



NAYANE APARECIDA ARAUJO DIAS

**VIABILIDADE DE *Clostridium difficile* EM
MORTADELA ADICIONADA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS E TEOR REDUZIDO DE NITRITO
DE SÓDIO**

LAVRAS - MG

2015

NAYANE APARECIDA ARAUJO DIAS

**VIABILIDADE DE *Clostridium difficile* EM MORTADELA
ADICIONADA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E TEOR REDUZIDO DE
NITRITO DE SÓDIO**

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

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS - MG

2015

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

Dias, Nayane Aparecida Araujo.

Viabilidade de *Clostridium difficile* em mortadela adicionada
de óleos essenciais e teor reduzido de nitrito de sódio / Nayane
Aparecida Araujo Dias. – Lavras : UFLA, 2015.

123 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Anaeróbios. 2. Aditivo alimentar. 3. Óleos essenciais. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

NAYANE APARECIDA ARAUJO DIAS

**VIABILIDADE DE *Clostridium difficile* EM MORTADELA
ADICIONADA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E TEOR REDUZIDO DE
NITRITO DE SÓDIO**

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

APROVADA em 06 de março de 2015.

Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA
Dr. Eduardo Mendes Ramos	UFLA
Dr. Sandra Maria Oliveira Morais Veiga	UNIFAL
Dr. Victor Maximiliano Reis Tebaldi	UFLA

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS – MG
2015**

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre esteve a frente de tudo e sem ele nada seria possível.

À minha mãe, Sueli, e ao tio Luis que sempre me apoiaram e não mediram esforços para que este sonho se concretizasse e principalmente pelo amor incondicional.

Ao meu noivo, Eduardo, que sonhou junto comigo este sonho fazendo-o tornar realidade.

A toda minha família, tios e primos, pelo apoio e pelo carinho.

A Lindinha que foi a melhor companhia que eu poderia ter em Lavras.

À Prof^ª. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli pela orientação, amizade, carinho, confiança e por ter possibilitado e auxiliado na concretização deste sonho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Mendes Ramos, pela coorientação, amizade e disponibilidade em sempre contribuir para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias pela receptividade e disponibilidade.

Ao Prof. e colega Dr. Victor Maximiliano Reis Tebaldi pela amizade e auxílio.

A Prof^ª Dra. Sandra Maria Oliveira Moraes Veiga pela disponibilidade e contribuição com este trabalho.

A Prof^ª Dra. Carolina Valeriano, pela disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas, por me acolher quando eu ainda era sua orientada de lato-sensu, por ter me apoiado e incentivado a iniciar a vida acadêmica.

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

À Eliane, técnica do laboratório.

A todos os professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos que sempre me acolheram com tanto carinho.

À Pollyana e ao Silas, que mais que estagiários são grandes amigos, obrigada por tudo, sem vocês a caminhada seria mais difícil.

A todos do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência dos Alimentos que estiveram presentes durante essa caminhada, obrigada pelo carinho e auxílio. Principalmente a William, Rafael, Bruna e João Paulo.

Aos amigos de pós-graduação Tenille, Letícia e Aline pelo conhecimento compartilhado e pela amizade.

À Alline, Daniela, Heloísa Martins, Mariana pela amizade, carinho e ajuda nas análises.

À Luciana Rodrigues, minha afilhada, pela amizade, companheirismo e carinho.

Ao Jorge e à Tamara, pelo auxílio nas análises de microscopia.

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

Às amigas Abiah, Beatriz, Cristiane, Juliana, Monique pela amizade, cumplicidade e carinho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), a qual tenho muito orgulho de ter sido discente.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento do projeto. À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram e torceram pela realização desta etapa, meu muito obrigada por tudo!

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica
nossa ignorância”.*

John F. Kennedy

RESUMO

Clostridium difficile é uma bactéria mesófila, Gram-positiva, anaeróbia estrita, formadora de esporos, associada à diarreia por infecção nosocomial, entretanto está a cada dia mais relacionado à ingestão de alimentos contaminados. Devido ao crescimento do interesse dos consumidores por alimentos naturais, sem adição de conservantes químicos, os óleos essenciais surgem como alternativa, reduzindo o uso de aditivos artificiais como o nitrito. Objetivou-se neste estudo determinar a concentração mínima bactericida (CMB) de diferentes óleos essenciais e suas combinações sobre *C. difficile*; identificar e quantificar componentes químicos dos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e *Litsea cubeba*, e elaborar mortadelas com redução de nitrito de sódio e adição de óleos essenciais, analisando o crescimento e esporulação de *C. difficile*, avaliação por microscopia eletrônica de varredura aspectos morfológicos deste, assim como o efeito sobre a cor, oxidação lipídica, nitrito residual, textura e os efeitos sensoriais do produto. A CMB do OE de *O. basilicum* foi de 1,2%, enquanto o de *O. vulgare* e *T. vulgaris* apresentaram efeito bactericida a 0,3% e *L. cubeba* a 0,15%. Todas as combinações dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *T. vulgaris* e *L. cubeba* eficientes *in vitro*. Sendo selecionada para elaboração das mortadelas a combinação dos OE de *O. vulgare* (0,2%), *T. vulgaris* (0,05%) e *L. cubeba* (0,025%) para F1 e para F2 os OE de *O. vulgare* (0,1%), *T. vulgaris* (0,1%) e *L. cubeba* (0,05%). Não houve diferença significativa do crescimento de células viáveis entre os tratamentos contendo OE e controle, entretanto houve aumento de aproximadamente 2,5 log₁₀ de NMP/g de células viáveis após o quinto dia. Observou-se aumento da esporulação durante a estocagem, principalmente na F1 com 2,3 log₁₀ NMP/g de endósporos na mortadela ao final de sua estocagem, com redução do pH durante o armazenamento e maior quantidade de nitrito residual na F1 com 10,23 ppm e redução do nitrito residual durante o armazenamento, apresentando 18,75 ppm no primeiro dia de estocagem e 5,11 no último dia. Observou-se maior oxidação lipídica ($P < 0,05$) em mortadelas-controle, não sendo observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) de oxidação em mortadelas adicionadas de OE durante todo o armazenamento; A adição de OE não influenciou a cor ($P > 0,05$) das mortadelas, quanto à textura reduziram a dureza e mastigabilidade durante o tempo de armazenamento com aumento da adesividade ($P < 0,05$). Ao aplicar o teste de comparação múltipla, a cor não foi diferida da amostra-controle, e o atributo mais afetado pelos OE foi o sabor, que implicou em baixa aceitação do produto.

Palavras-chave: Anaeróbios. Aditivo alimentar. Óleos essenciais.

ABSTRACT

Clostridium difficile is a mesophilic bacteria, Gram-positive, anaerobic strict, spore former, associated with diarrhea for nosocomial infection, however is every day more related to the ingestion of contaminated food. Because of the growing consumer interest in natural foods with no added chemical preservatives, the essential oils are an alternative, reducing the use of artificial additives such as nitrite. In this study the objective was to determine the minimum bactericidal concentration of different essential oils and their combinations on *C. difficile*; identify and quantify chemical components of essential oils of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* and *Litsea cubeba*, and prepare bologna with reduction of sodium nitrite and adding essential oils, analyzing the growth and sporulation of *C. difficile*, evaluation by scanning electron microscopy morphological aspects, as well as the effect on color, lipid oxidation, residual nitrite, texture and sensory effects of the product. The Minimum Bactericidal Concentration of the essential oil (EO) *O. basilicum* was the 1.2%, while *O. vulgare* and *T. vulgaris* showed bactericidal effect to 0.3% and *L. cubeba* to 0.15 %. All essential oils combinations *O. vulgare*, *T. vulgaris* and *L. cubeba* efficient *in vitro*. Being selected for the bologna preparation, the combination of EO of *O. vulgare* (0.2%), *T. vulgaris* (0.05%) and *L. cubeba* (0.025%) for F1, and F2 for the EO of *O. vulgare* (0.1%), *T. vulgaris* (0.1%) and *L. cubeba* (0.05%). There was no significant difference in the viable cells growth among treatments containing EO and control, however there was an increase approximately 2,5 log₁₀ de NMP/g of viable cells after the fifth day. It was observed an increase of sporulation during storage, especially in F1 with 2.3 log₁₀ NMP/g of endospores in bologna at the end of its storage, reducing pH during storage and greater amount of residual nitrite in F1 with 10.23 ppm and reducing residual nitrite during storage, presenting 18.75 ppm in the first day of storage and 5.11 in the last day. It was observed a higher lipid oxidation (P<0.05) in bologna-control, not being observed significant differences (P>0.05) of oxidation in bologna added EO during all storage time. The EO did not influence the color (P>0.05) of bologna, as the texture reduced the hardness and chewiness during the storage time with increased adhesiveness (P< 0.05). By applying the multiple comparison test, the color was not deferred the control- sample, and the most affected attribute by EO was the flavor, which resulted in lower product acceptance.

Keywords: Anaerobic. Food additive. Essential oils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	26
Figura 2	Atividade antibacteriana de óleos essenciais.....	31
Figura 1	PCA da concentração mínima bactericida dos óleos essenciais de <i>O. basilicum</i> /basilicão (1), <i>P. nigrum</i> /pimenta (2), <i>P. anisum</i> /anis estrelado (3), <i>M. Fragans</i> /noz moscada (4), <i>T. vulgaris</i> /tomilho (5), <i>C. nobilis</i> /mandarina (6), <i>L. cubeba</i> /pimenta chinesa (7), <i>M. piperita</i> /menta (8), <i>C. limon</i> /limão (9), <i>O. vulgare</i> /orégano (10), <i>R. officinalis</i> /alecrim (11), <i>C. zeylanicum</i> /canela (12), <i>C. Camphora</i> /Ho Wood (13), <i>S. aromaticum</i> /cravo (14), <i>F. vulgare</i> /funcho (15) e controle (C) sobre <i>C. difficile</i>	75
Figura 2	Crescimento (A) e esporulação (B) de <i>C. difficile</i> (Log ₁₀ NMP/g) em mortadelas formuladas teor reduzido de nitrito de sódio e adição de óleos essenciais armazenadas a 25°C durante 15 dias.....	79
Figura 3	Micrografia eletrônica de varredura de mortadelas formuladas com redução de nitrito e óleos essenciais inoculadas com <i>C. difficile</i>	82
Figura 1	Índices de TBARs de mortadelas elaboradas com teor reduzido de nitrito adicionadas de óleos essenciais armazenadas a 25°C durante 15 dias.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Planejamento experimental para avaliação da combinação de três óleos essenciais, considerando a proporção referente à concentração mínima bactericida (CMB)* de cada óleo analisado.....	68
Tabela 2	Constituintes químicos dos óleos essenciais de orégano, tomilho e pimenta chinesa, identificados por cromatografia gasosa.....	77
Tabela 3	Nitrito residual em mortadelas elaboradas com redução de nitrito de sódio e diferentes combinações de óleos essenciais armazenadas a 25°C durante 15 dias.....	80
Tabela 4	Nitrito residual durante o armazenamento de mortadelas elaboradas com teor reduzido de nitrito de sódio e diferentes combinações de óleos essenciais.....	81
Tabela 1	Índice de luminosidade (L*), vermelho (a*), amarelo (b*), saturação (C*), ângulo de tonalidade (h*) e índice de descoloração em mortadelas elaboradas com teor reduzido de nitrito de sódio e óleos essenciais armazenadas a 25°C durante 15 dias.....	109
Tabela 2	Análise de textura de mortadelas elaboradas com teor reduzido de nitrito de sódio e adição de óleos essenciais armazenadas a 25°C durante 15 dias.....	110
Tabela 3	Teste de diferença* e aceitação** sensorial de mortadelas com teor reduzido de nitrito de sódio adicionadas de combinações de óleos essenciais.....	111

