



GLÉCIA DE CÁSSIA ALEIXO

**EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E
COMPOSTOS MAJORITÁRIOS SOBRE
ENDÓSPOROS DE *Clostridium botulinum*
INOCULADOS EM MORTADELA**

LAVRAS – MG

2014

GLÉCIA DE CÁSSIA ALEIXO

**EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E COMPOSTOS MAJORITÁRIOS
SOBRE ENDÓSPOROS DE *Clostridium botulinum* INOCULADOS EM
MORTADELA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Coorientador

Dr. Eduardo Mendes Ramos

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Aleixo, Glécia de Cássia.

Efeito de óleos essenciais e compostos majoritários sobre
endósporos de *Clostridium botulinum* inoculados em mortadela /
Glécia de Cássia Aleixo. – Lavras : UFLA, 2014.

58 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Atividade esporicida. 2. Orégano. 3. Carvacrol. 4. Cravo-da-
índia. 5. Produto cárneo. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 576.163

GLÉCIA DE CÁSSIA ALEIXO

**EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E COMPOSTOS MAJORITÁRIOS
SOBRE ENDÓSPOROS DE *Clostridium botulinum* INOCULADOS EM
MORTADELA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 7 de outubro de 2013.

Dr. Eduardo Mendes Ramos UFLA

Dr. Victor Maximiliano Reis Tebaldi UFLA

Dra. Aline Cristina Teixeira Mallet UNIFOA

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

Dr. Eduardo Mendes Ramos
Coorientador

LAVRAS - MG

2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo AMOR maior, por tudo que tem me proporcionado, pelas bênçãos, pelas oportunidades e pelas vitórias.

A Nossa Senhora das Graças, por me proteger, guiar e me iluminar em todos os momentos.

Aos meus pais, Mariéta e Osmário, por serem responsáveis pela pessoa que sou, pelo incentivo, por acreditarem sempre no meu potencial e pelo esforço que têm feito para que eu chegasse até aqui.

Ao meu namorado, Ivanoer Lemos de Queiroz, pelo carinho, amor e companheirismo.

À Universidade Federal de Lavras, em especial aos departamentos de Microbiologia Agrícola e Ciência dos Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À FAPEMIG, pelo financiamento do projeto e a concessão da bolsa de mestrado.

À minha orientadora, Roberta Hilsdorf Piccoli, pelo carinho, pela orientação e pela amizade. Ao professor Eduardo, pela coorientação e pelos ensinamentos. À professora Alcinéia, pelo auxílio e atenção.

Ao doutorando Robledo Torres, pela realização das análises estatísticas e a colaboração neste trabalho.

À Monalisa Pereira Dutra, pelo apoio, pela amizade e pela colaboração neste experimento. À Élide Jorge, pela imensa ajuda e disponibilidade nas análises físico-químicas e na interpretação de dados. Ao Henrique, pelas análises de textura e aos demais colegas do laboratório de carnes, Ítalo, Carol, Giselle, Douglas, Cecília, Ligiane, Bruna e Taís, pelo apoio na fabricação e nas análises físico-químicas das mortadelas.

Ao médico e colega de laboratório, Hélio Haddad Filho e sua esposa Grasiella Zambaldi, pelo cuidado, carinho, profissionalismo e amizade em um período difícil.

A Juliane e Kelly, pelo auxílio nas análises, principalmente nas curvas de crescimento microbiano.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Maíra, Danilo, Alcilene, Letícia dos Anjos, Sílvia, Tenille, Aline, Nayane, Alessandra Salimena, Letícia Andrade, Mariana, Luciana e demais colegas do Laboratório de Microbiologia, pelo aprendizado e vínculo criado.

À Eliane, técnica do laboratório, pelos auxílios.

À Monique Suela Silva, amiga de todas as horas. À Luciana Dias, Maiara Paparelle, Manuela, Janaira e Elisângela, pela amizade, apoio e convivência.

Aos meus amigos itaunenses que me incentivaram nessa jornada, em especial ao Mailson, por me entender, me escutar e opinar.

A todos que, de alguma forma, contribuíram, mesmo que indiretamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os óleos essenciais são compostos formados pelo metabolismo secundário das plantas e, dentre as suas propriedades, destacam-se as atividades antioxidante e antimicrobiana. Os compostos majoritários, na grande maioria, são os responsáveis pela atividade antimicrobiana e pesquisas têm sido feitas para verificar essa ação sob os microrganismos contaminantes em alimentos. *Clostridium botulinum* é um microrganismo esporulado. Sua neurotoxina causa o botulismo, doença que pode levar à morte ou deixar diversas sequelas. Este estudo foi realizado com os objetivos de avaliar o efeito antimicrobiano de óleos essenciais de orégano e cravo-da-índia e do composto majoritário carvacrol sobre endósporos de *C. botulinum* inoculados em mortadela e avaliar o efeito desses compostos sobre a oxidação lipídica, nitrito residual, pH, textura e desenvolvimento da cor no produto. Para determinar a concentração mínima inibitória (CME) dos óleos essenciais e dos compostos majoritários, foi utilizado o método de diluição em caldo. As mortadelas foram elaboradas com as combinações de óleos essenciais e compostos majoritários, mais efetivas, nos testes *in vitro*, com 0 e 150 ppm de nitrito. As amostras para análises microbiológicas foram armazenadas, a 25 °C/30 dias, sendo inoculadas com 10⁴ UFC/g de endósporos de *C. botulinum*. As amostras para análises físico-químicas foram armazenadas a 4 °C/30 dias. Houve interação significativa (<0,05) quanto ao efeito óleo, o nitrito e o tempo sobre o microrganismo, ocorrendo redução na contagem de células e para o pH, em que foi verificado um aumento deste no final da estocagem. Também houve interação significativa em todos os tratamentos p(<0,05) e o nitrito, quanto à estabilidade da emulsão, ocorrendo diminuição desta. Quanto à oxidação lipídica, houve efeito significativo p(<0,05) do nitrito, sendo observados menores valores em amostras adicionadas de nitrito. Para o nitrito residual houve efeito significativo p(<0,05) nas interações entre nitrito e tempo, ocorrendo diminuição nos níveis de nitrito de acordo com o tempo. A adição das combinações nas mortadelas não afetou a cor final do produto, tendo o efeito do nitrito sido significativo (p<0,05) na mudança de cor. Em relação à textura, houve efeito significativo (p<0,05) isolado da adição de nitrito para todos os parâmetros de textura, havendo maiores valores nas amostras adicionadas de nitrito e o efeito significativo (p<0,05) isolado da adição da mistura de óleos para os parâmetros flexibilidade e mastigabilidade, elevando os valores destes parâmetros. Portanto, ocorreu uma redução da população de *C. botulinum*, quando adicionadas às mortadelas as combinações dos óleos e composto majoritário e, na ausência das combinações, o efeito antimicrobiano ficou a cargo do nitrito. Para as análises físico-químicas o nitrito demonstrou maior efetividade.

Palavras-chave: Endósporo. Óleo essencial. Composto majoritário. Mortadela.

ABSTRACT

Essential oils are compounds formed by the secondary metabolism of plants and among their properties stand out the antioxidant and antimicrobial activities. The major compounds in the vast majority, are responsible for the antimicrobial activity and researches have been done to verify this action under the contaminating microorganisms in food. *Clostridium botulinum* is a sporulated microorganisms, their neurotoxin causes botulism, a disease that can lead to death or leave several sequels. This study aimed to evaluate the antimicrobial effect of essential oils of oregano and clove and the major compound carvacrol on endospores of *C. botulinum*, and mortadella inoculated in assessing the effect of these compounds on lipid oxidation, residual nitrite, pH, texture and color development in the product. To determine the minimum inhibitory concentration (MEC) the essential oils and the major compounds broth dilution method was used. The bologna were prepared with combinations of essential oils and major compounds, more effective, in vitro tests, with 0 and

150 ppm nitrite. The samples for microbiological analyzes were stored at 25 °

C/30 days, inoculated with 10⁴ CFU / g endospores *C. botulinum*. Samples for physical and chemical analysis were stored at 4 ° C/30 days. There was a significant interaction $p < 0.05$ effect on the oil, nitrite and time on microorganism with a decrease in cell counts and pH, in which there was an increase in this end of storage. There was also a significant interaction in all treatments $p < 0.05$ and nitrite, as the emulsion stability, this decrease occurring. As for lipid oxidation, significant effects $p < 0.05$ of nitrite, lower values being observed in samples with added nitrite. To the residual nitrite p significant effect ($p < 0.05$) interaction between the nitrite and time, there is a reduction in nitrite levels according to time. The addition of the mortadella combinations did not affect the final color of the product, and the effect of nitrite was significant ($p < 0.05$) in the color change. With respect to texture a significant effect ($p < 0.05$) isolated by the addition of nitrite to all the texture parameters, with higher values in the samples with added nitrite and significantly ($p < 0.05$) adding the mixture isolated from oils for flexibility and chewiness parameters, increasing the values of these parameters. Therefore, a reduction in the population occurred *C. botulinum*, when added to bologna, combinations of oils and major compound in the absence of combinations and the antimicrobial effect of nitrite was in charge. For the physicochemical analyzes nitrite demonstrated greater effectiveness.

