b\* e h\*.

As cores que apresentam baixo valor de saturação são chamadas de pálidas ou acinzentadas, enquanto aquelas com alto valor de saturação são denominadas saturadas (RAMOS; GOMIDE, 2007).

O TRAT 1 (150 ppm de nitrito) e TRAT 2 (75 ppm de nitrito) não apresentaram diferenças significativas entre si durante todo o armazenamento, corroborando com os resultados de a\*, b\* e h\*.

Coutinho et al. (2010) observou que o índice de saturação foi afetado pela concentração de nitrito utilizado na elaboração de mortadelas, onde tratamentos adicionados de nitrito apresentaram maior índice de C\*, indicando

maior intensidade da cor vermelho e, tratamentos adicionados de óleo essencial de *S. montana* superior a 3,12% apresentaram saturação reduzida ao final do armazenamento.

#### 4.7.6 Avaliação do índice de descoloração

O índice de descoloração das amostras de mortadelas armazenadas a 25°C por 20 dias são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 Índice de descoloração em mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais armazenados a 25°C durante 20 dias

Tratamento	Índice de descoloração		
	Dia 1	Dia 10	Dia 20
TRAT 1	2,56	2,55 <sup>a</sup>	2,53 <sup>a</sup>
TRAT 2	2,67	2,38 <sup>a</sup>	2,55 <sup>a</sup>
TRAT 3	2,62 <sup>x</sup>	1,77 <sup>by</sup>	1,54 <sup>by</sup>
TRAT 4	-	-	-
TRAT 5	2,54 <sup>x</sup>	1,84 <sup>by</sup>	1,78 <sup>by</sup>

TRAT 1: 150 ppm nitrito de sódio; TRAT 2: 75 ppm nitrito de sódio; TRAT 3: 75 ppm nitrito de sódio e óleo essencial de orégano (3,1%); TRAT 4: 75 ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de tomilho (1%), cravo-da-índia (2%) e capim-limão (1%); TRAT 5: 75 ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de orégano (2,5%), tomilho (0,3%) e cravo-da-índia (0,6%). Médias seguidas por letras diferentes (a,b) na coluna, e na linha (x,y) diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey

O TRAT 4, formulado com 75 ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de tomilho (1%), cravo-da-índia (2%) e capim-limão (1%), não apresentou cor característica de produto curado desde o primeiro dia de armazenamento, logo, não é importante a análise de descoloração desta amostra.

Não foram observadas diferenças entre os tratamentos no primeiro dia de armazenamento. No entanto, a partir do décimo dia de estocagem não houve diferença (P>0,05) entre os TRATs 1 e 2, assim como entre os TRATs 3 e 5 e este comportamento prevaleceu até o fim do armazenamento.



Observou-se aumento na descoloração dos TRATs 3 e 5 do primeiro ao décimo dia de estocagem, permanecendo sem alterações até o vigésimo dia, não sendo constatado diferença significativa na perda de cor durante o armazenamento para os TRATs 1 e 2.

Estes resultados são confirmados ao observar os dados anteriores do índice de vermelho ( $a^*$ ) onde se constatou uma redução deste índice nos TRATs 3 e 5 com o decorrer do armazenamento.

Segundo Hunt et al. (1991) a razão 650/570 nm representa a intensidade da cor de carnes curadas. Assim, todos os TRATs do primeiro dia de estocagem e os TRATs 1 e 2 em todos dias de armazenamento apresentam cor curada excelente, pois apresentam razão entre 2,2 e 2,6; contudo os TRATs 3 e 5 após o décimo dia de estocagem apresentam cor curada visível, mas menos intensa, apresentando valores de razão 650/570 nm entre 1,7 a 2,0, sendo que razões com valores abaixo de 1,1 são considerados como produtos descoloridos.











Reduções nos valores de  $a^*$  e aumento nos valores de  $b^*$  foram relatados por Sheridan et al. (2007) como indicativos da descoloração da cor curada e, neste caso, demonstram as diferenças de cor entre os produtos. A carne curada sofre descoloração para uma cor castanha ou amarronzada quando exposta por certo período a luz (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Ahn et al. (2004) atribuíram a redução da coloração vermelha à denitrosilação do pigmento de nitrosoemocromo presente nos produtos curados cozidos, sendo, segundo estes autores, um indicativo da descoloração da cor curada.