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	113
1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 Mortadelas.....	15
2.2 Nitrito de sódio	16
2.3 <i>Clostridium difficile</i>	20
2.4 Óleos essenciais.....	24
2.4.1 Mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais.....	29
2.4.2 Orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	33
2.4.3 Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>).....	34
2.4.4 Pimenta chinesa (<i>Litsea cubeba</i>).....	35
2.4.5 Efeito antimicrobiano <i>in vitro</i>	36
2.4.6 Óleos essenciais em alimentos	36
2.4.7 Atividade antioxidante de óleos essenciais em alimentos	40
CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS.....	45
Artigo 1.....	61
Viabilidade de <i>Clostridium difficile</i> em mortadela elaborada com adição de óleos essenciais e teor reduzido de nitrito de sódio.....	61
RESUMO	62
2 MATERIAIS E MÉTODOS	65
2.1 Obtenção do inóculo <i>Clostridium difficile</i>	65
2.2 Óleos essenciais.....	66
2.2.1 Concentração mínima bactericida	66
2.2.2 Combinação de óleos essenciais.....	67
2.2.3 Identificação e quantificação dos constituintes químicos	68
2.3 Elaboração das mortadelas	70
2.4 Análise das mortadelas.....	71
2.4.1 Contagem total de células e endósporos de <i>C. difficile</i>	71
2.4.2 Determinação do pH e Atividade de água.....	72
2.4.3 Nitrito residual	72
2.4.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	73
2.5 Análise estatística	74
3 RESULTADOS	74
3.1 Concentração mínima bactericida e seleção de OE.....	74
3.2 Caracterização química dos óleos essenciais	76
3.3 Efeito dos OE em <i>C. difficile</i> inoculados em mortadela.....	77
3.4 Análise ultraestrutural	81

4 DISCUSSÃO	82
REFERÊNCIAS	91
Artigo 2	99
Caracterização tecnológica e sensorial de mortadela adicionada de óleos essenciais	99
1 INTRODUÇÃO	100
2 MATERIAIS E MÉTODOS	103
2.1 Obtenção dos óleos essenciais	103
2.2 Elaboração da mortadela	103
2.3 Análises tecnológicas e sensoriais	104
2.3.1 Oxidação lipídica	104
2.3.2 Análise da cor objetiva	105
2.3.3 Análise perfil de textura	105
2.3.4 Avaliação sensorial	106
2.4 Análise estatística	107
3 RESULTADOS	107
3.2 Efeitos dos tratamentos sobre as mortadelas	107
3.2 Análise sensorial de mortadelas	110
4 DISCUSSÃO	111
CONCLUSÃO	116
REFERÊNCIAS	117

PRIMEIRA PARTE

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Entre os produtos emulsionados mais consumidos no Brasil está a mortadela, sendo apreciada por todas as classes sociais. Possuem como ingredientes principais a carne bovina, suína, toucinho e aditivos como nitrito de sódio, ascorbatos e polifosfatos.

O nitrito de sódio tem como funções contribuir para o desenvolvimento de cor e sabor característicos da mortadela, inibir o desenvolvimento de microrganismos e atuar como antioxidante. Entretanto, o ácido nitroso oriundo do nitrito de sódio, pode reagir com aminas em produtos cárneos curados para formação de compostos N-nitrosos, em especial as nitrosaminas, que possuem efeito tóxico, mutagênico, neuro, nefrotóxico e carcinogênicos.

A principal justificativa para o emprego do nitrito na elaboração de produtos cárneos é prevenir o crescimento de formas vegetativas e impedir a germinação dos endósporos de *Clostridium* sp., sendo que a toxinfecção alimentar causada por *Clostridium difficile* está cada vez mais difundida na área alimentícia.

Portanto, os óleos essenciais são aditivos que podem ser utilizados em alimentos, como a mortadela, substituindo e/ou complementando os aditivos alimentares artificiais na indústria de alimentos. Além de sua atividade antimicrobiana e antioxidante podem ser usados como flavorizantes, aromáticos, antissépticos, carminativos, antiespasmódicos e expectorantes.

Logo, neste trabalho objetivou-se elaborar mortadelas com redução do teor de nitrito de sódio, adicionadas de misturas de óleos essenciais contra *C. difficile* e avaliar os efeitos antimicrobianos, tecnológicas e sensoriais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mortadelas

Dentre os produtos cárneos embutidos, destacam-se os emulsionados, e um dos principais representantes é a mortadela.

A mortadela, segundo a legislação brasileira, é um produto cárneo industrializado, obtido através da 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 (HEDRICK, 1994).

A tecnologia aliou a funcionalidade da proteína cárnea a propriedades sensoriais que fizeram da mortadela um dos produtos cárneos processados de maior aceitação mundialmente, consumido por todas as classes sociais (YOUNES; BORON, 2006). O produto está presente no topo das listas de alimentos preconizados pela Associação das Indústrias Brasileiras de Alimentos (ABIA) pela redução de cloreto de sódio em sua formulação (ASSOCIAÇÃO DAS INDÚSTRIAS BRASILEIRAS DE ALIMENTOS - ABIA, 2010).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001b) estabelece limites microbiológicos em mortadelas para os seguintes microrganismos: *Salmonella* (ausência em 25 g), Clostrídios sulfitorreduzidores (máx. de 5×10^2 UFC.g⁻¹), Estafilococos coagulase positiva (máx. de 3×10^3 UFC.g⁻¹) e coliformes termotolerantes (máx. de 3×10^3 UFC.g⁻¹), sendo as bactérias, 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).

2.2 Nitrito de sódio

Dentre um dos principais ingredientes da mortadela está a adição de nitrito, de sódio ou de potássio, que apresentam como finalidades básicas conferir a cor rósea e o sabor característicos de produtos curados, além de prevenir alterações desagradáveis oriundas da rancidez oxidativa dos lipídios e atuar como conservante, principalmente contra o crescimento e a produção de toxina do *Clostridium botulinum* (CASSENS, 1997; FEINER, 2006; TOLDRÁ, 2010).

Constituem um sal de um ácido relativamente fraco e de uma base forte, formando uma substância cristalina, muito solúvel em água (ROÇA, 2005). A química do nitrito em produtos curados corresponde a uma mistura complexa de reações químicas envolvendo diferentes reagentes, esse é um composto altamente reativo e pode atuar como oxidante, reduzindo as nitrosaminas, além de ser convertido em uma variedade de compostos, incluído ácido nitroso, nítrico e óxido de nitrato (SEBRANEK; BACUS, 2007).

A maior perda do nitrito é observada durante a fabricação até o final do processo de aquecimento, a perda ocorre em cerca de 65%, e após 20 dias de estocagem a uma redução de um terço da concentração após o aquecimento (HONIKEL, 2008). Segundo Cassens (1997), após adicionar nitrito ao sistema cárneo, aproximadamente 1% a 10% são oxidados a nitrato, de 5% a 10% reagem 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 detectados após o processamento de produtos curados e este nível reduz gradualmente com o armazenamento.

O nitrito adicionado ao produto reage com a mioglobina e outros compostos presentes na carne e, portanto, uma parcela do nitrito é consumida por essas 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 esse nível residual e, portanto, não previnem o desenvolvimento desse microrganismo (CASSENS, 1997). Em trabalho realizado por Dias (2011) foi observado que mortadelas contendo óleos essenciais tiveram maior concentração de nitrito residual que as demais e conseqüentemente melhora do efeito antibacteriano durante 20 dias de armazenamento.

A ação inibitória do nitrito sobre microrganismos está relacionada com a forma não associada do ácido nitroso (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, H_2 e CO_2) (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Cammack et al. (1999) demonstraram que há efeito do nitrito sobre o DNA e expressão genética, além de danos a membranas e à parede celular das bactérias, este reage nas ligações ferro-enxofre de algumas proteínas, como, a ferredoxina, para formar complexos ferro-óxido nitrosos, inibindo o sistema fosforoclástico, o qual envolve a conversão do piruvato a acetil-fosfato, transferência de elétrons e síntese de ATP.

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

(rosa avermelhada), intensa e estável de produtos curados, são necessários de 30 a 50 ppm de nitrito por produto (FEINER, 2006).

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 Fe^{3+} para Fe^{2+} que reduz o número de íons ferro livre 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 (NO_2), tanto de potássio quanto de sódio, é o agente ativo de cura; em contraste, o nitrato (NO_3) não é um agente ativo, sendo reduzido a nitrito pela ação de bactérias nitrato redutoras, naturalmente presentes na carne (ZANARDI, 2002). O nitrito é convertido a ácido nitroso (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 ($\text{MbFe}^{+2}\text{NO}$) (MØLLER; SKIBSTED, 2002). Em ausência de oxigênio, o pigmento de nitrosomioglobina é estável, mas 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 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. Além disso, outros oxidantes reagem com o NO, convertendo-o novamente a nitrato (NO_3), que deverá ser convertido a nitrito (NO_2) e deste novamente a NO, para então reagir com a mioglobina, ilustrando a natureza cíclica de oxirredução das reações de cura (HONIKEL, 2008). 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, 2009).

O ácido nitroso, 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 (FRANCIS, 2000; RYWOTYCKI, 2002). Os microrganismos também podem participar da formação de nitrosaminas reduzindo o nitrato a nitrito e degradando proteínas em aminas e aminoácidos (TRICKER; PREUSSMANN, 1991), conseqüentemente, 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).

A formação de nitrosaminas está presente em todos os níveis de concentrações residuais de nitrito de sódio, representando risco para a saúde humana (CASSENS, 1997), em adultos sadios, os nitratos e os nitritos são absorvidos pelo trato gastrintestinal, 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 (HbFe^{+3}) é incapaz de transportar oxigênio (CORTAS; WAKID, 1991). Níveis de 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).

No Brasil, os sais de cura comerciais são constituídos de mistura de cloreto de sódio (sal carreador) com nitrito de sódio ou potássio, ou apenas um destes. Qualquer que seja o sal utilizado, a quantidade de nitrito residual e nitrato residual do produto não pode ultrapassar 150 ppm e 300 ppm,

respectivamente. 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, 2009). Vários países possuem leis semelhantes, como *Code of Federal Regulations* (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA - EUA, 2005; HONIKEL, 2008).