Keywords: Endospore. Essential oil. Major compound. Mortadella.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações dos óleos essenciais de orégano e cravo e ou carvacrol utilizadas nas diferentes combinações.....	25
Tabela 2	Formulação de mortadela utilizada no experimento.....	25
Tabela 3	Proporções de diferentes combinações de óleos essenciais, carvacrol e concentrações de nitrito de sódio adicionados a mortadelas.....	26
Tabela 4	Efeito esporicida dos óleos essenciais de orégano, alecrim e cravoda-índia sobre <i>Clostridium botulinum</i>	32
Tabela 5	Efeito esporicida dos compostos majoritários terpinen-4-ol, cinamaldeído, carvacrol, eugenol e timol sobre <i>Clostridium botulinum</i>	34
Tabela 6	Crescimento em placa das combinações dos óleos de orégano e cravo, e o composto majoritário carvacrol.....	36
Tabela 7	Média (\pm desvio padrão) dos efeitos dos níveis de nitrito e da adição de misturas de óleos essenciais na contagem de células vegetativas de <i>Clostridium botulinum</i> (log UFC/g) com o tempo de armazenamento a 4°C	37
Tabela 8	Média (\pm desvio padrão) do efeito dos níveis de nitrito e da adição de misturas de óleos essenciais sobre a estabilidade da emulsão das mortadelas.....	40
Tabela 9	Média (\pm desvio padrão) dos efeitos do tempo de armazenamento a 4 °C, no índice de luminosidade (L*) das mortadelas	41
Tabela 10	Média (\pm desvio padrão) do efeito dos níveis de nitrito nos índices de vermelho (a*) e de amarelo (b*) das mortadelas.....	42
Tabela 11	Médias (\pm desvio padrão) do efeito dos níveis de nitrito nos índice de TBARS das mortadelas.....	44
Tabela 12	Média (\pm desvio padrão) do efeito dos níveis de nitrito nos valores de nitrito residual das mortadelas de acordo com o tempo de armazenamento	46
Tabela 13	Média (\pm desvio padrão) do efeito do pH das mortadelas	47
Tabela 14	Média (\pm desvio padrão) do efeito da adição de nitrito nos parâmetros de textura das mortadelas.....	48
Tabela 15	Médias (\pm desvio padrão) do efeito das combinações de óleos essenciais nos parâmetros de textura das mortadelas	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	<i>Clostridium botulinum</i>	13
2.1.1	Toxinas botulínicas e botulismo	13
2.1.2	<i>Clostridium botulinum</i> em alimentos	14
2.2	Óleos essenciais	16
2.3	Mortadela	19
2.3.1	Nitrato e nitrito	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Óleos essenciais e compostos majoritários	21
3.2	Microrganismo, cultura estoque e padronização do inóculo: células vegetativas	21
3.3	Obtenção, padronização e manutenção do inóculo: endósporos	22
3.4	Determinação da concentração mínima esporicida	23
3.5	Concentração mínima esporicida das combinações dos óleos essenciais e carvacrol	24
3.6	Fabricação da mortadela	25
3.7	Contagem de células vegetativas de <i>Clostridium botulinum</i>	27
3.8	Análises tecnológicas da mortadela	27
3.8.1	Estabilidade da emulsão da massa crua	27
3.8.2	Concentração de nitrito residual	28
3.8.3	Oxidação lipídica	29
3.8.4	Cor objetiva	29
3.8.5	Índice de pH	30
3.8.6	Análise de textura	30
3.9	Análises estatísticas	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	Concentração mínima esporicida (CME) dos óleos e compostos majoritários	32
4.2	Efeito esporicida das combinações de óleos essenciais e carvacrol	35
4.3	Ação conservante sobre <i>Clostridium botulinum</i> em mortadelas	36
4.4	Estabilidade da emulsão	39
4.5	Análise da cor objetiva	40
4.6	Índice de TBARS	43

4.7	Nitrito residual	46
4.8	pH	47
4.9	Análise de textura	48
5	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

Clostridium botulinum é uma bactéria anaeróbia obrigatória gram-positiva que se apresenta na forma de bastonetes. Por ser formadora de endósporos, apresenta alta resistência ao tratamento térmico aplicado aos alimentos, fato que a torna de grande importância na indústria alimentícia, uma vez que, em alimentos pouco ácidos ($\text{pH} > 4,5$) e em condições anaeróbicas, os endósporos podem germinar, com conseqüente multiplicação das células vegetativas e produção de toxina. Ao ingerir alimentos contaminados com a toxina botulínica, os indivíduos desenvolvem o botulismo, doença com sintomas neurológicos, promovendo paralisia flácida com alta taxa de mortalidade.

Dentre os alimentos de baixa acidez cujo controle de *C. botulinum* apresenta grande importância, destacam-se os embutidos cárneos curados, como a mortadela. Embora eles sejam cozidos, o tratamento térmico aplicado não é suficiente para a inativação dos endósporos da bactéria que, após serem submetidos ao estresse térmico, germinam. Uma vez eliminada ou reduzida a microbiota acompanhante presente no alimento, sendo o ambiente anaeróbico, a bactéria se multiplica facilmente, desde que não haja quantidades adequadas ou nenhum conservante no alimento visando à inibição da germinação desses endósporos. Assim, os sais de nitrato e nitrito têm grande aplicação como conservantes na indústria cárnea, uma vez que, atualmente, são os únicos conservantes utilizados por esse segmento da indústria alimentícia, visando à inibição da germinação dos endósporos de *C. botulinum*. Entretanto, o nitrito em produtos cárneos é transformado em ácido nitroso, o qual pode reagir com aminas, formando compostos N-nitrosos, em especial as nitrosaminas, que têm efeito tóxico, mutagênico, neuro, nefrotóxico e carcinogênicos. Assim, a substituição total ou parcial desse conservante é interessante.

Nesse contexto, os óleos essenciais de condimentos se destacam, pois são considerados *generally recognized as safe*, ou GRAS, geralmente tidos como seguros e apresentam atividade antimicrobiana e esporicida, além de serem antioxidantes e conferirem sabor e aroma ao produto. Entretanto, sabe-se que, em determinados alimentos, elevadas concentrações de óleos essenciais devem ser empregadas para que se alcance o efeito antimicrobiano desejado. Como alternativa aos óleos essenciais, que também podem ser utilizados em alimentos sendo reconhecidos como GRAS, têm-se alguns de seus compostos majoritários, os quais podem ser utilizados nos embutidos cárneos cozidos, diminuindo o impacto de sabor e odor dos óleos essenciais.

Este estudo foi realizado com os objetivos de avaliar o efeito esporicida de óleos essenciais de orégano e cravo-da-índia e do composto majoritário carvacrol sobre endósporos de *Clostridium botulinum* inoculados em mortadela e avaliar o efeito dessas combinações sobre a oxidação lipídica, o nitrito residual, o pH, a textura e o desenvolvimento da cor no produto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum é um bacilo gram-positivo, anaeróbio obrigatório, formador de endósporos e produtor de neurotoxina, a qual é produzida durante a fase exponencial de crescimento da bactéria, sendo liberada no alimento durante a lise celular, na liberação dos endósporos, durante a fase estacionária (SHARMA et al., 2006).

O hábitat natural do *C. botulinum* é o trato intestinal de equinos, aves e bovinos, onde o microrganismo se multiplica e é liberado em quantidade considerável nas fezes, durante um período maior que oito semanas após a infecção. Também é encontrado frequentemente em solo, legumes, verduras, frutas, sedimentos aquáticos e fezes humanas (CERESER et al., 2008). As necessidades nutricionais de *C. botulinum* são complexas, necessitando de certas condições para o seu crescimento, como minerais, vitaminas do complexo B e aminoácidos, além de pH maior que 4,5, a_w entre 0,94 e 0,97, concentração de NaCl menor que 10%, temperatura acima de 12,5 °C para linhagens proteolíticas e acima de 3,3 °C para linhagens não proteolíticas e anaerobiose (JAY, 2005).

2.1.1 Toxinas botulínicas e botulismo

Clostridium botulinum produz três tipos de toxinas, a neurotoxina botulínica, a toxina C2 e a toxina C3. A toxina botulínica afeta os neurônios, enquanto as toxinas C2 e C3 causam danos celulares, facilitando o espalhamento da toxina botulínica nos tecidos (BHUNIA, 2008).

Existem sete tipos de toxinas botulínicas que são antígenicamente distintas e classificadas sorologicamente em A, B, C, D, E, F e G. Os tipos A, B

e E são comumente causadores do botulismo em humanos; o tipo F, menos associado; os tipos C e D, raramente associados ao botulismo humano e o tipo G nunca teve relatado seu envolvimento com a doença em humanos (SHARMA et al., 2006). As cepas proteolíticas de *C. botulinum* produzem as toxinas A, B e F, enquanto as não proteolíticas produzem as B, C, D e F (BHUNIA, 2008).

A toxina botulínica é constituída de duas proteínas tipo A-B que, unidas, constituem a forma inativa da toxina. Após a ação de proteases produzidas pelas cepas de *C. botulinum* proteolíticas ou pelo estômago, a toxina torna-se ativa, sendo constituída de duas subunidades: B, denominada de cadeia pesada (100 kDa) e A, denominada cadeia leve (50 kDa). As duas subunidades ficam unidas por uma ponte dissulfeto. A neurotoxina botulínica bloqueia os neurotransmissores, resultando na paralisia flácida (BHUNIA, 2008)

2.1.2 *Clostridium botulinum* em alimentos

O botulismo de origem alimentar é uma doença grave e mortal, causada pela ingestão de alimentos contendo neurotoxinas pré-formadas (PECK et al., 2010).

Por serem amplamente distribuídos na natureza, os endósporos de *C. botulinum* chegam facilmente aos alimentos, contaminando tanto os de origem vegetal quanto animal. Entretanto, o grande problema da presença dos endósporos é quando contaminam alimentos de baixa acidez, como embutidos cárneos, enlatados ou conservas que não sofrem tratamento térmico adequado ou que não contêm conservante. Devido às condições anaeróbicas geradas nesse tipo de alimento e ao estresse térmico causado ao endósporo, estes germinam e as células vegetativas se multiplicam produzindo toxina, a qual é liberada no alimento, podendo a causar o botulismo em humanos, caso ocorra sua ingestão (SCARCELLI; PIATTI, 2002).

Carlin et al. (2004), avaliando amostras de matérias-primas em indústrias de alimentos na França, constataram a presença de *C.botulinum* em peixes e mariscos (7,8%), carnes e aves (8,4%), aromatizantes e molhos (1,6%), agentes espessantes, como o amido (16%), leite em pó (11,5%), especiarias, ervas e cogumelos desidratados (0%).

Hosseini et al. (2009) analisaram 131 amostras de produtos alimentícios tradicionais iranianos, 57 amostras de queijos, 11 amostras de kashk e 63 amostras de peixes salgados e detectaram a neurotoxina botulínica em 3,5% das amostras de queijos e 6,36% das amostras de peixe salgado. Em 50% dos casos positivos foi encontrada a neurotoxina tipo A; em 33,3%, a do tipo E e em 16,6%, a do tipo B.

Schocken-Iturrino et al. (1999) avaliaram a presença de *C. botulinum* em 85 amostras de mel de diversos pontos comerciais de quatro estados brasileiros, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul e São Paulo. Das amostras analisadas, 27,06% estavam contaminadas com bastonetes esporulados gram-positivos. Ensaio com ratos foram realizados para se observar a presença de neurotoxina, obtendo-se resultado positivo em seis amostras, que levaram à paralisia e à morte dos animais em até três dias após a inoculação.

Em seus estudos, Ragazani et al. (2008) coletaram cem amostras de mel comercializado no Brasil por vendedores ambulantes, feiras livres e mercados, nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Ceará e Santa Catarina. Foi observada a presença de bactérias esporuladas em 61%. Destas, 39% apresentaram-se como bactérias sulfito-redutoras, sendo que 11% eram do gênero *Clostridium*, sendo 7% *C. botulinum*.