Entretanto, os complexos mioglobina-NO, nitrosomioglobina e nitrosoemocromo são fotossensíveis, ocorrendo à dissociação do NO da molécula de mioglobina na presença da luz. Assim, se nas condições de armazenamento o produto curado for exposto à luz e ao oxigênio, o NO dissociado será rapidamente oxidado a nitrito ( $\text{NO}_2$ ) e o produto apresentará uma

descoloração. Se, no entanto, não houver oxigênio presente, o NO não é oxidado e pode recombinar com o grupamento heme (RAMOS; GOMIDE, 2007). Por isso, produtos curados exigem embalagens apropriadas que conferem proteção à luz e/ou ao oxigênio, deste modo o método mais eficaz para prevenir a descoloração é excluir o oxigênio, evitando seu contato com a superfície do produto. Neste caso o óxido nítrico retirado do grupo heme pela luz não será oxidado, podendo recombinar-se ao grupo (JUDGE; ALBERLE; FORREST, 1989).

Diante do exposto as principais diferenças entre os tratamentos podem ser visualizados na Figura 9 durante o primeiro e vigésimo dia de armazenamento a 25<sup>o</sup>C.

Dias de armazenamento	Primeiro	Vigésimo
TRAT 1		
TRAT 2		
TRAT 3		
TRAT 4		
TRAT 5		

TRAT 1: 150 ppm nitrito de sódio; TRAT 2: 75 ppm nitrito de sódio; TRAT 3: 75 ppm nitrito de sódio e óleo essencial de orégano (3,1%); TRAT 4: 75 ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de tomilho (1%), cravo-da-índia (2%) e capim-limão (1%); TRAT 5: 75 ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de orégano (2,5%), tomilho (0,3%) e cravo-da-índia (0,6%)

Figura 9 Mortadelas adicionadas de nitrito de sódio e diferentes combinações de óleos essenciais no primeiro e vigésimo dia de armazenamento

## 5 CONCLUSÕES

*Clostridium perfringens* tipo A foi mais susceptível aos óleos essenciais de capim-limão, orégano, tomilho e o composto químico carvacrol, seguido dos óleos de bálsamo, cravo-da-índia e o composto químico eugenol, e consecutivamente aos óleos de canela e *litsea cubeba*, entretanto, os óleos essenciais de alecrim, manjeriço, funcho doce, gengibre, *grapefruit*, limão-siciliano, sálvia e tangerina não apresentaram atividade antibacteriana em nenhuma das concentrações testadas.

Ao analisar a combinação entre os óleos essenciais de orégano, tomilho, cravo-da-índia e capim-limão, pôde-se observar maiores halos inibitórios em concentrações mais altas de óleo essencial de orégano e menores concentrações de óleo essencial de capim-limão;

O TRAT 3, contendo 3,1% de óleo essencial de orégano, apresentou melhor efeito antibacteriano entre todos os tratamentos testados, não apresentando aumento significativo do número de UFC/g de *C. perfringens* durante todo o período de armazenamento das mortadelas.

Observou-se efeito pró-oxidante dos óleos essenciais sobre as mortadelas adicionadas de nitrito de sódio e diferentes combinações de óleos essenciais.

A utilização de óleos essenciais promoveu alterações sensoriais indesejáveis ao produto, fato comprovado devido a alterações da cor objetiva das mortadelas, com redução do índice de vermelho e aumento do índice de amarelo.

Observou-se maior concentração de nitrito residual durante o período de armazenamento nas amostras de mortadelas formuladas com óleos essenciais.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Bacterial agents of foodborne illness**. Guildford: The Royal Society of Chemistry, 1995. 364 p.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 114-140, Jan./Mar. 2007.

AHN, H. J. et al. Comparison of irradiated phytic acid and other antioxidants for antioxidant activity. **Food Chemistry**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 173-178, Nov. 2004.

AKISUE G. et al. Padronização da droga e do extrato fluido de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Lecta. **Revista de Biologia e Farmácia**, Pernambuco, v. 14, n. 2, p. 109-119, jan. 1996.

ALMEIDA-DORIA, R. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 197-203, May/Aug. 2000.