Diante disso, a conservação de alimentos tornou-se um desafio para a indústria de alimentos, necessitando cada vez mais de conservantes eficazes, mas que não trazem riscos à saúde do consumidor. Vários trabalhos têm demonstrado a preferência dos consumidores por alimentos “naturais”, ou seja, com redução de aditivos químicos, com isso diversos autores têm trabalhado a fim de obter a substituição total ou parcial de nitrito (ALEIXO, 2013; DIAS, 2011; DUTRA et al., 2011; MARTINS, 2013, 2014; OLIVEIRA et al., 2011, 2012; RODRIGUES, 2014).

2.3 *Clostridium difficile*

Clostridium difficile é uma bactéria mesófila, Gram-positiva, anaeróbia estrita, formadora de esporos, sendo um importante agente patogênico humano (HOOVER; RODRIGUEZ-PALACIOS, 2013; WEESE, 2010). Foi descoberta pela primeira vez em 1935, mas só a partir de 1978 é que foi associada em humanos ao diagnóstico de colite pseudomembranosa, maior causa de diarreia associada a antibióticos (BARTLETT, 2006; FREEMAN et al., 2010; LOO et al., 2005; RODRÍGUEZ-PARDO; MIRELIS; NAVARRO, 2013; VIANA, 2013).

O principal reservatório de *C. difficile* é o trato gastrointestinal de seres humanos e animais de sangue quente, coloniza o cólon em cerca de 3% dos adultos saudáveis e em 10-30% dos doentes hospitalizados. Em condições normais, a microbiota intestinal inibe o crescimento de *C. difficile*, no entanto,

quando o equilíbrio é alterado por intermédio de antibióticos, idade avançada, hospitalização, pacientes que apresentam comorbidades, imunodepressivas, câncer e outros fatores de risco, este encontra condições propícias à sua germinação, colonização e segregação de toxinas (BARTLETT, 2006; HERNÁNDEZ-ROCHA et al., 2012; LOO et al., 2005; RODRÍGUEZ-PARDO; MIRELIS; NAVARRO, 2013; VIANA, 2013).

A infecção por *C. difficile* ocorre em consequência da ingestão de células vegetativas ou endósporos que resistem à ação do ácido gástrico, germinam no intestino delgado e colonizam o cólon, produzindo toxina que iniciam uma série de fenômenos (RODRÍGUEZ-PARDO; MIRELIS; NAVARRO, 2013; SUNENSHINE; MCDONALD, 2006). Apresentam crescimento relativamente lento no intestino em comparação com as outras bactérias entéricas, esta se assemelha fenotipicamente com *Clostridium sporogenes*, no entanto, ao contrário desta, *C. difficile* não digere proteínas, e não produz lípases (CATO; GEORGE; FINEGOLD, 1986; HOOVER; RODRIGUEZ-PALACIOS, 2013). Durante a progressão da infecção associada a *C. difficile* começa um ciclo de formação de esporos por esta bactéria, que são libertados no lúmen cólico e que posteriormente são lançados no meio ambiente (HERNÁNDEZ-ROCHA et al., 2012; PAREDES-SABJA; SARKER, 2011).

Duas grandes toxinas são produzidas durante o crescimento vegetativo de *C. difficile*, sendo os principais fatores de virulência, a toxina A e toxina B, que se destacam entre as maiores toxinas polipeptídicas conhecidas (400-600 kDa), entretanto nem todas as cepas são capazes de produzi-las. A toxina A é uma enterotoxina potente com ligeira atividade citotóxica, enquanto a toxina B é uma citotoxina extremamente potente (HOOVER; RODRIGUEZ-PALACIOS, 2013).

As toxinas A e B, após unir-se aos seus receptores, entram na célula por endocitose, apresentam atividade glicosiltransferase, causando interrupção

das fibras de actina do citoesqueleto que resulta em diminuição da resistência transepitelial, aumento da permeabilidade vascular, com acumulação de líquidos devido à destruição das ligações intercelulares e destruição do epitélio intestinal. Além disso, as toxinas A e B induzem a produção do fator de necrose tumoral e de interleucinas pró-inflamatórias associadas à formação de pseudomembranas.

A maioria das estirpes pode produzir ambas as toxinas A e B; no entanto, cepas capazes de produzir apenas a toxina B podem ser igualmente prejudiciais em contextos clínicos, aparentando ser fundamental para a doença manifestar, enquanto cepas produtoras somente de toxina A não parecem ser comuns na natureza. Alguns *C. difficile* também podem produzir uma terceira toxina, chamada binário ou *C difficile* transferase (CDT), que pode inibir a polimerização da actina, podendo facilitar a colonização e formação de formação nas células, entretanto sua contribuição para a doença em seres humanos não é bem compreendida (HOOVER; RODRIGUEZ-PALACIOS, 2013; KUEHNE et al., 2010; WEESE, 2010).

C. difficile pode causar sintomatologia, que varia desde uma diarreia aquosa até casos mais graves de colite pseudomembranosa, megacólon tóxico ou perfuração cólica, que culminam com a perda da função da barreira das células intestinais, aparecimento de diarreia e formação de pseudomembranas, que se manifestam como placas amarela-esbranquiçadas de 1-2 mm de diâmetro que com o evoluir da doença manifestam por toda parede do cólon. Em estudo microscópico foi observado que as pseudomembranas contêm leucócitos, fibrina, muco e restos celulares, com a mucosa subjacente infiltrada por neutrófilos (RODRÍGUEZ-PARDO; MIRELIS; NAVARRO, 2013; SUNENSHINE; MCDONALD, 2006). Febre, calafrios, dor abdominal localizada, sobretudo no hipogastro, hipoalbuminemia, aumento de creatinina e leucocitos são frequentes, mas apenas relatados em menos de 50% dos doentes. Quando surge aumento do lactato sérico, falência renal, hipertensão arterial, íleo

paralítico ou choque, o quadro clínico torna-se mais grave (APAC; CUBAS, 2008; BARTLETT, 2006; HERNÁNDEZ-ROCHA et al., 2012; RODRÍGUEZ-PARDO; MIRELIS; NAVARRO, 2013; VIANA, 2013).

O exato período de incubação não é estabelecido. Mcfree e Abdelsayed (2009) verificaram que o tempo médio para início da infecção *C. difficile* após a alta é de 20 dias.

Houve algumas mudanças no perfil epidemiológico do *C. difficile* ao longo dos últimos 10 anos, com aumento na incidência e gravidade associada à infecção hospitalar, com grandes surtos, altas taxas de mortalidade, e pior resposta ao tratamento, relatado internacionalmente, deixando o *C. difficile* como líder em diarreia causada por infecção nosocomial, apresentando quadros de reinfecção ou recaída dentro dos 2 primeiros meses de tratamento (20%), sendo considerado o fator de risco mais importante a utilização de antibióticos (HERNÁNDEZ-ROCHA et al., 2012; LOO et al., 2005; SUNENSHINE; MCDONALD, 2006; WEESE, 2010).

Em 2002, os hospitais em Quebec, Canadá, relataram elevado número de casos graves de doenças associadas ao *C. difficile* com alta taxa de mortalidade. A partir de 2003 a 2005, os surtos espalharam para vários hospitais, aumentando mais de 5 vezes o índice de mortalidade. Estima-se que 14.000 casos, incluindo 2.000 mortes (taxa de mortalidade de 28%), foram relatados em Quebec durante esse período do surto (BARTLETT, 2006; MCFARLAND et al., 2007), sendo considerada a causa microbiana mais comumente diagnosticada associada à diarreia hospitalar, e de colite pseudomembranosa (WEESE, 2010).

Nos últimos anos tem sido relatado grande aumento do número de casos de *C. difficile* relacionado à ingestão de alimentos contaminados (DENG et al., 2015; HOOVER; RODRIGUEZ-PALACIOS, 2013; LOO et al., 2005; PAREDES-SABJA; SARKER, 2011; RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2007; RODRÍGUEZ-PARDO; MIRELIS; NAVARRO, 2013; WEESE, 2010).

Em estudo de amostragem em lojas de varejo, 6% dos estabelecimentos em três províncias do Canadá tiveram pelo menos um produto positivo para *C. difficile* (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2009), podendo ser relacionado aos endósporos de *C. difficile* que são tolerantes a condições ambientais adversas, incluindo calor, permanecendo viáveis mesmo após 120 minutos a 71°C, temperatura recomendada para a carne moída cozinhar internamente (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2007). São necessárias temperaturas capazes de assegurar a eliminação de endósporos, temperatura subletal promove sua germinação de modo que haja crescimento em condições anaeróbicas (RODRIGUEZ-PALACIOS; LEJEUNE, 2011).

Os endósporos dormentes de *C. difficile* germinam para regressar ao crescimento, produzindo toxinas que causam doença. Esses endósporos germinam *in vitro* quando estão na presença de nutrientes, denominado 'germinantes', principalmente na presença dos sais biliares e glicina, enquanto *in vivo* a germinação de esporos de *Clostridium* é menos clara, embora, há evidências de que fatores do hospedeiro, como os sais biliares sirvam de gatilho na germinação, além disso, fatores do próprio hospedeiro derivado de células epiteliais também podem provocar a germinação de endósporos de bactérias (PAREDES-SABJA; SARKER, 2011).

Aditivos alimentares como os óleos essenciais poderiam ser uma alternativa para o controle desse microrganismo em alimentos.

2.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais segundo a Resolução – RDC n° 2, de 15 de janeiro de 2007, são produtos voláteis de origem vegetal, obtidos por processo físico como destilação por arraste com vapor de água, destilação à pressão reduzida ou

outro método adequado (BRASIL, 2007). Essas substâncias são conhecidas como: essência, óleo essencial ou óleo etéreo, sua principal característica é a volatilidade, apresenta aroma agradável e intenso, são solúveis em solventes orgânicos apolares, geralmente são incolores ou ligeiramente amarelados e instáveis, principalmente em presença de ar, luz, calor, umidade e metais (SIMÕES, 2007).

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

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 esquisolisígenas (Pinaceae, Rutaceae) e estar estocados em 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 origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (Figura 1) (SIMÕES, 2007).