Amstalden, Serrano e Manhani (1997) avaliaram o risco da transmissão do botulismo pelo consumo de mortadela e presunto, examinando 100 amostras coletadas de estabelecimentos comerciais do município de Campinas, estado de São Paulo. A formação de toxina botulínica foi detectada nas amostras de

presunto artificialmente contaminadas, após 12 dias de estocagem à temperatura de 30 °C. Ao fim de 28 dias de estocagem, na mesma temperatura, não foi detectada toxina nas amostras de mortadela.

No ano de 2002, 72 casos de botulismo foram registrados na Polônia. Destes, os principais alimentos envolvidos foram os produtos cárneos, cerca de 56,9%. Dentre estes, cerca de 18,1% dos casos estavam envolvidos com conservas caseiras de carne de porco, 13,9% com salsichas caseiras, 12,5% com peixes enlatados, 12,5% com salsichas produzidas comercialmente e 11,1% com derivados de carne de frango (PRZYBYLSKA, 2002).

2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas químicas complexas, originárias do metabolismo secundário das plantas, voláteis, com muitos componentes, de 20 a 60, que se encontram em diferentes concentrações, entre eles terpenos, compostos aromáticos e terpenoides. A sua síntese pode ocorrer em todos os órgãos da planta, como brotos, flores, folhas, caules, ramos, sementes, frutos e raízes, e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008).

A coleta das plantas para a extração do óleo essencial deve ser feita na parte da manhã, período no qual a temperatura é mais amena, e na ausência de chuvas, de modo a se obter maior rendimento de óleo. Os métodos pelos quais são obtidos os óleos essenciais são escolhidos de acordo com a localização do óleo na planta e com a proposta de sua utilização. Os mais comuns são a enfloração (retira-se o óleo das pétalas das flores); arraste por vapor d' água (processo no qual os óleos possuem tensão de vapor mais elevada que a água, portanto, os óleos são arrastados pelo vapor d' água); extração por solventes orgânicos (os óleos são extraídos com solventes apolares); prensagem (processo

empregado para extrair óleo de frutos: o pericarpo é prensado e, em seguida, separa-se o óleo; extração por CO₂ crítico: o CO₂ liquefeito, mas sob compressão e aquecido a 31 °C, passa a ter viscosidade análoga à do gás, mas sua dissolução é elevada como a de líquido, extraindo-se o óleo com perfeição) (CASTRO et al., 2006; SIMÕES et al., 2007).

A composição química dos óleos essenciais pode variar devido às alterações na produção dos metabólitos secundários. Dentre os fatores que podem interferir na produção desses metabólitos encontram-se o desenvolvimento da planta e a sazonalidade; o índice pluviométrico, também relacionado com a sazonalidade na época da coleta, a temperatura e a altitude em que a planta se encontrava, e o órgão da planta em que foi coletado o óleo (GLOBO-NETO; LOPES, 2007).

Os componentes majoritários são aqueles que estão presentes no óleo essencial em altas concentrações, de 20% a 70%. Geralmente, são dois ou três componentes do óleo. Também existem outras substâncias que contribuem para a composição dos óleos, mas são encontradas em menores quantidades (BAKKALI et al., 2008). O carvacrol, o timol, o terpinen-4-ol e o aldeído cinâmico são alguns exemplos de compostos majoritários de óleos essenciais (ALVES et al., 2004; HART et al., 2000; TEISSEGRE; WATERHOUSE, 2000; ULTEE; KETS; SMID, 1999).

Pereira et al. (2008) obtiveram as seguintes proporções e substâncias do óleo essencial do *Origanum vulgare*: 0,7% de pineno, 1,1% de felandreno, 2,7% de mirceno, 6,9% de terpineno, 4,6% de p-cimeno, 2,3% de felandreno, 16,6% de cimeno, 16,0% de terpineno, 1,8% de terpinoleno, 12,3% de linalol, 26,3% de terpinen-4-ol, 3,8% de -terpineol, 0,8% de timol metil éter, 1,6% de carvacrol metil éter, 1,7% de acetato de linalila, 7,2% de carvacrol e 1,3% de trans-cariofileno.

Os óleos essenciais possuem, em sua constituição, fenóis, que são substâncias mais eficientes contra os microrganismos do que aquelas que têm compostos não fenólicos. Geralmente, os endósporos são mais sensíveis à ação dos óleos essenciais do que as células vegetativas, devido à sua natureza hidrofóbica, portanto, quantidades menores desses óleos são suficientes para inibi-los. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra os endósporos pode ocorrer por inibição de um ou vários processos diferentes envolvendo a transição do endósporo para a célula, como a germinação, o crescimento e a multiplicação celular (CHAIBI et al.,1997).

Segundo Fu et al. (2007), o óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) apresentou, em sua composição química, 68,52% de eugenol, 19,00% de β -cariofileno, 10,15% de 2-metoxi-4-[2-propenil] de acetato de fenol e 1,85% α -cariofileno, e o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) apresentou 27,23% de 1, 8-cineol, 19,43% de α -pineno, 14,26% de cânfora, 11,52% de canfeno, 3,17% de borneol, 2,41% de β -cariofileno e 1,13% de acetato de bornil. Estes autores observaram que ambos os óleos possuem um amplo espectro de atividade antimicrobiana e uma combinação entre os óleos pode ser usada pela medicina e pela indústria de alimentos.

A atividade antioxidante dos óleos essenciais se deve aos seus compostos fenólicos, como o carvacrol e o timol (YANISHLIEVA et al., 1999). Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para seu crescimento e reprodução. Além disso, se formam em condições de estresse, como infecções, injúrias e radiações UV, dentre outros. De acordo com modo de ação, os antioxidantes dos óleos essenciais podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação por meio da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode

reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autoxidação por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (ANGELO; JORGE, 2007).

A mortadela é um produto apreciado por muitos, já em tempos remotos. A seguir, são listadas algumas de suas características.

2.3 Mortadela

Define-se mortadela por produto cárneo industrializado, resultante da emulsão das carnes de animais de açougue, geralmente acrescido ou não de toucinho, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, em diferentes formas e submetido a um tratamento térmico adequado. A mortadela é composta de até 60% de carnes e 10% de miúdos comestíveis de diferentes espécies de animais de açougue, podendo ser adicionada de pele e tendões (BRASIL, 2000).

O teor máximo de umidade permitido na mortadela é de até 65%, visto que a umidade está relacionada com as condições higiênico-sanitárias do produto, pois propicia o desenvolvimento de microrganismos (BRASIL, 2000).

A mortadela é um embutido que proporcionou acesso à proteína de origem animal à parte da população que não tinha condições de suprir a quantidade mínima diária recomendada de proteína consumindo carne *in natura*. Entretanto, a tecnologia aliou a funcionalidade da proteína cárnea às propriedades sensoriais que fizeram da mortadela um produto apreciado por todas as classes sociais (YUNES; BORON, 2006).

A fabricação da mortadela, na indústria, inicia-se com a recepção das matérias-primas cárneas. Em seguida, a carne e o toucinho são picados,

homogeneizados no *cutter*, juntamente com água, fécula e condimentos, como sal refinado e alho moído. Alguns antioxidantes também podem ser adicionados, como o eritorbato de sódio e ácido cítrico, e estabilizantes, como o polifosfato de sódio (GANHÃO, 2010).

2.3.1 Nitrato e nitrito

O nitrato e o nitrito de sódio, denominados como sais de cura, são amplamente utilizados como aditivos alimentares no processamento de produtos cárneos. Os sais de nitrito são conservantes da carne, são fixadores de cor e agentes de cura. Seus efeitos adversos são representados, principalmente, pela formação de nitrosaminas, o que torna o seu uso discutível, devido à possibilidade de originar compostos nitrosos de ação carcinogênica (OLIVEIRA; ARAÚJO; BORGGO, 2005).

O nitrito e o nitrato de sódio possuem limites máximos para uso de 150 e 300 ppm, respectivamente, e a mistura desses 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, 1999).

A adição de nitrito em produtos cárneos é realizada, principalmente, devido à sua ação antimicrobiana, pois ele inibe o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, impedindo o seu crescimento e a produção de toxinas pelo *C. botulinum*. Cada país propõe a quantidade de nitrito a ser utilizada nesses produtos, desde que seja suficiente para impedir o crescimento de *C. botulinum*, no entanto, em alguns estudos tem se afirmado que valores abaixo de 150 ppm são insuficientes para impedirem a produção da toxina botulínica em produtos cárneos (CASSENS, 1995; DUTRA, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e a fabricação das mortadelas e as análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Carnes e Derivados, ambos no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

3.1 Óleos essenciais e compostos majoritários

Foram utilizados os óleos essenciais de orégano, cravo-da-índia e alecrim, adquiridos da Ferquima Ind. e Com. e os compostos majoritários carvacrol, eugenol, terpinen-4-ol, cinamaldeído e timol, adquiridos da Sigma-Aldrich.

3.2 Microrganismo, cultura estoque e padronização do inoculo: células vegetativas

A bactéria utilizada para a realização do estudo foi o *C. botulinum* tipo D, cedida gentilmente pelo Laboratório Nacional de Agropecuária (LANAGRO), de Pedro Leopoldo, MG.

A cultura liofilizada foi reativada em meio *Differential Reinforced Clostridium* BaseBroth (DRCBB, Himedia®) suplementado com 0,5% de solução filtrada de sulfato de sódio (4%) e citrato férrico (7%), com incubação a 37 °C/48h. Após esse período, a cultura foi centrifugada, a 3.000 g , por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e adicionado o 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). As células vegetativas foram armazenadas a -18 °C.

Para a reativação da cepa foi utilizado o meio DRCBB (Himedia®) suplementado com 0,5% de solução filtrada de sulfato de sódio e citrato férrico, com incubação a 37 °C/48h. Este processo foi realizado por duas vezes consecutivas e a padronização do inóculo foi realizada pela elaboração de curva de crescimento, acompanhando-se a absorbância (D.O. _{600nm}) e a contagem em placa utilizando-se ágar base de isolamento de *Clostridium botulinum* (40 g de caseína, 5 g de extrato de levedura, 2 g de dextrose, 0,02 g de púrpura de bromocresol, 5 g de fosfato de sódio 2, 2 g de cloreto de sódio, 0,01 g de sulfato de magnésio e 20 g de ágar. As placas foram incubadas, a 37 °C/48 h, em anaerobiose. O inóculo foi padronizado em 10⁸ UFC/mL.