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, Dec. 2002.

AL-ZUHAIR, B. et al. Pharmacological studies of cardamom oil in animals. **Pharmacological Research**, London, v. 34, n. 1/2, p. 79-82, Jul./Ago. 1996.

AMIN, M.; OLIVEIRA, J. V. Efeito do uso do nitrato e nitrito na inibição de *Clostridium perfringens* tipo A em linguiça bovina curada. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 13-24, jun. 2006.

AMORIM, M. B. **Estudo da reatividade de derivados do safrol frente ao cloreto de alumínio.** 1989. 120 p. Dissertação (Mestrado em Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1989.

ANWAR, F. et al. Physico-chemical characteristics of *citrus* seeds and seed oils from Pakistan. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 85, n. 4, p. 321-330, Feb. 2008.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria e prática.** 3. ed. Viçosa: UFV, 2006. 478 p.

ARIAS, B. A.; RAMÓN-LACA, L. Pharmacological properties of *citrus* and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 97, n. 1, p. 89-95, Feb. 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international.** 16. ed. Virginia, 1995.

ATTAWAY, J.; PIERINGER, A.; BARABAS, L. Origin of *citrus* flavor components. II. Identification of volatile components from *citrus* blossoms. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 5, n. 6, p. 1273-1279, Mar. 1966.

AZANZA, M. P. V; RUSTIA, A. S. Residual nitrite levels in Philippine sweet bacon. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 5, p. 385-389, July 2004.

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

BARA, M. T. F. **Avaliação do efeito inibidor de condimentos no desenvolvimento de *Yersinia enterocolitica*.** 1992. 73 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

BARBOSA, L. N. et al. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 6, n. 6, p. 725-728, Jul./Aug. 2009.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, maio/jun. 2009.

BOISVERT, C.; HUBERT, A. **L'ABCdaire des épices**. Ed. Flammarion, Paris, 1998. 120 p.

BONANNI, A. et al. Electrochemical biosensors as a tool for antioxidant capacity assessment. **Food Chemistry**, London, v. 102, n. 1, p. 751-758, May 2007.

BORONAT, M. D. C. T.; PADROS, R. B.; ALONSO, M. I. Nitratos y nitritos en la alimentacion infantil: riesgos de su ingesta. **Alimentaria**: revista de tecnologia e higiene de los alimentos, Madrid, v. 138, n. 1, p. 31-35, Ago. 1982.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 04, de 05 de abril de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Mortadela. Brasília, 2000. In: **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 5 abr. 2000. Seção I, p. 6-10. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sislegis>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº. 2**, de 15 de janeiro de 2007. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 21 set. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Aprova o Regulamento Técnico: "Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 – Carne e Produtos Cárneos". **Portaria nº 1004**, de 11 de janeiro de 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. **Resolução nº 04/88**. In: Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação. *Compêndio da Legislação de Alimentos*. São Paulo: ABIA, 2001. v. 1, p. 326.

BRASIL. Resolução-RDC nº 12, 02 de jan. 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45-47.

BREWER, M. S. et al. Measuring pork color: effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. **Meat Science**, Barking, v. 57, n. 2, p. 176-196, Feb. 2001.

BRYNESTAD, B. S.; GRANUM, P. E. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74. n. 3, p. 195-202, Apr. 2002.

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

CAIXETA, D. **Atividade antimicrobiana e composição química de óleos essenciais de folhas de *Curcuma longa* L. e *Bixa orellana* L. sobre *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes***. 2010. 71 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

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

CAPASSO, R. et al. A diterpenoid from *Sálvia cinnabarina* inhibits mouse intestinal motility in vivo. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 70, n. 4, p. 375-377, Apr. 2004.



CARMAN, R. J. et al. *Clostridium perfringens* toxin genotypes in the feces of healthy North Americans. **Anaerobe**, Blacksburg, v. 14, n. 2, p. 102-108, Apr. 2008.

CAROVIC-STANKO, K. et al. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**, Oxford, v. 119, n. 1, p. 196-201, Mar. 2010.

CARPENTER, C. E. et al. Inactivation of clostridial ferredoxin and pyruvate-ferredoxin oxireductase by sodium nitrite. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 3, p. 549-552, Mar. 1987.