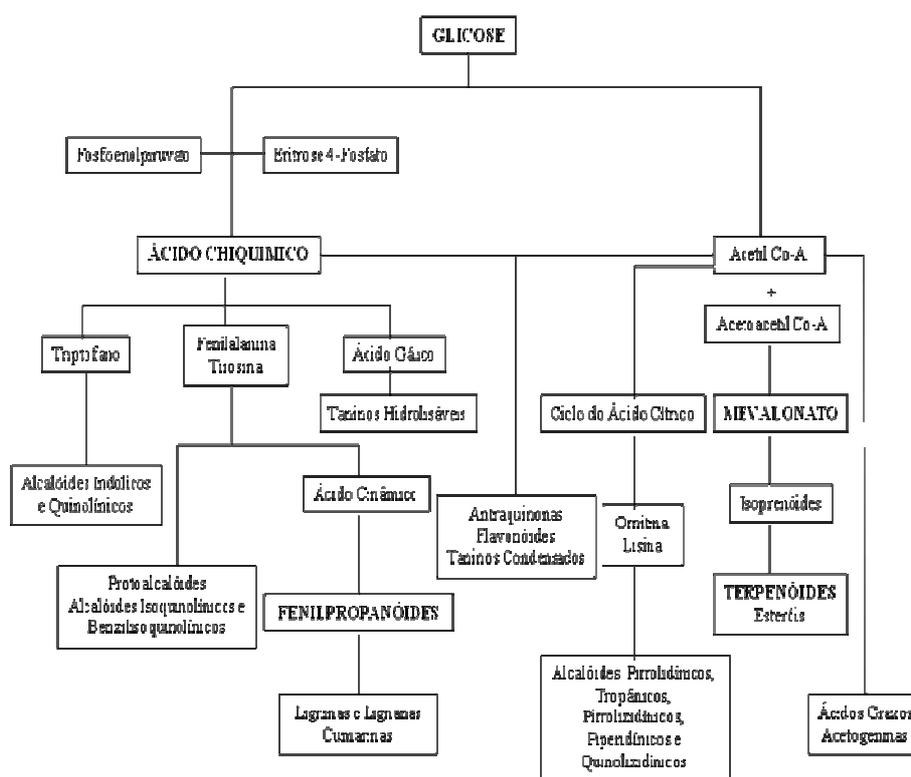


Figura 1 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários
Fonte: Simões et al. (2007)

Os constituintes químicos dos óleos essenciais estão distribuídos em duas classes químicas distintas: terpenoides e fenilpropanoides, sendo os terpenoides produzidos com maior abundância e mais frequentemente, enquanto que os fenilpropanoides 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, 2007).

Estima-se que aproximadamente 3.000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importantes, especialmente para a indústria de alimentos, farmacêutica, cosméticos e agricultura (NEDOROSTOVA et al., 2009). Estes têm atraído atenção de vários pesquisadores, devido ao potencial antioxidante, antimicrobiano, flavorizante, aromático, antisséptico, carminativo, antiespasmódico e expectorante (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004; OLIVEIRA et al., 2012; OUSSALAH et al., 2007; PEREIRA et al., 2014; SANGWAN et al., 2001; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

A grande demanda dos consumidores por alimentos seguros e de alta qualidade pode ser atribuída, em parte, à disponibilidade e acessibilidade a informações, gerando preocupações sobre a segurança dos alimentos devido ao aumento de toxinfecções alimentares, proporcionando grandes desafios, sobretudo porque há cada vez mais recusa em relação ao uso de conservantes químicos e antimicrobianos artificiais para inibir o crescimento de microrganismos patogênicos (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Alguns componentes dos óleos essenciais têm sido registrados pela Comissão Europeia para utilização como aromatizante em gêneros alimentícios, esses são caracterizados por não apresentarem risco à saúde do consumidor, os compostos incluem o carvacrol, carvona, cinamaldeído, citrato, *p*-cimeno, eugenol, mentol e timol (COMMISSION DECISION OF 23 JANUARY, 2009). Entretanto, a ingestão oral de doses elevadas de alguns compostos naturais podem promover graves problemas de toxicidade, sendo necessário encontrar um equilíbrio entre a dose efetiva e a que pode causar toxicidade (DUSAN et al., 2006).

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

A crescente industrialização e comercialização de óleos essenciais ocorrem em países como o Brasil (29%), a Índia (26%), os Estados Unidos (17%) e a China (9%) e entre os principais mercados estão os Estados Unidos, Alemanha, Reino Unido, Japão e a França. A posição do Brasil deve-se aos OE de cítricos, que são subprodutos da indústria de sucos. No passado, o país teve destaque como exportador de OE de pau-rosa, sassafrás e menta. Nos dois últimos casos, passou à condição de importador (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

De acordo com a base de dados americana COMTRADE (United Nations Commodity Trade Statistics Database), os maiores consumidores de OE no mundo são os EUA (40%), a União Europeia (30%), sendo a França o país líder em importações e o Japão (7%), ao lado do Reino Unido, Alemanha, Suíça, Irlanda, China, Cingapura e Espanha (UNITED NATIONS COMMODITY TRADE STATISTICS DATABASE - COMTRADE, 2005).

Com o incremento do volume de trocas comerciais nos mercados de óleos essenciais, as normas de controle de qualidade têm tido crescente importância, em especial na identificação e na padronização dos níveis de qualidade dos óleos essenciais mais utilizados, sendo dada grande atenção aos óleos utilizados para o consumo humano (BOVILL, 2010).

A importância da normatização no setor dos óleos essenciais pode ser abordada do ponto de vista técnico ou comercial, as especificações de qualidade, baseadas no estabelecimento das características físicas, químicas e sensoriais, assim como no perfil cromatográfico dos óleos essenciais, permite prevenir e detectar adulterações e determinação dos componentes limitados pela legislação na área da saúde, devido à sua toxicidade, além de serem utilizadas como fonte de informação para a indústria, com especificações que contribuem para a estabilidade da qualidade e genuinidade oferecidas (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO, 2004).

2.4.1 Mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais

O potencial antibacteriano dos óleos essenciais está diretamente relacionado com a composição química dos óleos, método de extração, volume do inóculo, fase de crescimento, meio utilizado, propriedades intrínsecas e extrínsecas do alimento, tais como pH, gordura, proteína, teor de água, antioxidantes, conservantes, temperatura, procedimento de embalagem, e estrutura física (BRANDI et al., 2006; BURT, 2004; LOPEZ-MALO; PALOU; ALZAMORA, 2005; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Vários estudos demonstram a eficácia dos óleos essenciais na inibição do crescimento microbiano (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004; OLIVEIRA et al., 2012; OUSSALAH et al., 2007; PEREIRA et al., 2014; ROTA et al., 2008; SANGWAN et al., 2001; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

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 diferentes alvos na célula microbiana (CARSON; MEE; RILEY, 2002). Vários compostos possuem atividade antibacteriana, interferindo na permeabilidade da membrana citoplasmática, atuando principalmente nas proteínas de membrana, causando

perdas de constituintes celulares, prejudicando sistemas enzimáticos, inativando ou destruindo o material genético de bactérias, afetando diretamente a força próton motiva (BURT, 2004; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010; ULTEE; KETS; SMID, 1999; ULTEE; SMID, 2001) e causando lise da parede celular (OLIVEIRA et al., 2011), portanto, os óleos essenciais agem causando danos estruturais e funcionais na membrana celular bacteriana (GOÑI et al., 2009), 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, interferindo 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. Assim como os compostos fenólicos, o local de ação dos terpenos, outro componente dos óleos essenciais, é a membrana celular. Eles permeiam através da membrana fazendo com que ela inche, assim inibindo enzimas respiratórias e causando a dissipação parcial do gradiente de pH e de potencial elétrico (CEYLAN; FUNG, 2004).

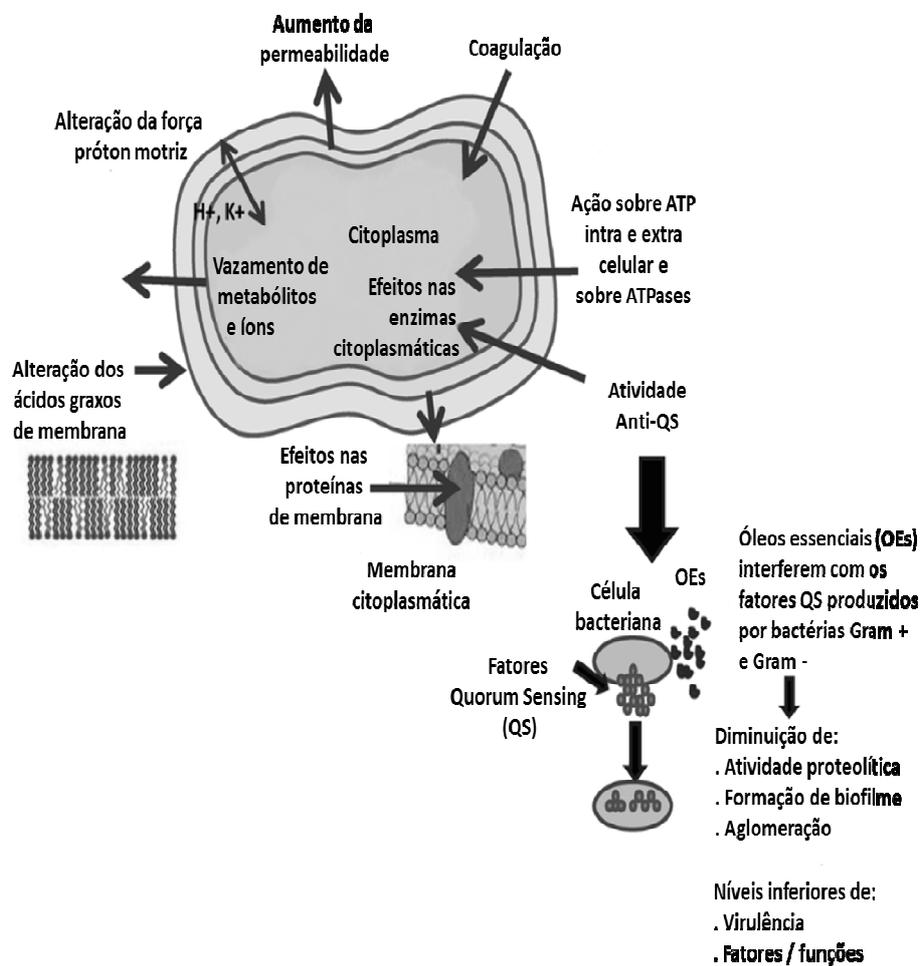


Figura 2 Atividade antibacteriana de óleos essenciais
 Fonte: Nazarro et al. (2013)

Os compostos lipofílicos encontrados nos óleos essenciais são mais ativos em bactérias gram-positivas, e geralmente, as bactérias Gram-negativas são menos sensíveis aos agentes antimicrobianos devido à membrana externa de lipopolissacarídeo, que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos. No entanto, isso não significa que as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis

sempre, como observado em alguns estudos em que as bactérias Gram-positivas têm sido menos ou igualmente sensíveis que bactérias Gram-negativas a óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004; OUSSALAH et al., 2007; PEREIRA et al., 2014).

Nevas et al. (2004) observaram em seu trabalho que dos 13 óleos essenciais testados contra 12 espécies de bactérias patogênicas e/ou deterioradoras, as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis aos óleos, sendo os mais sensíveis *C. butulinum* tipos B, E e *C. perfringens*. Entretanto, no estudo realizado por Sharififar et al. (2007) 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, Alakomi e Mattila-Sandholm (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.

Na literatura, sugere-se que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está relacionada principalmente ao seu composto majoritário, embora alguns autores mencionem a sinergia com os compostos minoritários (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Quando o efeito combinado das substâncias é maior do que a soma dos efeitos individuais, isso é sinergia; antagonismo acontece quando uma combinação mostra efeito menor em comparação com as aplicações individuais (BURT, 2004). Os efeitos sinérgicos de alguns compostos e óleos essenciais foram representados em alguns estudos (ABDALLA et al., 2007; ALEIXO, 2013; DIAS, 2011; MARTINS, 2013, 2014; RODRIGUES, 2014; ROTA et al., 2008). Os principais componentes dos óleos essenciais podem constituir até

85%, e outros componentes são geralmente em níveis residuais (GROSSO et al., 2008).