3.3 Obtenção, padronização e manutenção do inóculo: endósporos

Alíquotas de 0,1 mL de cultura de célula vegetativa padronizada foram transferidas para placas de Petri contendo ágar Ak n° 2 (Himedia®) e incubadas, a 37 °C/120 h, em anaerobiose, para a obtenção dos endósporos.

Para a padronização do número de endósporos, as placas foram lavadas com 10 mL de solução salina a 0,9% (m/v), sendo realizadas a leitura da absorbância (D.O._{600nm}) e a observação ao microscópio óptico dos endósporos corados pela técnica de Wirtz-Conklin, utilizando solução corante de verde malaquita 5% (m/v) e o contracorante safranina 0,5% (m/v). Ao verificar que as células vegetativas encontravam-se na forma de endósporos, a suspensão foi submetida ao choque térmico (70 °C/15 min) e, em seguida, ao rápido resfriamento em banho de gelo. Foram realizadas diluições seriadas em água peptonada 0,1% (m/v) e plaqueamento em superfície em ágar base de isolamento

de *Clostridium botulinum*. As placas foram incubadas em anaerobiose, a 37 °C/48 h. A suspensão foi padronizada em 10⁴ UFC/mL de endósporos.

Os endósporos foram mantidos congelados em meio de congelamento com dupla concentração de glicerol (30 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).

3.4 Determinação da concentração mínima esporicida

As concentrações mínimas esporicidas (CME) dos compostos majoritários e óleos essenciais foram determinadas empregando-se a técnica de diluição em caldo (NATIONAL COMMIT (TEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003). Em todos os tubos foram inoculados 10⁴ UFC/mL de endósporo. Os óleos essenciais de orégano e alecrim e os compostos majoritários, eugenol, carvacrol, terpinen-4-ol e cinamaldeído foram adicionados ao caldo *reinforced Clostridium* base, acrescido de 0,5 % (v/v) de Tween 80, nas concentrações de 20; 18; 15; 13; 10; 08; 05 e 03 µL/mL, tendo, para o óleo essencial de cravo-da-índia, também sido testadas as concentrações de 30 e 25 µL/mL. Já o timol foi testado nas concentrações de 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 e 05 µL/mL. Foram realizados os controles positivo, tubos contendo caldo *reinforced Clostridium* base acrescido de 0,5 % (v/v) Tween 80 e negativo, tubos adicionados de 996 µL de caldo *reinforced Clostridium* base acrescido de 0,5 % (v/v) Tween 80 e 4 µL de solução de cloranfenicol 0,1% (m/v). Os tubos foram incubados em anaerobiose, a 37 °C/48h. Após esse período, a partir dos tubos nos quais não houve turvação do meio, alíquotas de 0,1 mL do meio foram transferidas para placas de Petri contendo ágar base *Clostridium botulinum* e incubadas a 37 °C/48 h. Foram consideradas CME dos

compostos e óleos essenciais aquelas onde não se observou crescimento nas placas.

3.5 Concentração mínima esporicida das combinações dos óleos essenciais e carvacrol

Os óleos essenciais de orégano e cravo-da-índia e o carvacrol foram utilizados em sua CME em combinações, conforme a Tabela 1.

Para a avaliação do efeito biocida da combinação entre os óleos essenciais e o composto majoritário, foi utilizada a metodologia diluição em caldo (NATIONAL COMMIT (TEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003). Os tubos foram incubados em anaerobiose, a 37 °C/48h. Após esse período, a partir dos tubos nos quais não houve turvação do meio, alíquotas de 0,1 mL do meio foram transferidas para placas de Petri contendo ágar base *Clostridium botulinum* e incubadas a 37 °C/48 h. Foram consideradas CME das combinações de óleos essenciais e carvacrol aquelas nas quais não se observou crescimento nas placas. As análises foram realizadas em três repetições em triplicata.

Tabela 1 Concentrações dos óleos essenciais de orégano e cravo e ou carvacrol utilizadas nas diferentes combinações

Ensaio	Orégano μL/mL	Cravo-da-índia μL/mL	Carvacrol μL/mL
1	12,5	-	-
2	-	25	-
3	-	-	5
4	6,3	12,5	-
5	6,3	-	2,5
6	-	12,5	2,5
7	8,4	4,25	0,85
8	2	16,8	0,85
9	2	4,25	3,35
10	4,12	8,25	1,65

3.6 Fabricação da mortadela

A mortadela foi fabricada de acordo com Dutra (2011), com algumas modificações (Tabela 2) e adicionada de diferentes combinações de óleos, compostos majoritários e concentração de nitrito (Tabela 3).

Tabela 2 Formulação de mortadela utilizada no experimento

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

Tabela 3 Proporções de diferentes combinações de óleos essenciais, carvacrol e concentrações de nitrito de sódio adicionados a mortadelas

Ingredientes	Nitrito (ppm)	Orégano ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Cravo ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Carvacrol ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
CONT	0	0	0	0
TCO1	0	8,4	4,25	0,85
TCO2	0	4,12	8,25	1,65
CONT	150	0	0	0
TCO1	150	8,4	4,25	0,85
TCO2	150	4,123	8,25	1,65

Concentrações baseadas na CME de cada óleo essencial e composto majoritário

A carne bovina foi previamente moída. Sal, fosfato, nitrito, ácido ascórbico, água/gelo, fécula de mandioca, óleos essenciais ou carvacrol e toucinho foram adicionados ao *cutter* para a fabricação da mortadela. Em seguida, a massa foi embutida manualmente em tripas sintéticas e embaladas. A cocção foi realizada por imersão em banho-maria, observando-se os seguintes passos: 55 °C/30 min; 65 °C/30 min; 75 °C/30min e 85 °C, até atingir uma temperatura final de 71 °C no ponto frio da amostra. Depois do cozimento, as mortadelas foram armazenadas, a 4 °C/48h, quando foram realizadas as análises tecnológicas.

A cada repetição por tratamento com as combinações de óleos e os compostos majoritários foi fabricado 1 kg de mortadela, embutida em duas tripas com 400 g cada, destinados às análises físicas e químicas e duas amostras de 25 g cada foram colocadas e cozidas em embalagens plásticas para a realização das análises microbiológicas. Para estas análises, as amostras de 25 g, após o cozimento, foram homogeneizadas em Stomacher Metroterm[®] (490 golpes/2 min) e, em seguida, inoculadas 10^4 UFC/g de endósporos de *C. botulinum* tipo D. Posteriormente, as porções foram seladas a vácuo nas embalagens plásticas e levadas à geladeira, por 24 horas e por 30 dias.

3.7 Contagem de células vegetativas de *Clostridium botulinum*

As embalagens contendo 25 g do produto foram abertas assepticamente e este homogeneizado em 225 mL de água peptonada a 0,1% (m/v), em Stomacher Metroterm® (490 golpes/2 min). As diluições seriadas foram feitas em água peptonada 0,1% (10^{-1} a 10^{-4}). Em seguida, as diluições foram plaqueadas em ágar base de isolamento de *Clostridium botulinum* e incubadas em anaerobiose, a 37 °C/48 h. Posteriormente, foi realizada a contagem das colônias.

3.8 Análises tecnológicas da mortadela

3.8.1 Estabilidade da emulsão da massa crua

A estabilidade de emulsão foi determinada em triplicata, de acordo com Hughes, Cofrades e Troy (1997), com modificações. Aproximadamente 25 g da emulsão crua, recém-elaborada (Pa), foram colocados em tubo de centrífuga de polietileno de 50 mL e centrifugados (centrífuga *Mettich*, modelo *Zentrifuger EBA21*), por 1 minuto, a 3.000 g. Após a centrifugação, os tubos foram aquecidos em banho-maria, a 70 °C/30 min, resfriados em água corrente e novamente centrifugados, a 3.000 g, por 3 minutos, quando foram vertidos e esperou-se por 30 minutos. Em seguida, cadinhos de porcelana foram previamente pesados (PC_i) para que todo o sobrenadante fosse recolhido. A seguir, os cadinhos com exsudado (PC_{exs}) foram pesados e deixados secar em estufa, a 105 °C, por 12 horas (*overnight*) e, quando resfriados em dessecador, foram novamente pesados (PC_f).

A estabilidade da emulsão foi expressa pelo total de fluido exsudado (TEF) e pelo percentual de gordura e de sólidos solúveis no exsudado (GE_{TEF}) em relação à massa de amostra, ou seja,

$$TEF (\%) = 100 \cdot \frac{(PC_{exs} - PC_i)}{P_a}$$

$$GE_{TEF}(\%) = 100 \cdot \frac{(PC_f - PC_i)}{(PC_{exs} - PC_i)}$$

3.8.2 Concentração de nitrito residual

O teor residual de nitrito, expresso em nitrito de sódio (ppm), foi determinado segundo o método oficial n° 973.31 da *Association of Official Analytical Chemists* (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1998).

Alíquotas de 5 g de amostras trituradas foram homogeneizadas com 40 mL de água destilada aquecidas a 80 °C e transferidas para balão volumétrico de 500 mL. Lavagens sucessivas foram conduzidas com água quente, até atingir o volume aproximado de 300 mL. O balão ficou em repouso em banho-maria durante duas horas, a 80 °C, sendo agitado ocasionalmente. Após o repouso, o balão foi resfriado à temperatura ambiente e seu volume completado com água destilada e filtrado. Alíquota do filtrado, contendo nitrito de sódio ($NaNO_2$), foi adicionada de 2,5 mL de solução de sulfanilamida em ácido acético em frasco de 50 mL e homogeneizado. Após cinco minutos, foram adicionados 2,5 mL do reagente dicloreto de N-(1-naftil) – etilenodiamina (NED) e o volume completado com água destilada. A solução foi agitada e mantida em repouso

durante 15 minutos para o desenvolvimento da cor, sendo a absorvância (D.O._{540 nm}) medida.

A concentração de nitrito de sódio foi obtida por curva analítica.

3.8.3 Oxidação lipídica

A oxidação lipídica foi determinada pelo índice de substâncias reativas ao ácido tiobartúrico (TBARs), de acordo com a metodologia proposta por Raharjo et al. (1992), com algumas adaptações. Cerca de 10 g de amostra foram homogeneizados em 40 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% e 1 mL de butil-hidroxitolueno (BHT) 0,15%, centrifugada a 3.000 g, por 2 minutos e o sobrenadante filtrado para balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume completado com TCA 5%. Uma alíquota de 5 mL foi, então, adicionada de 5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,08M em ácido acético 50%, incubada em banho-maria fervente, por 5 minutos e a absorvância lida a 531 nm.