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 salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, June 2002.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Safety, efficacy, and provenance of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. **Contact Dermatitis**, v. 45, n. 2, p. 65-67, Aug. 2001.

CASSENS, R. G. Residual nitrite in cured meat. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n. 2, p. 53-55, Feb. 1997.

\_\_\_\_\_. Use of sodium-nitrite in cured meats today. **Food Technology**, Chicago, v. 49, n. 7, p. 72-80, July 1995.

CASTRO, H. G. et al. **Metabólitos secundários**: Contribuição ao estudo de plantas medicinais. 2.ed. Visconde do Rio Branco: SUPREMA, 2004, 113 p.

CATO, E. P.; GEORGE, W. L.; FINEGOLD, S. M. Genus *Clostridium*. In: SNEATH, P. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams e Wilkins, 1986. v. 2. p. 1179-1182.

CAVICCHIOLI, M. **Análise de óleos essenciais de frutas cítricas por cromatografia gasosa de alta resolução (colunas capilares)**. 1986. 38 p. Monografia (Curso de Graduação) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1986.

COFRADES, S. et al. Restructured beef with different proportions of walnut as affected by meat particle size. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 218, n. 3, p. 230-236, Dec. 2004.

CONNER, D. E.; BEUCHAT, L. R. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. **Journal Food Science**, Chicago, v. 49, n. 2, p. 429-434, Mar./Apr. 1984.

CORTAS, N. K.; WAKID, N. W. Pharmacokinetics aspects of inorganic nitrate ingestion in man. **Pharmacology e Toxicology**, Copenhagen, v. 68, n. 3, p. 192-193, Mar. 1991.

COUTINHO, T. L. **Atividade do óleo essencial de segurelha (*Satureja montana* L.) sobre *Clostridium perfringens* em sistemas de emulsão cárneas elaboradas com diferentes níveis de nitrito**. 2010. 152 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

COUTINHO, T. L. 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, Jan. 2011.

CRAVEIRO, A. A. et al. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981. 210 p.

DEANS, S. G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 165-180, Nov. 1987.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 1, p. 396-398, Nov. 1997.

DI PASQUA, R. et al. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, Weinheim, v. 10, n. 5, p. 1040-1049, Mar. 2010.

DIMITRIJEVIC, S. I. et al. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. **Food Chemistry**, London, v. 104, n. 2, p. 774-782, Feb. 2007.

DORMAN, H. J. D. et al. Characterisation of the antioxidant properties of the de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, London, v. 83, n. 2, p. 255-262, Nov. 2003.

DUKE, J. A. Biologically: active compounds important spices. In: CHARALAMBOUS, G. Spices, herbs and edible fungi. Amsterdam: Elsevier Publishers, 1994. **Egyptian Journal of Horticulture**, Cayro, v. 27, n. 1, p. 459-478, 2002.

DUSAN, F. et al. Essential oils-their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 20, n. 8, p. 1435-1445, Dec. 2006.

DUTRA, M. P. **Qualidade de mortadelas elaboradas com diferentes níveis de nitrito e submetidas a diferentes doses de irradiação**. 2009. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

ESSAWI, T.; SROUR, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Oxford, v. 70, n. 3, p. 343-349, June 2000.

EVANS, W. C.; SAUNDERS, W. B. **Ginger, trease and Evans pharmacognosy**. 15. ed. Edimburgo: WB Saunders, 2002. 280 p.

FARREL, T. K. **Spices, condiments, and seasonings**. 3. ed. New York: Van nostrand reinhold - AVI book, 1995. 414 p.

FEINER, G. **Meat products handbook practical science and technology**. 2. Ed. Boca Raton: CRC, 2006. 627 p.

FENNEL, C. W. et al. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **Journal Ethnopharmacol**, v. 94, n. 2/3, p. 205-217, Oct. 2004.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. **Fennema's Food Chemistry**. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. 1100 p.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, jul./set. 1997.

FONT-QUER, P. **Plantas Medicinales, El Dioscórides Renovado**. 2. ed. Barcelona: Editorial Labor S. A., 1993. 500 p.

FORSYTHE, J. S. **Microbiologia da segurança alimentar**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 423 p.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 182 p.