A elevada atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre patógenos de origem alimentar provavelmente se dá devido às altas porcentagens de compostos fenólicos como carvacrol, eugenol e timol (LAMBERT et al., 2001). Dentre diversos óleos essenciais que se destacam temos o orégano, tomilho e a pimenta chinesa.

2.4.2 Orégano (*Origanum vulgare*)

A espécie *O. vulgare* é uma planta perene, aromática e condimentar conhecida como orégano, orégão, manjerona-silvestre ou manjerona-rasteira. Devido à variabilidade de características químicas e aromas, plantas de *Origanum*, pertencentes a diferentes espécies são amplamente utilizadas na agricultura, indústria farmacêutica e cosmética, como erva culinária, aromatizando produtos alimentícios, bebidas alcoólicas e perfumaria devido à fragrância picante. Também tem sido usada como um remédio tradicional para tratar distúrbios convulsivos, digestivos e problemas menstruais (CASTRO, 2004).

Figueredo et al. (2006) têm apontado que existem diferenças significativas na produção e composição de óleos essenciais a partir de populações de *O. vulgare* decorrentes de fatores ambientais, sendo representado principalmente pela altitude, relacionando isso à falta de água e períodos de crescimento curto.

A atividade antimicrobiana do orégano é atribuída aos seus óleos essenciais que contêm terpenos como carvacrol e timol, o γ -terpineno 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).

O timol é estruturalmente muito similar ao carvacrol, havendo apenas o grupo hidroxila em localização diferente do anel fenólico (LAMBERT et al., 2001).

Stefanakis et al. (2013) avaliaram sete amostras de *O. vulgare* e observaram que a atividade antibacteriana depende do tipo de erva, bem como sua composição, no entanto, o teor de componentes fenólicos dos óleos não são os únicos fatores que contribuem para sua atividade.

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).

2.4.3 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, com bordos enrolados para baixo. As flores são pequenas de coloração rosada, branca, 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, enquanto a planta, sem a raiz, é utilizada para a extração do óleo essencial, que corresponde a um líquido amarelado, com aromas doces, quentes e pungentes (ESSAWI; SROUR, 2000).

O óleo essencial de tomilho apresenta elevada atividade antimicrobiana, sendo essa atribuída principalmente aos seus compostos fenólicos, timol e carvacrol, considerados ingredientes importantes para a indústria de alimentos,

visto que todos proporcionaram inibição de várias espécies de bactérias (ROTA et al., 2008).

2.4.4 Pimenta chinesa (*Litsea cubeba*)

Litsea cubeba é conhecida também por *may-chang* ou pimenta-chinesa, é uma planta aromática, pertencente a arbustos e folhas de Neolitsea ou pequenas árvores Lauraceae, contém cerca de 200 variedades de plantas de Neolitsea no mundo que estão localizadas, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, especificamente na China (GUANGDONG FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2004).

Todas as flores, folhas e cascas de *L. cubeba* contêm óleo essencial, podendo ser muito utilizado em cosméticos, sabonetes, produtos químicos e na produção de alimentos, demonstrando grande aplicação e perspectivas no valor de mercado, servindo de fontes antioxidantes de fácil acesso (JIM; SHA, 2004).

Yang et al. (2014) identificaram 33 componentes no óleo essencial de *L. cubeba*, como o E-citral (geranial) (27,49%), Z-citral (neral) (23,57%) e D-limoneno (18,82%), seguido por β -thujeno (3,34%), β -pineno (2,85%), α -pineno (2,57%), 6-methyl-5-hepten-2-ona (2,40%) e linalol (2,36%), representando 98,01% do total do óleo. Entretanto, Wang e Liu (2010) relataram que o óleo essencial do fruto de *L. cubeba* de áreas do sul da China, contém dois componentes principais, o neral (63,75%) e limoneno (7,38%) seguido por 6-methyl-5-hepten-2-ona (3,54%), camfeno (3,12%), α -pineno (2,87%), e p-cimeno (2,14%). Resultados diferentes podem ter sido devido à época da colheita e local, fatores climáticos e sazonais, bem como a duração de armazenamento de ervas medicinais (YANG et al., 2014).

Liu e Yang (2012) observaram efeito antimicrobiano do óleo essencial de *L. cubeba* tanto *in situ* quanto em modelos alimentares, e ao realizar a análise sensorial, a aceitação geral do tofu e o molho de soja foram preferidos ao sem

óleo essencial; enquanto as bebidas de leite de sabor laranja não se diferiram quanto à composição com e sem óleo.

2.4.5 Efeito antimicrobiano *in vitro*

Diversos autores têm reportado o efeito antimicrobiano desses óleos essenciais em estudos *in vitro*. Dimitrijević et al. (2007) destacaram que óleos essenciais de orégano, tomilho e alecrim estão entre os mais ativos antimicrobianos, enquanto, afirmam que concentrações mais baixas de óleos essenciais podem ser combinadas com outros compostos antimicrobianos ou outras tecnologias de conservação, para se obter efeito sinérgico sem comprometimento da atividade antimicrobiana.

SI et al. (2009) estudaram o potencial de inibição de 66 óleos essenciais e vários de seus componentes em *C. perfringens* tipo A, encontrando inibição de mais de 80% em 33 dos componentes testados, sendo o timol e carvacrol os inibidores mais eficazes entre os testados pelos autores. Ultee, Bennik e Moezelaar (2002) mostraram que o carvacrol interage com a membrana celular e provoca distorção da estrutura física da membrana, o que pode causar uma expansão e desestabilização, aumentando sua fluidez e sua permeabilidade.

Rodrigues (2014) observou que o óleo essencial de canela foi o mais efetivo sobre *C. botulinum* do tipo D, seguido dos óleos de orégano, tomilho e cravo-botão e suas combinações apresentaram efeito bactericida em todas as concentrações testadas.

2.4.6 Óleos essenciais em alimentos

A aplicação de antimicrobianos por diferentes análises demonstram diferenças notáveis (GOÑI et al., 2009), o grande desafio é a determinação da concentração ideal que exerça, simultaneamente, efeito antimicrobiano,

realçador de sabor e aroma dos alimentos para a utilização dos óleos essenciais, em substituição aos aditivos sintéticos para alimentos (ALEIXO, 2013; DIAS, 2011; MARTINS, 2013; OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA; SOARES; PICCOLI, 2013; RODRIGUES, 2014).

Existem diferenças entre ensaios *in vitro* e *in situ* de antimicrobianos de origem vegetal (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010), para obter resultados semelhantes em uma matriz alimentar concentrações superiores de óleo essencial a partir de testes *in vitro* são geralmente necessários (BURT, 2004).

Em estudo em espinafres branqueados e carne cozida picada, usando cravo e OE, foram necessárias três e quatro vezes o MIC em estudos *in vitro* para restringir populações de *E. coli* nas matérias alimentares (MOREIRA et al., 2007).

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 desses antimicrobianos (TSIGARIDA; SKANDAMIS; NYCHAS, 2000).

Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008) avaliaram a interferência de componentes de alimentos (lipídios, carboidratos e proteínas) em atividade antibacteriana de óleos essenciais de tomilho e orégano sobre *L. monocytogenes*, e eles sugerem que a fécula de batata e de lipídios reduziu o efeito antilisterial em concentrações superiores a 5%.

Skandamis, Tsigarida e Nychas (2000) estudaram o comportamento do óleo essencial de orégano em *Salmonella Typhimurium* em líquido (caldo) e em gel de gelatina, demonstrando que a matriz de gel reduziu drasticamente o efeito inibitório do óleo, possivelmente devido à limitação de difusão através da estrutura de matriz do gel.

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.

O orégano combinado com tomilho em doses baixas deve ser considerado como uma alternativa para o controle de agentes patogênicos (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008). Existem preocupações sobre o aroma e sabor realçado de orégano com os níveis mais elevados de aplicação em itens alimentares, especialmente em 1% (CHOULIARA et al., 2007).

Alguns 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, inclusive para carnes e produtos cárneos (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004; DIAS, 2011; EMIROGLU et al., 2010; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; LIU; YANG, 2012; OLIVEIRA; SOARES; PICCOLI, 2013; ROTA et al., 2008; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010; VIUDA-MARTOS et al., 2010).

O modelo alimentar, mortadela, a qual é utilizada em vários experimentos é um excelente meio para o crescimento de microrganismos anaeróbios, apresenta grande quantidade de nutrientes, com quantidade considerável de carboidratos, umidade mínima exigida (A_w) e teor de proteínas que fornecem todos os aminoácidos essenciais necessários para o crescimento, além disso, fatores como temperatura de armazenamento e embalagem em

atmosfera (reduzidas tensões de oxigênio) contribuem para o crescimento da população nas amostras-controle (OLIVEIRA et al., 2011).

Em mortadelas elaboradas com 100 ppm de nitrito e 0,78% de óleo essencial de *Satureja montana*, Oliveira et al. (2011) observaram pequena redução de crescimento sobre *C. perfringens*, entretanto reduções nas contagens foram mais pronunciadas em maiores concentrações de óleos essenciais, portanto é relatada a possibilidade da redução de nitrito de sódio quando combinado a óleo essencial, observaram também maior esporulação ao final do período de estocagem em todos os tratamentos avaliados. Segundo Mitchell (2001) a esporulação é iniciada, principalmente, em resposta à escassez de nutrientes, porém, outros fatores podem alterar a esporulação, como pH, oxigênio e temperatura, sendo favorecida em geral por condições que resultem em redução da taxa de crescimento.

Rodrigues (2014) observou que os tratamentos contendo combinações de óleos essenciais adicionados em mortadelas com redução de nitrito não foram eficientes para inibir completamente o crescimento das células vegetativas de *C. botulinum*, possibilitando a esporulação durante o armazenamento, contudo a adição dos óleos essenciais não promoveu efeito negativo nas características tecnológicas e físico-químicas do produto, sendo similar ao controle.

Em trabalho realizado por Dias (2011) não se observou aumento significativo do número de UFC/g de *C. perfringens* durante todo o tempo de armazenamento em mortadelas elaboradas com redução de nitrito de sódio (75ppm) e 3,1% de óleo essencial de orégano, entretanto houve maior concentração de nitrito residual e alterações sensoriais indesejáveis. Enquanto, nos estudos de Viuda-Martos et al. (2010), observaram que as amostras de mortadelas adicionadas de fibras de laranja e óleo essencial de tomilho (0,02%) e alecrim (0,02%) reduziram a concentração de nitrito residual em relação ao controle.

Cui, Gabriel e Nakano (2010) estudaram o efeito inibitório de diferentes combinações de extratos de plantas com 10 ppm de nitrito de sódio (NO₂) em um modelo alimentar cárneo inoculado com *C. botulinum* armazenado, por 7 dias, a 25 °C, tendo sido constatado efeito sinérgico entre o NO₂ e os extratos vegetais.

Ismail e Pierson (2006) testaram os efeitos inibitórios de óleos essenciais sobre cepas de *C. botulinum*, sendo que a concentração de 0,02% foi suficiente para inibir todas as cepas estudadas, e 0,015% e 0,2% para impedir germinação dos endósporos, classificando os óleos testados em três categorias: muito ativa (canela, origano e cravo), ativa (pimenta chinesa e tomilho) e menos ativa (alho, cebola e pimenta preta).