Os valores foram expressos em miligramas de malonaldeído (MAD) por quilograma de amostra (mg de MAD/kg), por meio da curva analítica, utilizando-se 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP).

3.8.4 Cor objetiva

As mortadelas foram fatiadas ao meio e a superfície interna avaliada por um colorímetro-espectrofotômetro CM-700d (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japão), sendo os índices de cor (L^* , a^* e b^*) obtidos utilizando-se o iluminante D65, ângulo do observador 10° e considerando o valor médio de cinco leituras realizadas em diferentes pontos da superfície (DUTRA et al., 2011).

3.8.5 Índice de pH

As amostras foram colocadas em um béquer, na quantidade de 5 g. Foram adicionados 50 ml de água destilada, homogeneizou-se e o valor de pH foi obtido com eletrodo combinado (sistema de referência de Ag/AgCl) acoplado a um potenciômetro DM20 (Digimed, São Paulo, SP, Brasil).

3.8.6 Análise de textura

Amostras de cada tratamento foram analisadas pelo teste de análise de perfil de textura (TPA), segundo procedimento descrito por Ramos e Gomide (2007) para produtos curados, sendo utilizado um texturômetro TA.XT2i-plus Texture Analyser (Stable Micro System Ltd., Surrey, Inglaterra), conectado a um computador equipado com o programa Texture Expert®. Seis amostras (replicatas), cortadas em cubos de 1,0 cm de aresta, foram comprimidas duas vezes até 50% de seu tamanho, com um prato de compressão de 7,5 cm de diâmetro. Não houve tempo de repouso da amostra entre os dois ciclos de compressão. A curva de deformação com o tempo foi obtida a uma velocidade de compressão de 180 mm/minuto, a partir da qual foram gerados seis parâmetros de textura, segundo Ramos e Gomide (2007): dureza (N), coesividade, adesividade (N.mm), flexibilidade (mm) e mastigabilidade (N.mm).

3.9 Análises estatísticas

Após a escolha dos tratamentos, de acordo com os melhores resultados obtidos pelo CME, os dados das análises das mortadelas foram comparados por

meio do programa Statistical Analysis System (SAS), utilizando delineamento inteiramente casualizado (DIC) em parcela subdividida: parcela em esquema fatorial com 2 níveis de nitrito x 3 níveis de óleo e subparcela com dois tempos. Os testes realizados foram Anova, o Teste de Média de Tukey e o Teste de F.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Concentração mínima esporicida (CME) dos óleos e compostos majoritários

A CME do óleo essencial de orégano foi de 13 μ L/mL e do cravo, 25 μ L/mL; já o óleo essencial de alecrim não inibiu a germinação e o crescimento de *C.botulinum* em todas as concentrações testadas (Tabela 4).

Tabela 4 Efeito esporicida dos óleos essenciais de orégano, alecrim e cravo-da-índia sobre *Clostridium botulinum*

Concentrações μ L/mL	Crescimento em placa		
	Orégano	Alecrim	Cravo-da-índia
30	N	n	-
25	N	n	-
20	-	+	+
18	-	+	+
15	-	+	+
13	-	+	+
10	+	+	+
8	+	+	+
5	+	+	+
3	+	+	+

(n) não avaliado, (-) ausência de crescimento, (+) crescimento

Na literatura há poucos relatos sobre a ação de óleos essenciais ou seus compostos sobre *C. botulinum*.

Marino, Bersani e Comi (2001) analisaram a atividade antimicrobiana de especiarias e o óleo essencial de orégano foi o mais efetivo, inibindo tanto as bactérias gram-positivas quanto as gram-negativas. Hoffmann et al. (1999)

determinaram a atividade antimicrobiana de quatro óleos essenciais, dentre eles o óleo essencial de cravo-da-índia, sobre 14 espécies de bactérias (*Azotobacter* sp., *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringensis*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas acidovorans*, *Pseudomonas fluorescen*, *Rhizobium* sp., *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*). Todas as bactérias foram sensíveis ao óleo essencial de cravo na concentração de 10%.

Ouattara et al. (1997) demonstraram que os óleos essenciais que têm componentes majoritários, como o carvacrol, o timol e o eugenol, apresentam atividade antimicrobiana maior do que óleos que têm outros compostos majoritários em sua composição. De acordo com Dias (2011), o óleo essencial de alecrim tem como composto majoritário o 1-8 cineol, um composto que não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas sobre o *Clostridium perfringens*. Entretanto, segundo o mesmo autor, o óleo essencial de orégano, que tem como composto majoritário o carvacrol, e o óleo essencial de cravo, cujo composto majoritário é o eugenol, foram excelentes antimicrobianos.

O efeito esporicida dos compostos terpinen-4-ol, cinamaldeído, carvacrol, eugenol e timol é apresentado na Tabelas 5.

Tabela 5 Efeito esporicida dos compostos majoritários terpinen-4-ol, cinamaldeído, carvacrol, eugenol e timol sobre *Clostridium botulinum*

Concentrações ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Terpinen- 4-ol	Cinamaldeído	Carvacrol	Eugenol	Timol
40	n	n	n	n	-
35	n	n	n	n	-
30	n	n	n	n	-
25	n	n	n	n	-
20	+	-	-	-	-
18	+	-	-	+	n
15	+	-	-	+	-
13	+	-	-	+	n
10	+	-	-	+	+
8	+	-	-	+	n
5	+	-	-	+	+
3	+	+	+	+	n

(-) ausência de crescimento, (+) presença de crescimento, (n) não avaliado

O terpinen-4-ol não apresentou atividade esporicida sobre *C. botulinum*. Já o cinamaldeído e o carvacrol apresentaram CME de 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e o eugenol, de 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$, demonstrando serem excelentes antimicrobianos.

A CME estabelecida para o timol foi a de 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Utilizaram-se concentrações diferentes porque o timol precisa ser previamente diluído em dimetilsulfóxido (DMSO), uma vez que é encontrado na forma sólida, mas também demonstrou ser excelente esporicida.

Laurence e Palombo (2009) analisaram a atividade esporicida do óleo de *Melaleuca (tea tree)*, o qual tem como componente majoritário o terpinen-4-ol, sobre endósporos de *Bacillus subtilis*. Foi observada atividade esporicida contra os endósporos, mas, quando o composto majoritário foi testado separadamente, a ação esporicida foi reduzida. Neste caso, o efeito esporicida se deu ao efeito sinérgico do terpinen-4-ol com outros componentes do óleo e não somente do componente majoritário.

Bowless e Miller (1993) observaram que o cinamaldeído e outros aldeídos tiveram efeitos sobre a germinação de endósporos de *C. botulinum* tipo A e B, tendo o cinamaldeído apresentado atividade esporostática na concentração de 9,78 mM e esporicida em concentrações mais altas que 2.500 mM.

De acordo com Ultee, Kets e Smid (1999), o carvacrol foi considerado excelente antimicrobiano sobre *Bacillus subtilis*, inibindo o crescimento pela alteração da integridade da membrana citoplasmática, por ser um composto lipofílico, sendo observado o extravasamento extracelular de ATP.

Karapnar e Aktug (1987) observaram a inibição do crescimento de *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus* por vários compostos majoritários, dentre eles o eugenol e o timol. O eugenol foi mais efetivo sobre *V. parahaemolyticus*, seguido por *S. typhimurium* e, por último, *S. aureus*. Já o timol apresentou maior efeito antimicrobiano sobre *S. aureus*, seguido por *V. parahaemolyticus* e *S. typhimurium*.

4.2 Efeito esporicida das combinações de óleos essenciais e carvacrol

Dentre os óleos essenciais testados, devido à sua melhor ação antimicrobiana em menores concentrações, os óleos essenciais de orégano e cravo-da-índia, juntamente com o carvacrol, foram selecionados para avaliação em diferentes combinações, sendo sua ação antimicrobiana mostrada na Tabela 6.

Tabela 6 Crescimento em placa das combinações dos óleos de orégano e cravo, e o composto majoritário carvacrol

Combinações dos óleos e composto ($\mu\text{L/mL}$)				
Ensaio	Orégano	Cravo-da-índia	Carvacrol	Crescimento em placa
1	12,5	0	0	-
2	0	25	0	-
3	0	0	5	-
4	6,3	12,5	0	-
5	6,3	0	2,5	-
6	0	12,5	2,5	-
7	8,4	4,25	0,85	-
8	2	16,8	0,85	-
9	2	4,25	3,35	-
10	4,12	8,25	1,65	-

(-) ausência de crescimento

Todas as combinações testadas apresentaram ação esporicida. Fu et al. (2007) estudaram a atividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais e suas combinações sobre diversos microrganismos, como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, determinando suas concentrações mínimas inibitórias e suas concentrações mínimas bactericidas. Como resultado, tanto os óleos sozinhos como as combinações foram eficientes antimicrobianos *in vitro*, podendo ser utilizados, na medicina, como alternativas contra agentes infecciosos, ou como conservantes em alimentos.

4.3 Ação conservante sobre *Clostridium botulinum* em mortadelas

Como todas as combinações testadas entre os óleos essenciais de orégano e cravo-da-índia e o carvacrol foram efetivas sobre os endósporos de *C.botulinum*, então, foram selecionadas as combinações do ensaio 7 (TCO1), contendo 8,4 $\mu\text{L/mL}$ de orégano, 4,25 $\mu\text{L/mL}$ de cravo-da-índia e 0,85 $\mu\text{L/mL}$

de carvacrol e do ensaio 10 (TCO2), contendo 4,12 $\mu\text{L/mL}$ de orégano, 8,25 $\mu\text{L/mL}$ de cravo-da-índia e 1,65 $\mu\text{L/mL}$ de carvacrol como conservantes a serem adicionados à mortadela. Uma vez que ambos os óleos são utilizados como condimentos, buscou-se também não alterar as características sensoriais da mortadela.

Houve interação significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos (níveis de nitrito e mistura de óleos essenciais) e o tempo de armazenamento. Exceto para o controle, em que foi observado crescimento, todos os demais tratamentos implicaram em redução na contagem de células, após 30 dias de estocagem refrigerada (Tabela 7). Portanto, mesmo na ausência de nitrito, o óleo apresentou efeito antimicrobiano satisfatório, similar ao tratamento com adição de nitrito. Também não foi observado efeito sinérgico do óleo com nitrito, embora menor redução tenha sido observada nos tratamentos com 150 ppm de nitrito e a combinação TCO2.