GARCIA-ESTEBAN, M. et al. Optimization of instrumental colour analysis in dry-cured ham. **Meat Science**, Barking, v. 63, n. 3, p. 287-292, Mar. 2003.

GARDINI, F. et al. Composition of four essential oils obtained from plants from Cameroon, and their bactericidal and bacteriostatic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Microbiology Research**, Pretoria, v. 3, n. 5, p. 264-271, May 2009.

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, Dec. 2004.

GOMES, A. M. et al. Genotipificação de *Clostridium perfringens* isolados de frangos de corte através da PCR múltipla. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1943-1947, out. 2008.

GORDON, M. H. The development of oxidative rancidity in foods: In: POKORNY, J.; YANISLIEVA, N.; GORDON, M. (Ed.). **Antioxidants in food: practical applications**. Boca Raton: CRC, 2001. p. 7-21.

GROSSMAN, L. **Óleos essenciais na culinária, cosmética e saúde**. 2. ed. São Paulo: Optinline, 2005. 300 p.

GUERRA, M. J. M. et al. Evaluación toxicológica aguda de los extractos fluidos al 30 y 80% de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Caña Santa). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Habana, v. 5, n. 3, p. 97-101, Dec. 2000.

GUERRA, N. B.; LAJOLO, F. M. Ação antioxidante de especiarias face diferentes atividades de água. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 45-50, jan./mar. 2005.

GUILLEN, M. D.; MANZANOS, M. J. Study of the composition of the different parts of Spanish *Thymus vulgaris* L. plants. **Food Chemistry**, London, v. 63, n. 3, p. 373-383, Nov. 1998.

GUIMARÃES, L. G. L. **Estudo da estabilidade e do efeito fungitóxico do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf)**. 2007. 68 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

GUSTAFSON, J. E. et al. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 194-198, Mar. 1998.

HEDRICK, H. B. et al. **Principles of Meat Science**. 3 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, n. 9, p. 3590–3595, Sept. 1998.

HILL, M. J. Nitrosamines. In: SHUKER, D. E. G. **The chemistry of N-Nitrosation**. Chichester: J. Wiley, 1988. 167 p.

HUNT, M. C. et al. Guidelines for meat color evaluation. In: 44<sup>TH</sup> ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, (p.3-17), 9-12 July 1991. **Proceedings**. Manhattan, KS: Kansas State University. 1991.

HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 3, p. 986-995, June 2008.

ISMAIEL, A. A.; PIERSON, M. D. Effect of sodium nitrite and origanum 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, Nov. 1990.

JAKIEMIU, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2008. 90 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JUDGE, M. D.; ALBERLE, E. D.; FORREST, J. C. **Principles of Meat Science**. 2. ed. Duburque: Kendall/Hunt, 1989. 351 p.

KARABAGIAS, I.; BADEKA, A.; KONTOMINAS, M. G. Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. **Meat Science**, Barking, v. 88, n. 1, p. 109-116, Dec. 2011.

KOKETSU, M. et al. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 281-285, set./dez. 1997.

KOROCH, A. R.; JULIANI, H. R.; ZYGADLO, J. A. Bioactivity of essential oils and heir components. In: BERGER, R. G. (Ed.). **Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing ans sustainable**. Berlin: Springer, 2007. p. 87-115.

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

LEAL, T. C. A. B. et al. Produção de biomassa e óleo essencial em plantas de capim-cidreira [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf] em diferentes idades. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 5, n. 1, p. 61-64, nov. 2003.

LEBERT, I.; LEROY, S.; TALON, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. **Food Microbiology**, Washington, v. 24, n. 3, p. 281-287, May 2007.

LEE, M. A. et al. The antioxidative properties of mustard leaf (*Brassica juncea*) kimchi extracts on refrigerated raw ground pork meat against lipid oxidation. **Meat Science**, Barking, v. 84, n. 3, p. 498-504, Mar. 2010.

LEE, S. T. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 1, p. 131-137, May 2005.

LIVINGSTON, D. J.; BROWN, W. D. The chemistry of myoglobin and its reactions. **Food Technonology**, Chicago, v. 35, n. 5, p. 244-252, May 1981.