2.4.7 Atividade antioxidante de óleos essenciais em alimentos

A oxidação lipídica é responsável pelo 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.

O grau de oxidação lipídica do alimento que proporciona sabor e odor característicos de ranço pode ser analisado a partir da avaliação do índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). 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 espectrofotometria. 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 isso 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 aos seus aspectos sensoriais, características de extrema importância para os consumidores. Com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos gordurosos, são empregados compostos químicos conhecidos como antioxidantes (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes são substâncias capazes de sequestrar ou impedir a formação de radicais livres, ou seja, são doadores de prótons. 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⁻¹ para BHA e TBHQ e 100 mg.kg⁻¹ para BHT (BRASIL, 2001a).

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 essa propriedade funcional, podendo atuar como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e diminuir o uso dos antioxidantes sintéticos, prolongando a vida útil de vários alimentos (RAMALHO; JORGE, 2006). Muitos trabalhos confirmando a capacidade antioxidante de óleos essenciais já foram publicados, sendo constatada inclusive em carnes e produtos cárneos (ABDALLA et al., 2007; BAKKALI et al., 2008; CASTILHO et al., 2012; HWANG; CHOI; LEE, 2005; OLIVEIRA et al., 2012; VIUDA-MARTOS et al., 2010; YE; DAI; HU, 2013).

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. Castilho et al., (2012), afirmam que os óleos essenciais têm maior capacidade de eliminação de radicais livres do que os extratos mais polares, provavelmente devido aos elevados teores em timol, que demonstraram maior atividade antioxidante, enquanto Guerra e Lajolo (2005) observaram que os compostos apolares são mais eficientes em baixas atividades de água tendo a sua ação diminuída com o aumento da água do sistema, já com os compostos polares ocorre o inverso.

Vários autores afirmam que a atividade antioxidante de compostos fenólicos está relacionada com os grupos hidroxil ligados ao anel aromático, que

são capazes de doar átomos de hidrogénio e estabilizar radicais livres (BAYDAR et al., 2004; DORMAN et al., 2003).

Dias (2011) relata que a adição de 3,1% de óleo essencial de orégano, assim como a combinação dos óleos essenciais de tomilho (1%), cravo-da-índia (2%) e capim-limão (1%) e a combinação dos óleos de orégano (2,5%), tomilho (0,3%) e cravo-da-índia (0,6%) em mortadelas apresentaram ação pró-oxidante ao invés de antioxidante dos óleos essenciais.

Oliveira et al. (2012) analisaram as variações no índice de TBARs em modelo alimentar do tipo mortadela contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *Satureja montana* L. (0%, 0,78%, 1,56% e 3,125%) e doses de nitrito (0, 100, 200 ppm), em função do tempo de estocagem. Esses autores afirmam 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 (3,125%), ao final do período de estocagem (30 dias), confirmando o efeito pró-oxidante dos óleos devido à quantidade elevada utilizada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em ensaios realizados *in vitro* foi possível observar efeito antibacteriano individual e em combinações sobre *C. difficile* dos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e *Litsea cubeba*, sendo identificado como compostos majoritários o carvacrol, timol e citral, respectivamente. Em uma segunda etapa do trabalho foi realizada a formulação de mortadelas com redução de nitrito e adicionadas de combinações desses óleos essenciais. Entretanto, estes não se mostraram eficientes na inibição do crescimento e esporulação do microrganismo. Os tratamentos contendo óleos essenciais apresentaram maior quantidade de nitrito residual no produto após estocagem e células isoladas em análise de microscopia eletrônica. Contudo os óleos essenciais adicionados a mortadelas inibiram a oxidação lipídica do produto e não interferiram negativamente nem na cor e nem na textura destas, entretanto, doses menores são requeridas para minimizar os efeitos negativos identificados pelo teste de sensorial, quanto ao sabor.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A. E. M. et al. Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. **Food Chemistry**, London, v. 103, n. 4, p. 1141–1152, Jan. 2007.
- ALEIXO, G, C. **Efeito dos óleos essenciais e compostos majoritários sobre endósporos de *Clostridium botulinum* inoculados em mortadela**. 2013. 58 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- 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.
- APAC, C. C.; CUBAS, F. S. Diarreia associada a *Clostridium difficile*: características clínicas y epidemiológicas. **Acta médic Peruana**, Lima, v. 25, n. 2, p. 74–76, 2008.
- ASSOCIAÇÃO DAS INDÚSTRIAS BRASILEIRAS DE ALIMENTOS. **Redução do consumo de sal/sódio na dieta da população brasileira**. São Paulo, 2010. Mimeo.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446–475, Feb. 2008.
- BARTLETT, J. G. Annals of internal medicine review narrative review : the new epidemic of *Clostridium difficile* – Associated Enteric Disease. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 145, p. 758–764, 2006.

BAYDAR, H. et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 3, p. 169–172, Apr. 2004.

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.

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.

BOVILL, H. Trade of essential oils. In: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. (Ed.). **Handbook of essential oils: science, technology and applications**. Boca Ration: CRC, 2010. Chap. 20, p. 895-902.

BRANDI, G. et al. Activity of Brassica oleracea leaf juice on foodborne pathogenic bacteria. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 69, n. 9, p. 2274–2279, Sept. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Dispõe sobre o regulamento técnico de identidade e qualidade da mortadela. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2000.

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

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

BRASIL. Ministério da 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, 2001a. v. 1, p. 326.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001b.

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. **Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 jan. 2007.

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.

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.

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

CASTILHO, P. C. et al. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. **Food Control**, Guildford, v. 23, n. 2, p. 552–558, Feb. 2012.

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. H. et al. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams e Wilkins, 1986. v. 2, p. 1141-1200.

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

CHOULIARA, E. et al. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 degrees C. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 6, p. 607-17, Sept. 2007.

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.

CUI, H.; GABRIEL, A. A.; NAKANO, H. Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against *Clostridium botulinum*. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 7, p. 1030-1036, July 2010.

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

DENG, K. et al. Survival of *Clostridium difficile* spores at low temperatures. **Food Microbiology**, London, v. 46, n. 1 p. 218-21, Apr. 2015.

DIAS, N. A. A. **Avaliações microbiológica e físico-química de mortadelas elaboradas com óleos essenciais e inoculados com *Clostridium perfringens* tipo A.** 2011. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

DIMITRIJEVIĆ, 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 de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, London, v. 83, n. 2, p. 255–262, Nov. 2003.

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. et al. Radiação gama e tempo de armazenamento sobre a oxidação lipídica, cor objetiva, pigmentos heme e nitrito residual de mortadelas elaboradas com diferentes níveis de nitrito. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 12, p. 1–7, Nov. 2011.

EMIROGLU, Z. K. et al. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, Barking, v. 86, n. 2, p. 283–288, Apr. 2010.

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

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. **Code of federal regulations.** Washington, 2005.

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

FIGUEIREDO, G. et al. Studies of Mediterranean oregano populations, VIII e chemical composition of essential oils of oreganos of various origins. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 21, n. 1, p. 134-139, Jan./Feb. 2006.

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

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

FREEMAN, J. et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 23, n. 3, p. 529-549, July 2010.

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.

GOÑI, P. et al. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, London, v. 116, n. 4, p. 982-989, Oct. 2009.

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

GROSSO, C. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds. **Food Chemistry**, London, v. 111, n. 1, p. 197-203, Nov. 2008.

GUANGDONG FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Chinese materia medica standards of Guangdong Province**. Guangzhou: Guangdong Science and Technology, 2004.

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.

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

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

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H.; MATTILA-SANDHOLM, T. 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.

HERNÁNDEZ-ROCHA, C. et al. Infecciones causadas por *Clostridium difficile*: una visión actualizada. **Revista Chilena de Infectología**, Santiago, v. 29, n. 4, p. 434-445, Aug. 2012.

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

HONIKEL, K. O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, Barking, v. 78, n. 1-2, p. 68-76, Jan. 2008.

HOOVER, D. G.; RODRIGUEZ-PALACIOS, A. Transmission of *Clostridium difficile* in foods. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 27, n. 3, p. 675-85, Sept. 2013.

HWANG, J. K.; CHOI, E. M.; LEE, J. H. Antioxidant activity of *Litsea cubeba*. **Fitoterapia**, Cambridge, v. 76, n. 7/8, p. 684-686, Dec. 2005.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/TC 54 essential oils; óleo essencial de Chamomilla recutita tipo Egpto**. Geneva, 2004.

ISMAIEL, A. A.; PIERSON, M. D. Inhibition of growth and germination of *C. botulinum* 33 A, 40 B e 1623 E by essential oil spices. **Journal Food Science**, Chicago, v. 55, n. 6, p. 1676-1678, 2006.

JIM, Z.; SHA, W. The karyo type study on *Isodon japonica* var *glauco* calyx and *Leonurus japonicus*. **Guangxi Sciences**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 78-80, 2004.

KUEHNE, S. A. et al. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. **Nature**, London, v. 467, n. 7316, p. 711–713, Oct. 2010.

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.

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

LIU, T. T.; YANG, T. S. Antimicrobial impact of the components of essential oil of *Litsea cubeba* from Taiwan and antimicrobial activity of the oil in food systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 156, n. 1, p. 68–75, May 2012.

LOO, V. et al. A Predominantly clonal multi-institutional outbreak of. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 353, p. 2442–2449, Dec. 2005.

LOPEZ-MALO, V. A.; PALOU, E.; ALZAMORA, S. M. Naturally occurring compounds plant sources. In DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N.; BRANEN A. L. **Antimicrobials in food**. 3rd. ed. Boca Raton, Florida: CRC, 2005. 720 p.

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

MARTINS, H. H. A. **Atividade de combinações de óleos essenciais sobre *Clostridium perfringens* tipo A inoculadas em mortadela**. 2014. 52 p. Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

MCFARLAND, L. V et al. Implications of the changing face of *Clostridium difficile* disease for health care practitioners. **American Journal of Infection Control**, New York, v. 35, n. 4, p. 237–53, May 2007.

MCFREE, R. B.; ABDELSAYED, G. G. *Clostridium difficile*. **Disease a Month**, Chicago, v. 55, n. 7, p. 439–470, July 2009.

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: J. Wiley-VHC, 2001. p. 49-104.

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

MOREIRA, M. R. et al. Effects of clove and tea tree oils on *Escherichai coli* O157:H7 in blanching spinach and minced cooked beef. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, v. 31, n. 4, p. 379–391, Aug. 2007.

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.

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

NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Switzerland v. 6, n. 12, p. 1451–74, Nov. 2013.

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.

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

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. **LWT - Food Science and Technology**, London v. 45, n. 2, p. 204–212, Mar. 2012.

OLIVEIRA, T. L. C.; SOARES, R. D. A.; PICCOLI, R. H. A *Weibull* model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. **Meat Science**, Barking, v. 93, n. 3, p. 645–51, Mar. 2013.

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

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.