Tabela 7 Média (\pm desvio padrão) dos efeitos dos níveis de nitrito e da adição de misturas de óleos essenciais na contagem de células vegetativas de *Clostridium botulinum* (log UFC/g) com o tempo de armazenamento a 4°C

NO ₂ (ppm)	Tempo (dias)	CONT	TCO1	TCO2
0	0	3,69 \pm 0,09 ^a	3,38 \pm 0,22 ^a	3,43 \pm 0,03 ^a
	30	4,92 \pm 0,04 ^b	2,68 \pm 0,23 ^b	2,61 \pm 0,38 ^b
	Δ	+1,23	-0,70	-0,81
150	0	3,22 \pm 0,27 ^a	3,44 \pm 0,16 ^a	3,18 \pm 0,03 ^a
	30	2,62 \pm 0,24 ^b	2,75 \pm 0,04 ^b	2,76 \pm 0,07 ^b
	Δ	-0,60	-0,69	-0,42

CONT= tratamento controle sem adição de óleo; TCO1= tratamento com adição de óleo na combinação 1; TCO2= tratamento com adição de óleo na combinação 2. Δ = Variação entre os dois tempos, + = aumento na contagem de células vegetativas, - = decréscimo na contagem de células vegetativas. Médias seguidas de letras diferentes na coluna e dentro de cada nível de nitrito diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste F

O nitrito é considerado um dos fatores mais relevantes para o controle de *C. botulinum* em produtos cárneos. Outros fatores também agem em conjunto com o nitrito, como pH, atividade de água, concentração de cloreto de sódio e temperatura de refrigeração (JUNQUEIRA, 1994).

Para confirmar a eficiência do nitrito, Cassens (1997) afirma que o uso do nitrito em produtos cárneos é necessário, pois uma de suas funções é inibir o crescimento do *C. botulinum* que, por ser anaeróbio obrigatório, tem a capacidade de se desenvolver em produtos embalados a vácuo. O nitrito residual, proveniente da quantidade de nitrito adicionada na formulação da mortadela, garante a qualidade microbiológica do produto, impedindo o desenvolvimento do microrganismo. Entretanto, caso sejam adicionadas concentrações inferiores a 150 ppm, o teor de nitrito residual do produto será menor que 10 ppm e, conseqüentemente, o risco do microrganismo se desenvolver nos produtos, caso haja algum tipo de contaminação, não pode ser descartado.

Dias (2011) também adicionou combinações de óleos essenciais na concentração de 75 ppm de nitrito em mortadela, no intuito de agir como antimicrobiano. Dentre os óleos essenciais, também foram utilizadas concentrações de óleo de orégano e cravo. Foram utilizadas as combinações com 75 ppm de nitrito e 3,1% de óleo essencial de orégano, uma outra combinação com 75 ppm de nitrito, 1% de tomilho, 2% de cravo-da-índia e 1% de capim-limão e uma última, com 75 ppm de nitrito, 2,5% de orégano, 0,3% de tomilho e 0,6% de cravo-da-índia. Como resultado, observou-se redução na população de *C. perfringens* nas mortadelas adicionadas dessas combinações, tendo a última combinação contendo orégano, tomilho e cravo-da-índia promovido maior redução populacional do microrganismo. As mortadelas apresentaram crescimento dos microrganismos após 10 dias de armazenamento, exceto na combinação com 75 ppm de nitrito e 3,1% de óleo essencial de orégano, não

havendo aumento significativo na população de *C. perfringens*. Os resultados demonstraram, assim como neste presente estudo, que as combinações foram eficientes, principalmente quando estava presente o óleo essencial de orégano, e o óleo essencial de cravo também teve considerável contribuição na redução microbiana.

Skandamis e Nychas (2002) também adicionaram óleo essencial de orégano em filés de carne bovina embalados em diferentes sistemas, no intuito de reduzir a população microbiana. Os pesquisadores obtiveram sucesso nas análises, reduzindo a população da microbiota do produto, demonstrando a eficiência do óleo essencial de orégano, podendo ser alternativa a ser colocada em prática com a função da conservação dos produtos cárneos. Dentre os microrganismos que tiveram uma redução da população, têm-se *Enterobacteriaceae*, bactérias do ácido láctico e *Pseudomonas* spp.

4.4 Estabilidade da emulsão

Houve interação significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos (níveis de nitrito e mistura de óleos essenciais) e, para as amostras contendo nitrito, a adição das misturas de óleo não afetou a estabilidade de emulsão (Tabela 8). Entretanto, a estabilidade da emulsão das amostras sem nitrito adicionadas da combinação TCO2 foi menor ($p < 0,05$) do que a das amostras controle ou adicionadas de TCO1. Provavelmente, houve alguma interação entre o nitrito adicionado e algum componente dos óleos ou composto majoritário da combinação TCO2.

Tabela 8 Média (\pm desvio padrão) do efeito dos níveis de nitrito e da adição de misturas de óleos essenciais sobre a estabilidade da emulsão das mortadelas

NO ₂ (ppm)	CONT	TCO1	TCO2
0	63,7 \pm 3,60 ^a	63,41 \pm 3,93 ^a	55,12 \pm 1,76 ^b
150	58,85 \pm 1,80	61,59 \pm 4,46	60,51 \pm 1,66

CONT= tratamento controle sem adição de óleo; TCO1= tratamento com adição de óleo na combinação 1 (μ L/mL: 8,4 de orégano, 4,25 de cravo-da-índia e 0,85 de carvacrol) ; TCO2= tratamento com adição de óleo na combinação 2 (μ L/mL: 4,12 de orégano, 8,25 de cravo-da-índia e 1,65 de carvacrol). Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey

De acordo com Terra et al. (2009), o principal fator de qualidade de um produto cárneo é a sua estabilidade final e ela está relacionada com a capacidade de reter água e gordura, obtendo-se uma textura final adequada durante todo o processo térmico. Para a indústria de produtos cárneos, uma emulsão estável é um importante parâmetro, no qual não há separação da gordura durante o cozimento. No entanto, a estabilidade da emulsão não está diretamente ligada apenas à adição das proteínas da carne, mas também à adição de ingredientes não cárneos, à energia de ligação e outras forças físicas.

4.5 Análise da cor objetiva

Não houve interação significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos (níveis de nitrito e mistura de óleos essenciais) e o tempo de armazenamento para a luminosidade (L*). Entretanto, foi verificado efeito significativo ($p < 0,05$) isolado para o tempo de armazenamento, havendo um pequeno aumento de L* depois de 30 dias armazenado (Tabela 9).

Tabela 9 Média (\pm desvio padrão) dos efeitos do tempo de armazenamento a 4 °C, no índice de luminosidade (L*) das mortadelas

Tempo (dias)	L*
0	65,33 \pm 3,73 ^a
30	68,03 \pm 1,29 ^b

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste F

Estes resultados estão de acordo com o observado por Oliveira et al. (2012), que reportaram um pequeno aumento, porém significativo, nos valores de L* depois de 20 dias de estocagem em mortadelas acrescidas com a concentração de 31,25 μ l de óleo essencial de *Satureja montana* e 200 ppm de nitrito. Dias (2011) também observou um aumento nos valores de L* de mortadelas adicionadas de 150 ppm de nitrito, após os 20 dias de estocagem refrigerada. Entretanto, este mesmo autor não observou mudança significativa nos valores de L* nas mortadelas durante o mesmo período de armazenamento, quando adicionadas com 75 ppm de nitrito apenas, 75 ppm nitrito de sódio + 3,1% óleo essencial de orégano e com 75 ppm nitrito de sódio + 2,5 % óleo essencial de orégano + 0,3% de óleo essencial de tomilho + 0,6% de óleo essencial de cravo.

Não houve interação significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos (níveis de nitrito e mistura de óleos essenciais) e o tempo de armazenamento para os índices de vermelho (a*) e de amarelo (b*). Entretanto, foi verificado efeito significativo ($p < 0,05$) isolado para os níveis de nitrito, sendo observado um aumento nos valores de a* e redução nos valores de b* com a adição do nitrito (Tabela 10).

Tabela 10 Média (\pm desvio padrão) do efeito dos níveis de nitrito nos índices de vermelho (a^*) e de amarelo (b^*) das mortadelas

Nitrito (ppm)	a^*	b^*
0	4,40 \pm 2,00a	11,98 \pm 1,80 ^a
150	10,14 \pm 2,72b	10,01 \pm 1,48b

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste F

Maiores valores no índice a^* com a adição de nitrito são esperados, uma vez que a sua adição em produtos cárneos fornece a cor característica do produto curado (RAMOS; GOMIDE, 2007). Oliveira et al. (2012) observaram que os valores de a^* foram superiores para mortadelas nas quais foi utilizado o nitrito na sua formulação, indicando tonalidade vermelha mais intensa. Os valores de a^* foram próximos para os tratamentos com 100 e 200 ppm, sendo superiores aos valores obtidos para amostras sem adição de nitrito, favorecendo a estabilidade da coloração no período de estocagem. Similarmente, Dutra (2011) avaliou a formação da cor em mortadelas elaboradas com diferentes níveis de nitrito (0, 75 e 150 ppm) e submetidas à irradiação, e observou menores valores de a^* nas amostras não adicionadas de nitrito.

A adição de nitrito reduziu ligeiramente os valores de b^* nas amostras, o que contrasta com os resultados de Oliveira et al. (2012), que não observaram alterações significativas ($p > 0,05$) para as mortadelas fabricadas com diferentes níveis de nitrito (0, 100 e 200 ppm). Dias (2011) também não observou alterações significativas nos valores para b^* em mortadelas com diferentes níveis de nitrito e combinações de óleos essenciais, exceto para a combinação dos óleos essenciais de tomilho, cravo-da-índia e capim-limão, na qual também foi verificado um aumento significativo nos valores de b^* .

De forma geral, a adição das misturas de óleo nas mortadelas não afetou a cor final do produto, sendo o efeito do nitrito significativo na mudança de cor (Figura 1).