MANHOSO, F. F. R.; RUDGE, A. C. Aspectos microbiológicos, físico-químicos e histológicos das linguças tipo frescal comercializadas no município de Marília-SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 44, set. 1999.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. 2. ed. Viçosa: UFV, 1998. 220 p.

McMINDERS, M. K.; SIDLERS, A. J. Nitrite mode of action: inhibition of yeast pyruvate decarboxylase (E.C. 4.1.1.1) and clostridial pyruvate-ferredoxin oxidoreductase (E.C. 1.2.7.1) by nitric oxide. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 53, n. 3, p. 917-919, May 1988.

MEJLHOLM, O.; DALGAARD, P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium* in liquid media and fish products. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 27-31, Jan. 2002.

MITCHELL, W. J. General biology and physiology. In: BAHL, H.; DURRE, P. (Ed.). **Clostridia**: biotechnology and medical applications. Weinheim: Wiley-VHC, 2001. p. 49-104.

MOHLER, K. **El curado**: ciência y tecnologia de la carne - teoria y práctica. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 1982. 116 p.

MOLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Nitric oxide and myoglobins. **Chemical Reviews**, Washington, v. 102, n. 4, p. 1167-1178, Aug. 2002.

MOREIRA, M. R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 38, n. 5, p. 565-570, Aug. 2005.



MÜLLER, W. D. Curing and smoking: are they healthier processes today than used to be? **Fleischwirtschaft**, Frankfurt, v. 71, n. 1, p. 61-65, Jan. 1991.

MUNTEANU, A.; ZINGG, J. M.; AZZI, A. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E - myth or reality? **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Georgetown, v. 8, n. 1, p. 59-76, Feb. 2004.

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

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 2000.

NEDOROSTOVA, L. et al. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 2, p. 157-160, Feb. 2009.

NEPOMUCENO, R. **Viagem ao fabuloso mundo das especiarias: historias e lendas, origens e caminhos, favores e sabores**. 5. ed. Rio de Janeiro: José Olympo Ltda., 2007. 169 p.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Plantas medicinais: guia para profissional de saúde**. 2. ed. São Paulo: Premier, 2002. 120 p.

OLSEN, S. J. et al. Surveillance of foodborne disease outbreaks - United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, n. 1, p. 1-62, Mar. 2000.

ONAWUNMI, G. O.; YISAK, W. A.; OGUNLANA, E. O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Journal Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 12, n. 3, p. 279-286, Dec. 1984.

OOSTERHAVEN, K.; POOLMAN, B.; SMID, E. J. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 4, n. 1, p. 23-31, June 1995.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos**: componentes dos alimentos e processos. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 294 p.

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, n. 2/3, p. 155-162, July 1997.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

PARDI, M. C. et al. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. 4. ed. Goiânia: CEGRAF/UFG, 1995. 586 p.

PAREDES-SABJA, D. et al. *Clostridium perfringens* spore germination: characterization of germinants and their receptors. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 4, p. 1190-1201, Feb. 2008.

PEGG, R. B.; SHAHID, F. **Nitrite curing of meat**: the n-nitrosamine problem and nitrite alternatives. 3. ed. Trumbull: Food e Nutrition, 2000. 280 p.

PEREIRA, A. A. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos**. 2006. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

PEREIRA, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

PIEROZAN, M. K. et al. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *sálvia* L. species. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 764-770, Dec. 2009.

PORTO, E. Microbiologia de carnes. In: CASTILLO, C. J. C. **Qualidade da Carne**. São Paulo: Varela, 2006. p. 101-131.

POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação. In: SIMÔES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC, 2007. p. 75-91.

PRINS, C. L. et al. Efeitos de confinamento do sistema radicular sobre capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 3, p. 416-421, jul./set. 2008.

PROENÇA-DA-CUNHA, A.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. 203 p.

QUINN, P. J. et al. Gênero *Clostridium*. In: **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe Publishing, 2005. p. 94-105.

RAHARJO, S. et al. Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C18 method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 11, p. 2182-2185, Nov. 1992.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, ago. 2006.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: Fundamentos e metodologias**. 1. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 599 p.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. 3. ed. São Paulo: Premier, 1997. 372 p.