PAREDES-SABJA, D.; SARKER, M. R. Germination response of spores of the pathogenic bacterium *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* to cultured human epithelial cells. **Anaerobe**, Blacksburg, v. 17, n. 2, p. 78–84, Apr. 2011.

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

PEREIRA, A. D. et al. Thermochemical inactivation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Enteritidis by essential oils. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 11, p. 2022–2028, Nov. 2014.

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: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC, 2007. p. 75-91.

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. Viçosa, MG: UFV, 2009. 599 p.

ROÇA, R. O. **Cura de carnes.** Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônomicas/UNESP, 2005.

RODRIGUES, L. T. S. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre *Clostridium botulinum* inoculado em mortadelas.** 2014. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A. et al. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. **Emerging Infectious Disease**, California, v. 13, n. 3, p. 485-487, Mar. 2007.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A. et al. Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. **Emerging Infectious Disease**, California, v. 15, n. 5, p. 802-805, May 2009.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; LEJEUNE, J. T. Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in *Clostridium difficile*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 9, p. 3085-3091, May 2011.

RODRÍGUEZ-PARDO, D.; MIRELIS, B.; NAVARRO, F. Infections caused by *Clostridium difficile*. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, Barcelona, v. 31, n. 4, p. 254-263, Apr. 2013.

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.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 34, n. 1, p. 3–21, May 2001.

SEBRANEK, J. G.; BACUS, J. N. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? **Meat science**, Barking, v. 77, n. 1, p. 136–147, Sept. 2007.

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.

SI, W. et al. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards *Clostridium perfringens*. **Journal of Applied Microbiology**, Tokyo, v. 106, n. 1, p. 213–220, June 2009.

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

SKANDAMIS, P.; TSIGARIDA, E.; NYCHAS, G. E. Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within a gelatin gel with or without the addition of oregano essential oil. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, Chichester, v. 16, p. 31–35, Sept. 2000.

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, 28, Mar. 2010.

STEFANAKIS, M. K. et al. Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. **Food Control**, Guildford, v. 34, n. 2, p. 539–546, Dec. 2013.

SUNENSHINE, R. H.; MCDONALD, L. *Clostridium difficile* associated disease: New challenges from an established pathogen. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, Lyndhurst, v. 73, n. 2, p. 187–197, Feb. 2006.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 9, p. 1199–1218, Sept. 2010.

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

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

TSIGARIDA, E.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G. 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 of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, n. 6, p. 901–909, Dec. 2000.

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.

UNITED NATIONS COMMODITY TRADE STATISTICS DATABASE. 2005. Disponível em: <http://data.un.org/Data.aspx?d=ComTrade&f=_11Code%3a34>. Acesso em: 12 jan. 2015.

VIANA, H. L. *Clostridium difficile*: infecção e ribotipos. **Jornal Português de Gastreenterologia**, Lisboa, v. 20, n. 6, p. 240–242, Nov. 2013.

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. 3, p. 568–576, Mar. 2010.

WANG, H.; LIU, Y. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from Different Parts of *Litsea cubeba*. **Chemistry e Biodiversity**, Switzerland, v. 7, n. 1, p. 229–235, Jan. 2010.

WEESE, J. S. *Clostridium difficile* in food-innocent bystander or serious threat? **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 16, n. 1, p. 3–10, Jan. 2010.

YANG, K. et al. Bioactivity of essential oil of *Litsea cubeba* from China and its main compounds against two stored product insects. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 459–466, Sept. 2014.

YE, C. L.; DAI, D. H.; HU, W. L. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.). **Food Control**, Guildford, v. 30, n. 1, p. 48–53, Mar. 2013.

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

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.

SEGUNDA PARTE

Artigo 1

Normas da Revista científica
“International Journal of Food Microbiology” (versão preliminar)

**Viabilidade de *Clostridium difficile* em mortadela elaborada com
adição de óleos essenciais e teor reduzido de nitrito de sódio**

RESUMO

Objetivou-se neste estudo determinar a concentração mínima bactericida de diferentes óleos essenciais e suas combinações sobre *C. difficile*, e avaliar sua adição em mortadelas elaboradas com teor reduzido de nitrito de sódio contra *C. difficile*, assim como identificar e quantificar os componentes químicos majoritários dos óleos essenciais utilizados. Para CMB foi utilizado a técnica de diluição em caldo com modificações, realizando uma triagem utilizando caldo de clostridium em tubos de ensaio de tampa rosqueada e em seguida utilizando tubos a vácuo para os óleos essenciais selecionados, testando-os individuais e em combinações. Os componentes químicos dos melhores OE foram caracterizados por Cromatografia de Fase Gasosa. Foram elaboradas as mortadelas contendo combinações de óleos essenciais e teor reduzido de nitrito de sódio, as amostras foram separadas e as destinadas a análise microbiológica foram inoculadas 10^5 UFC/g de *C. difficile* embaladas a vácuo e armazenadas a 25°C durante 15 dias. Foi avaliado o crescimento e esporulação de *C. difficile*, e observado por microscopia eletrônica de varredura aspectos morfológicos destes, avaliado Aw, pH e nitrito residual do produto. A CMB do OE de *O. basilicum* foi de 1,2%, enquanto o de *O. vulgare* e *T. vulgaris* apresentaram efeito bactericida a 0,3% e *L. cubeba* a 0,15%. Todas as combinações dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *T. vulgaris* e *L. cubeba* eficientes *in vitro*, apresentaram os compostos majoritários carvacrol, timol e citral, respectivamente. Sendo selecionados para elaboração das mortadelas a combinação dos OE de *O. vulgare* (0,2%), *T. vulgaris* (0,05%) e *L. cubeba* (0,025%) para F1 e para F2 os OE de *O. vulgare* (0,1%), *T. vulgaris* (0,1%) e *L. cubeba* (0,05%). Não houve diferença significativa do crescimento de células viáveis entre os tratamentos contendo OE e controle, entretanto houve aumento de aproximadamente 2,5 log₁₀ de NMP/g de células viáveis após o quinto dia. Observou-se aumento da esporulação durante a estocagem, principalmente na F1 com 2,3 log₁₀ NMP/g de endósporos na mortadela ao final de sua estocagem. Houve redução do pH durante o armazenamento e maior quantidade de nitrito residual na F1 com 10,23 ppm e redução do nitrito residual durante o armazenamento, apresentando 18,75 ppm no primeiro de estocagem e 5,11 no último dia.

Palavras-chave: Produto cárneo. Anaeróbios. Aditivos naturais.

1 INTRODUÇÃO

Clostridium difficile é uma bactéria mesófila, Gram-positiva, anaeróbia estrita, formadora de esporos, constituindo um importante agente patogênico humano (Hoover and Rodriguez-Palacios, 2013; Weese, 2010).

A infecção ocorre em consequência da ingestão de células vegetativas ou endósporos que resistem à ação do ácido gástrico, germinam no intestino delgado e colonizam o cólon, produzindo toxinas que iniciam uma série de fenômenos (Rodríguez-Pardo et al., 2013; Sunenshine and McDonald, 2006) que variam desde diarreia aquosa até casos mais graves de colite pseudomembranosa, megacólon tóxico ou perfuração cólica, que culminam com a perda da função da barreira das células intestinais, aparecimento de diarreia e formação de pseudomembranas (Rodríguez-Pardo et al., 2013; Sunenshine and McDonald, 2006).

Observa-se o aumento do número de casos de *C. difficile* relacionado à ingestão de alimentos contaminados (Deng et al., 2015; Hoover and Rodriguez-Palacios, 2013; Loo et al., 2005; Paredes-Sabja and Sarker, 2011; Rodriguez-Palacios et al., 2007; Rodríguez-Pardo et al., 2013; Weese, 2010), principalmente produtos cárneos como a mortadela.

Dentre os principais ingredientes da mortadela estão o nitrito de sódio ou de potássio, que apresentam como finalidades básicas conferir a cor rósea e o sabor característicos de produtos curados, além de prevenir alterações desagradáveis oriundos da rancidez oxidativa dos lipídios e atuar como conservante, principalmente contra o crescimento e a

produção de toxina do *Clostridium sp.* (Cassens, 1997; Feiner, 2006; Toldrá, 2010). Entretanto o ácido nitroso, pode reagir com aminas em produtos cárneos curados para formação de compostos N-nitrosos, em especial as nitrosaminas, que possuem efeito tóxico, mutagênico, neuro, nefrotóxico e carcinogênicos (Francis, 2000; Rywotycki, 2002).

Diante disto, a conservação de alimentos tornou-se um desafio para a indústria de alimentos, necessitando cada vez mais de conservantes eficazes, mas que não trazem riscos a saúde do consumidor, sobretudo porque há uma tendência de recusa em relação ao uso de conservantes químicos e antimicrobianos artificiais para inibir o crescimento de microorganismos patogênicos (Tajkarimi et al., 2010). Diversos autores têm trabalhado a fim de obter a substituição total ou parcial de nitrito de sódio (Aleixo, G, 2013; Dias, 2011; Dutra et al., 2011; Martins, 2013, 2014; Oliveira et al., 2012, 2011; Rodrigues, 2014), podendo os óleos essenciais ser uma alternativa, atraindo a atenção de vários pesquisadores, devido ao potencial antioxidante, antimicrobiano, flavorizante, aromático, antisséptico, carminativo, antiespasmódico e expectorante (Bakkali et al., 2008; Burt, 2004; Oliveira et al., 2012; Oussalah et al., 2007; Pereira et al., 2014; Sangwan et al., 2001; Tajkarimi et al., 2010).

Estudos tem demonstrado a eficiência da utilização de óleos essenciais como antimicrobianos naturais e são considerados fontes potenciais de aditivos para a indústria de alimentos, inclusive para carnes e produtos cárneos (Bakkali et al., 2008; Burt, 2004; Dias, 2011; Emiroglu et al., 2010; Gutierrez et al., 2008; Liu and Yang, 2012; Oliveira et al., 2013; Rota et al., 2008; Tajkarimi et al., 2010; Viuda-Martos et al., 2010).

Diante disto, este trabalho objetivou determinar a concentração mínima bactericida de diferentes óleos essenciais e suas combinações sobre *C. difficile*; identificar e quantificar componentes químicos dos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e *Litsea cubeba*, e testar sua adição em mortadelas elaboradas com teor reduzido de nitrito de sódio contra *C. difficile*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do inóculo *Clostridium difficile*

A bactéria utilizada neste trabalho foi *C. difficile* ATCC 9689 (Histórico 90556-M6S:L.S. McClung 1780; INCQS 00214), obtida do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil).

O micro-organismo foi reativado em meio específico *Clostridium* Broth (CB, HiMedia, India) acrescido de 0,5% de glicose (CB-Gli) e mantido em condições anaeróbicas utilizando óleo mineral e incubados a 37°C por 72h. Após o crescimento da cepa, o sobrenadante foi centrifugado (5000 rpm por 5 min a 24°C), as culturas estoque foram armazenadas em meio de congelamento (15% glicerol; 0,5% peptona bacteriológica; 0,3% extrato de levedura; 0,5% NaCl, pH de 7,2 ±0,2) e mantidas a -18°C durante a execução do trabalho. Para reativação e utilização da cepa uma alíquota da cultura congelada foi transferida para tubos contendo CB-Gli e incubadas por 37°C/72h e novamente reativada a 37°C/24h sob condições anaeróbicas. A cada nova reativação a pureza

da cultura foi verificada em ágar SPS (Sulfite Polymyxin Sulfadiazine; HiMedia, Índia) e coloração de Gram.