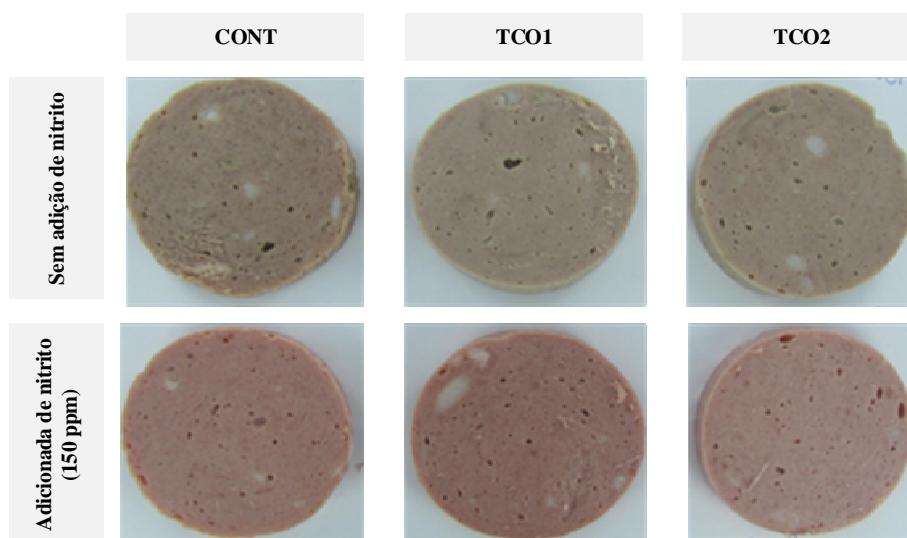


Figura 1 Fotografias das mortadelas após 24 horas de elaboração. CONT = controle sem adição de óleo; TCO1= tratamento com adição de óleo na combinação 1 e TCO2 = tratamento com adição de óleo na combinação 2

4.6 Índice de TBARS

Para o índice de TBARS houve efeito significativo ($p < 0,05$) apenas para a adição de nitrito, com maiores valores nas amostras em que este aditivo não foi adicionado (Tabela 11).

Tabela 11 Médias (\pm desvio padrão) do efeito dos níveis de nitrito nos índice de TBARS das mortadelas

Nitrito (ppm)	TBARS (mg MAD/kg)
0	0,51 \pm 0,23 ^a
150	0,36 \pm 0,07 ^b

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste F

Ao contrário do que é observado na literatura, que os óleos essenciais agem como antioxidantes (AL-SHUIBI; AL-ABDULLAH, 2002; YANISHLIEVA et al., 1999), essa característica não foi observada no presente estudo, mas somente o efeito do nitrito.

Em contrapartida aos resultados obtidos, estudos apontam os óleos essenciais de orégano e cravo como bons antioxidantes, (SCHERER et al., 2009; SOUZA; STAMFORD, 2005), uma vez que possuem como componentes majoritários o carvacrol e o eugenol, lembrando que o carvacrol também foi adicionado às misturas. No entanto, em outros estudos há afirmações de que óleos essenciais adicionados em grandes quantidades têm efeito pró-antioxidante em altas concentrações (MUNTEANU; ZINGG; AZZI, 2004; GUTIÉRREZ; LUNA; GARRIDO, 2006, MARTINS, 2013). Decker (1997) confirma que o eugenol em baixas concentrações tem propriedade antioxidante e, em altas concentrações, age como pró-oxidante. Entretanto, não é possível citar os fatores que determinam este processo.

O carvacrol, um composto majoritário que foi adicionado nas combinações e também presente no óleo essencial de orégano, juntamente com o eugenol presente no óleo essencial de cravo, é um composto fenólico. Fenóis interagem com o radical peroxil formando o radical fenoxil que, mesmo estável, pode causar alguma interferência ao reagir com um radical peroxil, e o composto formado pode sofrer ação da luz ultravioleta e de temperaturas elevadas,

originando novos radicais, que comprometem a eficiência do antioxidante, que é determinada pelos grupos funcionais presentes, pela posição que ocupam no anel aromático e pelo tamanho da cadeia desses grupos (ÂNGELO; JORGE, 2007).

Oliveira et al. (2012), em pesquisas com mortadelas adicionadas de diferentes combinações de óleo essencial de *S. montana* e com 100 e 200 ppm de nitrito, observaram que as mortadelas que apresentavam menores valores de oxidação foram aquelas adicionadas de 100 ppm de nitrito, mesmo sem adição das combinações de óleo, demonstrando, em conformidade com este experimento, a ação antioxidante do nitrito de sódio.

O nitrito não está associado com nenhuma componente responsável pelo sabor ou aroma, mas, por apresentar ação antioxidante (GRAY et al., 1981; VARNAN; SUTHERLAND, 1995; SHAHIDI; PEGG; SHAMSUZZAMAN, 1991), contribui, de forma indireta, com o sabor do produto, ao evitar ou retardar sua deterioração pela oxidação lipídica.

Al-Shuibi e Al-Abdullah (2002) afirmam que o nitrito tem efeito antioxidante em produtos cárneos curados, mas a concentração que deve ser adicionada ainda é alvo de discussões. Os mesmos autores analisaram mortadelas com adição de diferentes combinações entre nitrito de sódio (40, 80 e 120 ppm) e sorbato de sódio (0 e 2600 ppm), tendo os menores valores para oxidação lipídica obtidos sido em mortadelas que continham de 40 a 80 ppm de nitrito.

Andrade (2013) observou que menores valores de oxidação lipídica foram obtidos em mortadelas adicionadas de maiores quantidades de nitrito. Entretanto, entre 125 e 250 ppm de nitrito, os efeitos nos valores de oxidação foram pequenos, sendo que, acima de 250 ppm de adição, um pequeno efeito pró-oxidante foi observado.

4.7 Nitrito residual

Para o teor de nitrito residual houve efeito significativo ($p < 0,05$) da interação entre os níveis de adição de nitrito e o tempo de armazenamento. A decomposição dos tratamentos está representada na Tabela 12.

Tabela 12 Média (\pm desvio padrão) do efeito dos níveis de nitrito nos valores de nitrito residual das mortadelas de acordo com o tempo de armazenamento

Nitrito (ppm)	Tempo (dias)	
	0	30
0	4,53 \pm 1,71 ^A	3,35 \pm 1,49 ^A
150	32,51 \pm 6,45 ^{aB}	19,76 \pm 8,09 ^{bB}

Médias seguidas de letras minúsculas, na linha e maiúsculas, na coluna, diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste F

A existência de nitrito residual nas mortadelas que não foram adicionadas de nitrito pode ser explicada devido à adição de outras substâncias na mortadela que poderiam conter o nitrito, como o sal, os condimentos da mortadela e a água. O mesmo resultado também foi observado por Dutra (2011).

Nas mortadelas sem nitrito não houve diferença significativa do nitrito residual com o tempo, mas, naquelas adicionadas de nitrito, houve uma redução do nitrito residual durante os 30 dias de estocagem. De acordo com Cassens et al. (1997), a quantidade de nitrito residual em produtos cárneos é bem menor do que aquela adicionada, uma vez que ele é consumido ao longo do tempo de estocagem, pois tem a capacidade de reagir com vários compostos da mortadela, como a mioglobina.

Al-Shuibi e Al-Abdullah (2002) também observaram menores teores de nitrito residual em mortadelas armazenadas por 14 semanas, a 25 °C ou 4 °C. Nas amostras que foram adicionadas de 120 ppm, obteve-se um teor de nitrito residual de 32 ppm ao final da estocagem. Segundo estes autores, quanto mais nitrito for adicionado ao produto, mais ele estará envolvido nas reações com os componentes da carne utilizada na fabricação do produto, especialmente as proteínas. Dutra (2011) também observou menores níveis de nitrito em suas mortadelas, ao longo dos 69 dias de armazenamento.

4.8 pH

Foi verificado efeito significativo ($p < 0,05$) da interação tripla (níveis de adição de nitrito, adição das combinações de óleo essencial e tempo de armazenamento) para os valores de pH, sendo a decomposição dos tratamentos representada na Tabela 13.

Tabela 13 Média (\pm desvio padrão) do efeito do pH das mortadelas

NO ₂ (ppm)	Tempo (dias)	CONT	TCO1	TCO2
0	0	6,41 \pm 0,06 ^a	6,29 \pm 0,07 ^a	6,28 \pm 0,03 ^a
	30	6,61 \pm 0,07 ^b	6,44 \pm 0,05 ^b	6,73 \pm 0,05 ^b
150	0	6,36 \pm 0,046 ^a	6,33 \pm 0,02 ^a	6,42 \pm 0,06 ^a
	30	6,54 \pm 0,078 ^b	6,50 \pm 0,03 ^b	6,49 \pm 0,06 ^b

CONT= tratamento controle sem adição de óleo; TCO1= tratamento com adição de óleo na combinação 1; TCO2 = tratamento com adição de óleo na combinação 2. Médias seguidas de letras diferentes na coluna e dentro de cada nível de nitrito diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste F.

Para todos os tratamentos, houve um aumento nos valores de pH com os 30 dias de estocagem refrigerada. Não foram verificados, na literatura, dados que expliquem o aumento do pH de mortadelas com relação ao tempo de estocagem.

4.9 Análise de textura

Para os parâmetros de textura não foi verificada interação significativa entre os níveis de nitrito e a adição dos óleos essenciais. No entanto, houve efeito significativo ($p < 0,05$) isolado da adição de nitrito para todos os parâmetros de textura, tendo as amostras contendo nitrito apresentado maiores valores do que as amostras sem este aditivo (Tabela 14).

Tabela 14 Média (\pm desvio padrão) do efeito da adição de nitrito nos parâmetros de textura das mortadelas

NO ₂	DUR	COES	ADES	FLEX	MAST
0	18,68 \pm 1,68 ^a	0,74 \pm 0,01 ^a	8,64 \pm 2,54 ^a	4,75 \pm 0,16a	67,93 \pm 5,10 ^a
150	25,59 \pm 3,08b	0,76 \pm 0,01b	12,83 \pm 3,05b	5,51 \pm 0,11b	105,03 \pm 11,49b

DUR= dureza; COES= coesividade; ADES = adesividade; FLEX = flexibilidade; e MAST = mastigabilidade. Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey

Estes resultados contrastam com aqueles obtidos por Dutra (2009), que não observou efeito significativo nos parâmetros de textura nas mortadelas nos diferentes níveis de nitrito (0, 75 e 150 ppm) adicionados. Já Dong et al. (2007) compararam os efeitos de diferentes níveis de nitrito (0, 50, 100 e 150 ppm) nas mortadelas e observaram que houve um aumento nos parâmetros de dureza e adesividade, correspondente com o observado no presente trabalho, um

decréscimo na flexibilidade e coesividade, e um aumento seguido por um decréscimo na mastigabilidade.

Também foi verificado efeito significativo ($p < 0,05$) isolado da adição da mistura de óleos para os parâmetros flexibilidade e mastigabilidade, sendo a decomposição dos tratamentos representada na Tabela 15.