ROÇA, R. O. **Cura de Carnes**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Laboratório de Tecnologia dos Produtos de Origem Animal. 2005. Disponível em: <<http://puhrs.campus2.br/~thompson/Roca111.pdf>>. Acesso em: 22/07/2011.

ROTA, M. C. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 7, p. 681-687, July 2008.

RYWOTYCKI, R. The effect of selected functional additives and heat treatment on nitrosamine content in pasteurized pork ham. **Meat science**, Barking, v. 60, n. 4, p. 335-339, Apr. 2002.

SAHIN, F. et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 7, p. 549-557, Oct. 2004.

SAIDANI, M; DHIFI, W.; MARZOUK, B. Lipid evaluation of some Tunisian *citrus* seeds. **Journal of Food Lipids**, Trumbull, v. 11, n. 3, p. 242-250, Mar. 2004.

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

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 3-21, Mar. 2001.

SANTOS, R. I. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2007. p. 323-354.

SCARPA, A. B. O. et al. Caracterização de presuntos e apresuntados comerciais: avaliação sensorial e instrumental da cor. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 8., 2009, São Paulo. **Anais**. São Paulo: UNICAMP, 2009. 1 CD-ROM.

SCOOT, V. N.; ANDERSON, J. E.; WANG, G. Mesophilic anaerobic sporeformers. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 325-330.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, abr./jun. 2004.

SHAN, A. Y. K. V. **Constituição química e atividade fungitóxica de extratos de *Thymus vulgaris* L.** 2002. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

SHARIFIFAR, F. et al. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 7, p. 800-805, July 2007.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 6, n. 1, p. 29-44, Mar. 1984.

SHERIDAN, C. et al. A comparison of CIE L\*a\*b\* and spectral methods for the analysis of fading in sliced cured ham. **Journal of Optics A, Pure and Applied Optics**, Bristol, v. 9, n. 6, p. 32-39, Sept. 2007.

SILVA JUNIOR, A. A. S.; VERONA, M. L. F. **Plantas medicinais e aromáticas**. 2. ed. Itajaí: Ministério do Meio Ambiente/Fundo Nacional do Meio Ambiente, 1997. 456 p.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, jan. 1999.

SILVA, J. A. **Tópicos da Tecnologia de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2000. 227 p.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 552 p.

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

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, jan. 2007.

SOUZA, E. L. et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 2/3, p. 308-311, Feb. 2010.

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Decision 1999/217/EC as regards the register of flavouring substances used in or on foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v. 42, p. 1-7, July 1999.

TINOCO, M. T.; MARTINS, M. R.; CRUZ-MORAIS, J. Atividade antimicrobiana do óleo essencial do *Foeniculum vulgare* Miller. **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v. 30, n. 1, p. 448-454, jan. 2007.

TOWNSEND, W. E.; OLSON, D. G. Las carnes curadas y su processado. In: LAWRIE, R. (Ed.). **Advances de la ciencia de la carne**. Zaragoza: Acribia, 1984. p. 393-414.

TSIGARIDA, E.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G. J. E. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, n. 6, p. 901-909, Dec. 2000.

TULEY, S. K. **A Manual on the Essential Oil Industry**. 2. ed. Vienna: United Nations Industrial Development Organization, 1996. 150 p.

ULTEE, A.; BENNINK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, Apr. 2002.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4606- 4610, Oct. 1999.

ULTEE, A.; SMID, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 373-378, Mar. 2001.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of mortadella. **Meat Science**, Barking, v. 85, n. 1, p. 568-576, Mar. 2010.

WILLIAMS, L. R.; STOCKLEY, W. Essential oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 8, n. 4, p. 30-40, Oct./Dec. 1998.

YOUNES, J. F. F.; BORON, A. Mortadelas. In: OLIVO, R. **O mundo do frango**. São Paulo: Varela, 2006. p. 47-90.

ZAIKA, L. L.; KISSINGER, J. G.; WASSERMAN, A. E. Inhibition of lactic acid bacteria by herbs. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, n. 5, p. 1455-1459, Sept. 1983.

ZANARDI, E. et al. Comparative study on nitrite and nitrate ions determination. **Annali Della Facolta Di Medicina Veterinaria di Parma**. Parma, v. 22, n. 1, p. 79-86, 2002.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, Jan. 2001.