Tabela 15 Médias (\pm desvio padrão) do efeito das combinações de óleos essenciais nos parâmetros de textura das mortadelas

Tratamento	DUR (N)	COES	ADES (N.mm)	FLEX (mm)	MAST (N.mm)
CONT	20,66 \pm 2,05	0,74 \pm 0,005	9,22 \pm 1,78	4,78 \pm 0,08 ^a	75,90 \pm 8,01 ^a
TCO1	22,10 \pm 1,63	0,75 \pm 0,08	10,24 \pm 3,26	5,12 \pm 0,19 ^b	85,96 \pm 4,45 ^{ab}
TCO2	23,65 \pm 3,45	0,75 \pm 0,007	12,75 \pm 3,34	5,50 \pm 0,14 ^c	97,57 \pm 12,41 ^b

DUR= dureza; COES= coesividade; ADES= adesividade; FLEX= flexibilidade; MAST= mastigabilidade; CONT= tratamento controle sem adição de óleo; TCO1= tratamento com adição de óleo na combinação 1 e TCO2 = tratamento com adição de óleo na combinação 2. Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey

De forma geral, a adição das misturas de óleos implicou no aumento da flexibilidade e da mastigabilidade das mortadelas. Viuda-Martos et al. (2010), em um experimento com mortadela adicionada de fibra dietética de laranja e óleo essencial de alecrim, também não observou nenhum efeito significativo, $p > 0,05$, nos parâmetros de textura, quando óleo foi adicionado.

Martins (2013), avaliando combinações de óleos essenciais de canela, orégano e gengibre, nisina e nitrito e analisando a textura das mortadelas, não conseguiu ajustar os dados a nenhum modelo matemático, não sendo possível verificar a influência das variáveis sobre os parâmetros de textura. Mas, segundo a mesma autora, possivelmente, os tratamentos não diferiram muito entre si e os resultados não foram significativos.

5 CONCLUSÃO

A utilização de óleos essenciais como antimicrobiano é uma alternativa que pode ser utilizada pelas indústrias de alimentos, em especial pela indústria de produtos cárneos, uma vez que não alteram as características sensoriais do produto.

Com relação à população de *C. botulinum*, houve redução com a adição das combinações dos óleos e composto majoritário, tanto na presença quanto na ausência do nitrito. Já na ausência das combinações, o efeito antimicrobiano ficou a cargo do nitrito. Portanto, o objetivo quanto às análises microbiológicas foi alcançado. Quanto às análises físico-químicas, o nitrito ainda é o mais efetivo, sendo necessárias pesquisas futuras para se obterem alternativas para a redução deste em mortadelas.

REFERÊNCIAS

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

ALVES, M. C. S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.11, p.1083-1086, nov. 2004.

AMSTALDEN, V. C. J.; SERRANO, A. M.; MANHANI, M. R. Avaliação da toxigênese de *C. botulinum* em mortadela e presunto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 154-159, maio/ago. 1997.

ANDRADE, M. P. D. **Efeito da radiação gama e nitrito na inibição do *Clostridium botulinum* e na qualidade de mortadelas**. 2013. 155 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ANGELO, P. M.; JORGE N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 232-240, jan./abr. 2007.

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

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16th ed. Virginia: AOAC, 1998.

BARROS, J. C. et al. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 6, p. 1139-1143, July 2009.

BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis**. Iorque: Springer Nova, 2008.

BOWLES, B. L.; MILLER, A. J. Antibotulinal properties of selected aromatic and aliphatic aldehydes. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, n. 9, p. 788-794, 1993.

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. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 5 abr. 2000. Seção I, p. 6-10. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 16 mar. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1004. Aprova o Regulamento Técnico: “Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 – Carne e Produtos Cárneos”. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 mar. 1999.

CARLIN, F. et al. Prevalence of *Clostridium botulinum* in food raw materials used in REPFEDs manufactured in France. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 2, p. 141–145, Mar. 2004.

CASSENS, R. G. Composition and safety of cured meats in the USA. **Food Chemistry**, London, v. 59, n. 4, p. 561-566, Feb. 1997.

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

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

CERESER, N. D. et al. Botulismo de origem alimentar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 280-287, jan./fev. 2008.

CHAIBI, A. et al. Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62 A spores by essential oils. **Food Microbiology**, London, v.14, n. 2, p. 161-174, Apr. 1997.

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.

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 11, p. 396-407, Nov. 1997.

DEMEYER, D. I.; VANDEKERCKHOVE, P.; MOERMANS, R. Compounds determining pH in dry sausage. **Meat Science**, Brking, v. 3, n. 3, p. 161-167, July 1979.

DIAS, N. A. A. **Avaliações microbiológica e físico-química de mortadelas elaboradas com óleos essenciais e inoculadas com *Clostridium perfringens* tipo A**. 2011. 113 p. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, Berne, v. 69, n. 1, p. 25-28, July 1994.

DONG, Q.-L. et al. The effect of sodium nitrite on the textural properties of cooked sausage during cold storage. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 38, n. 5, p. 537-554, Oct. 2007.

DUTRA, M. P. et al. Gamma radiation and storage time on lipidic oxidation, color, heme pigments and residual nitrite of bologna-type sausages formulated with different nitrite additions. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 12, p. 2203-2209, 2011.

DUTRA, M. P. **Qualidade de mortadelas formuladas com diferentes níveis de nitrito e doses de radiação**. 2009. 156 p. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FU, Y. et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary Essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, London, v.21, n. 10, p. 989-994, Oct. 2007.

GANHÃO, F. M. C. **Evolução do teor de nitritos e de nitratos e da concentração de pigmentos no fiambre e na mortadela ao longo do seu processo produtivo e do seu prazo de vida útil**. 2010. 111 p. Tese (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) - Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GRAY, J. I. et al. Role of nitrite in cured meat flavor: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 44, n. 4, p. 302-312, Apr. 1981.

GUTIÉRREZ, R. O. S. A. P.; LUNA, H. H.; GARRIDO, S. H. Antioxidant activity of *Tagetes erecta* essential oil. **Journal of the Chilean Chemical Society**, Concepcion, v. 51, n. 2, p. 883-886, June 2006.

HART, P. H. et al. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Research**, Basel, v. 49, p.619-626, June 2000.

HOFFMANN, F. L. et al. Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 17, n. 1, jan./jul., p. 11-20, 1999.

HOSSEINI, H. et al. Survey of *Clostridium botulinum* toxins in iranian traditional food products. **Comparative Clinical Pathology**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 247-250, June 2010.

HUGHES, E.; COFRADES, S.; TROY, D. J. Effects of fat level, oat fibre and carrageenan on frankfurters formulated with 5, 12 and 30% Fat. **Meat Science**, Brking, v. 45, n. 3, p. 273-281, Mar. 1997.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JUNQUEIRA, V. C. A. **Avaliação da incidência de *Clostridium botulinum* e da produção de toxina em mortadela e presunto**. 1994. 100 p. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

KARAPINAR, M.; AKTUĞ, Ş. E. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 161-166, Mar. 1987.

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of orégano essential oil. **Food Chemistry**, London, v. 85, n. 4, p. 633–640, May 2004.

LAWRENCE, H. A.; PALOMBO, E. A. Activity of essential oils against *Bacillus subtilis* spores. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1590-1595, Dec. 2009.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 67, n. 3, p. 187-195, Aug. 2001.

MARTINS, A. P. **Atividade de antimicrobianos naturais sobre endósporos de *Clostridium perfringens* em mortadelas**. 2013. 123 p. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard**. 8. ed. Wayne: NCCLS, 2003. (NCCLS Document M2 – A8).

OLIVEIRA, J. M.; ARAÚJO, W. M. C.; BORGIO, L. A. Quantificação de nitrato e nitrito em lingüiças do tipo frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas v. 25, n. 4, p. 736-742, out./dez. 2005.

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

OLIVEIRA, T. L. C. et al. Antioxidant effects of *Satureja montana* L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **Food Science and Technology**, London, v. 45, n. 2, p. 204-212, Mar. 2012.

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.

PECK, M. W. S. et al. Development and application of a new method for specific and sensitive enumeration of spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F in foods and food materials. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 19, p. 6607-6614, Aug. 2010.

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, Lavras, maio/jun. 2008.

PIMENTEL, F. A. Influência da temperatura de secagem sobre o rendimento e a composição química do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & k. Shum. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 523-526, 2008.

PINTO, A. Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. **Millenium**, Viseu, v. 4, p. 91-100, 1996.

PRZYBYLSKA, A. Botulism in Poland in 2001. **Przegl Epidemiologiczny**, Warsaw, v. 56, n. 3, p. 305-310, 2002.

RAGAZANI, A. V. F. et al. Esporos de *Clostridium botulinum* em mel comercializado no estado de São Paulo e em outros estados brasileiros. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 396-399, mar./abr. 2008.

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.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Viçosa: Editora UFV, 2007.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M. Patógenos emergentes relacionados à contaminação de alimentos de origem animal. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 123-127, jul./dez. 2002.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. et al. Study of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brazil. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 379-382, July 1999.

SHAHIDI, F.; PEGG, R. B.; SHAMSUZZAMAN, K. Color and oxidative stability of nitrite-free cured meat after gamma irradiation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 5, p. 1450-1452, Sept. 1991.

SHARMA, S. K. et al. Detection of type A, B, E, and F *Clostridium botulinum* neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with digoxigenin-labeled antibodies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 2, p.1231-1238, Feb. 2006.

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

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, George-John E. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 35-45, 2002.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M. Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 132, p. 40-45, 2005.

TEISSEDRE, P. L.; WATERHOUSE, A. L. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 9, p. 3801-3805, Aug. 2000.

TERRA, N. N. et al. Emprego de soro de leite líquido na elaboração de mortadela. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 885-890, maio/jun. 2009.

TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 542-5, jul./set. 2009.

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.

VARNAN, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Bebidas: tecnologia, química y microbiología**. Zaragoza: Acribia, 1995.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Effect of orange dietary fibre, oregano essential oil and packaging conditions on shelf-life of bologna sausages. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 4, p. 436-443, Apr. 2010.

YANISHLIEVA, N. V. et al. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. **Food Chemistry**, London, v. 64, n. 1, p. 59-66, Jan. 1999.

YOUNES, J. F.F.; BORON, A. Mortadelas. In: OLIVRO, R. **O mundo do frango**. São Paulo: Varela, 2006. Cap. 33, p. 47-90.

YUNES, J. F. F. et al. Efeito da substituição da gordura suína por óleos vegetais nas características de qualidade, estabilidade oxidativa e microestrutura de mortadela. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1205-1216, 2013.