A população bacteriana do inóculo foi padronizada por meio de curva de crescimento, por espectrofotometria através da densidade óptica a 600nm, com leituras de absorbâncias periódicas e contagem em placas utilizando meio SPS, através metodologia *pour plate*, incubadas a 37°C/72h em condições anaeróbicas utilizando gerador de atmosfera anaeróbica PROBAC®.

2.2 Óleos essenciais

Foram avaliados os óleos essenciais (OE) de *Cinnamomum Camphora* (Ho Wood), *Cinnamomum zeylanicum* (Canela), *Citrus limon* (Limão-siciliano), *Citrus nobilis* (Mandarina), *Foeniculum vulgare Dulce* (Funcho doce), *Litsea cubeba* (Pimenta chinesa), *Mentha piperita* (Menta), *Myristica fragans* (Noz moscada), *Ocimum basilicum* (Manjericão/basilicão), *Origanum vulgare* (Orégano), *Pimpinella anisum* (Anis), *Piper nigrum* (Pimenta preta), *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), *Syzygium aromaticum* (Cravo-da-índia), *Thymus vulgaris* (Tomilho), foram adquiridos da empresa FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda, Brasil.

2.2.1 Concentração mínima bactericida

Para a CMB foi realizada uma triagem utilizando a técnica de diluição em caldo (NCCLS, 2003) com modificações. Alíquotas da cultura padronizada em 10^5 UFC/mL ($DO_{600nm}=0,100$) foram transferidas para tubos de ensaio com tampas rosqueáveis contendo 5mL de CB-Gli

contendo 0,5% (v/v) de tween 80, e OE nas concentrações de 10,0; 8,0; 7,0; 6,0; 5,0; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03; 0,01% e 0% como controle negativo. O controle positivo foi preparado com 1000mg/L de solução de cloranfenicol. Os tubos foram incubados em condições anaeróbias utilizando óleo mineral a 37°/24-48h, após esse período, 0,1mL do inóculo foram inoculadas em um tubo contendo CB-Gli e incubadas em condições anaeróbicas utilizando óleo mineral a 37°/24-48h. As análises foram realizadas em triplicata. As menores concentrações de OE onde verificou-se a ausência de turvação nos tubos foram consideradas como as CMB.

Após esta primeira etapa foram selecionados quatro OE para o teste in vitro utilizando tubos à vácuo, a fim de assegurar os resultados obtidos, visto a sensibilidade da cepa ao oxigênio. Foi realizada a mesma metodologia descrita anteriormente, entretanto sem a necessidade da utilização do óleo mineral.

2.2.2 Combinação de óleos essenciais

Após os testes foram selecionados os OE que apresentaram menor concentração mínima bactericida para serem avaliados em combinações através de planejamento experimental. Para análise das combinações foi utilizada a técnica de diluição em caldo. Alíquotas da cultura padronizada a 10^5 UFC/mL ($DO_{600nm}=0,100$) foram transferidas para tubos à vácuo contendo 5mL de CB-Gli contendo 0,5% (v/v) de tween 80, e combinações dos OE nas proporções apresentadas na Tabela 1. Os tubos foram incubados a 37°/24h, após esse período 0,1mL foi transferido para tubo a vácuo contendo CB-Gli e incubadas a 37°/24-48h. As análises

foram realizadas em triplicata. O crescimento foi observado por meio da turvação do meio e leitura da absorbância.

Tabela 1 Planejamento experimental para avaliação da combinação de três óleos essenciais, considerando a proporção referente à concentração mínima bactericida (CMB)* de cada óleo analisado

Ensaio	Óleo A (%)	Óleo B (%)	Óleo C (%)
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	67	17	17
8	17	67	17
9	17	17	67
10	33	33	33

* A CMB de cada óleo estudado foi considerada como 100% e os demais números representam as proporções dos óleos utilizadas baseando-se na CMI

2.2.3 Identificação e quantificação dos constituintes químicos

As análises químicas dos OE foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do DAG/UFLA.

Os componentes químicos dos melhores OE foram caracterizados por Cromatografia de Fase Gasosa Agilent® 7890A, operado com sistema de processamento de dados HP GC ChemStation Ver. A.01.14, equipado com injetor/amostrador automático CombiPAL Autosampler

System (CTC Analytic AG, Switzerland) e Detector de Ionização em Chama (CG-DIC). As amostras foram preparadas diluindo-se o óleo essencial em acetato de etila (1%, v/v). O volume de injeção foi de 1,0 μ L, no modo split a uma razão de injeção de 50:1. Empregou-se coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 250 μ m de diâmetro interno x 0,25 μ m de espessura do filme) (Califórnia, EUA). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 240°C. Empregou-se uma rampa de temperatura de 3°C/min de 60°C a 200°C, seguido de uma rampa de 10 °C/min até 270 °C, mantendo-se em condição isotérmica por 1 minuto. As concentrações dos constituintes foram expressas pela média da porcentagem de área relativa aos picos cromatográficos \pm o desvio padrão de 3 amostras analisadas. Os resultados analíticos foram apresentados para os cinco constituintes de maior área relativa. As análises qualitativas foram realizadas em Cromatógrafo Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições operacionais foram as mesmas empregadas nas análises por CG-DIC. Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à coinjeção de uma solução padrão de n-alcenos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Van den

Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (Adams, 2007).

2.3 Elaboração das mortadelas

As mortadelas foram elaboradas no Laboratório de Tecnologia de Carnes e Derivados, DCA/UFLA.

Utilizou-se a formulação típica de mortadela brasileira, segundo Dutra et al. (2011): A carne bovina (58,5%) previamente moída foi adicionada ao *cutter*, seguida de cloreto de sódio (1,9%), polifosfato Fosmax (0,3%, New Max Industrial, Brasil), nitrito de sódio (0,0075%), ácido ascórbico (0,05%), água/gelo (20%), fécula de mandioca (5%) e toucinho (14%), respectivamente. Para todos tratamentos foi utilizado 75ppm de NaNO₂, representando metade da quantidade limite de NaNO₂ permitida pela legislação de 150 ppm de nitrito de sódio (Portaria nº 1.004 de 11 de Dezembro de 1998 da ANVISA), visando a utilização conjunta com a combinação de OE baseados em ensaios microbiológicos *in vitro*.

Após completa emulsificação a massa foi embutida em tripa sintética (CALEBRE, 67 mm, empresa Shur) e cozidas em banho-maria, até temperatura final de 73⁰C no ponto frio da amostra, monitorado com uso de termômetro. Após o cozimento as mortadelas foram mantidas em banho-de-gelo por 20 min e armazenadas sob refrigeração.

As amostras destinadas à análise microbiológica foram separadas em porções de 25g, inoculadas a 10⁵ UFC/g do inóculo de *C. difficile*, homogenizadas e seladas a vácuo em embalagens plásticas. As amostras

destinadas as análises físico-químicas foram embaladas em porções de 100g e seladas a vácuo, sem adição do inóculo.

2.4 Análise das mortadelas

As amostras foram armazenadas em estufa tipo BOD a 25°C, retiradas para análise nos tempos 0, 1, 5, 10 e 15 dias. Todas as análises foram realizadas em 3 repetições em triplicata.

2.4.1 Contagem total de células e endósporos de *C. difficile*

Para quantificação de *C. difficile*, 25g do produto foi diluído em 225mL de água peptonada (0,1% m/v) e homogeneizado em Stomacher (Metroterm, Brasil) com 490golpes/min durante 2 min. Após este procedimento foram realizadas diluições seriadas em água peptonada (0,1% m/v) e alíquotas de 1 mL foram adicionados em uma sequência de 3 tubos de ensaio com tampa rosqueada contendo CB-Gli e incubados a 37°C de 24 a 48h sob condições anaeróbicas utilizando óleo mineral. Os tubos apresentando características de crescimento (turvação e produção de gás) foram considerados positivos e interpretados pela tabela de Número Mais Provável (NMP). Os resultados foram expressos em NMP de células viáveis por grama nas amostras de mortadela (NMP/g), metodologia descrita por Scott et al. (2001).

Para enumeração de endósporos, após a diluição em água peptonada as amostras de mortadela foram submetidas ao choque térmico, 75°C por 15 minutos, seguido de banho de gelo por 15min. Subsequentemente foi realizado diluições seriadas em água peptonada (0,1% m/v) e adicionado 1mL em sequência de três tubos de ensaio com

tampa rosqueada adicionados de CB-Gli, incubados a 37^oC de 24-48h sob condições anaeróbicas utilizando óleo mineral. Os resultados foram expressos em NMP de endósporos por grama nas amostras de mortadelas (NMP/g).

2.4.2 Determinação do pH e Atividade de água

Os valores de pH das mortadelas foram medidos por meio da inserção de eletrodo combinado (sistema de referência de Ag/AgCl), tipo de penetração, acoplado a um potenciômetro DM20 (Digimed, São Paulo, SP, Brasil), em três pontos diferentes do produto.

A atividade de água (Aw) da mortadela 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.

2.4.3 Nitrito residual

O teor de nitrito residual nas mortadelas foi avaliado segundo a metodologia oficial n° 973.31 da AOAC (1995). Aproximadamente 10 g de amostra foram homogeneizados em 40 mL de água destilada a 80°C. A solução foi transferida para um balão de fundo chato, utilizando-se água destilada a 80°C até o volume de ±300mL, sendo submetido a banho-maria, a 80°C, por 2 horas, agitando 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 de Falcon, sendo adicionados 2,5 mL de sulfanilamida, homogeneizado, e após 5 minutos,

2,5 mL de reagente NED (N-(1-naftil) etilenodiamino) foi adicionado e a mistura homogeneizada. 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 triplicata. Os valores de nitrito residual foram expressos em partes por milhão (ppm), por meio da curva padrão de nitrito de sódio.

2.4.4 Microscopia eletrônica de varredura

Para visualização do efeito do óleo essencial sobre *C. difficile* foram inoculados 100µL de cultura padronizada a 10^5 UFC/g de *C. difficile* em fatias de mortadela, sendo estas embaladas a vácuo e incubadas a 37°C. Após o período de duas horas de exposição, retiraram-se cilindros de 0,5 cm de diâmetro das mortadelas. As amostras foram imersas em solução fixadora (Karnovsky modificado), pH 7,2, pelo período de 24 horas. Após este período, foram lavadas com tampão cacodilato (0,05M) por três vezes por 10 minutos e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, em água, por 1 hora. Após este período, foram lavadas por três vezes em água destilada e, em seguida, desidratados em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%, por 10 minutos; 100% por três vezes de 10 minutos). O material foi levado ao aparelho de ponto crítico (Bal-Tec CPD 030) para substituição da acetona por CO₂ e complementação da secagem. Posteriormente, as amostras foram cobertas com ouro (metalizador Bal-Tec SCD 050) utilizando stubs como suporte. Foram obtidas eletromicrografias dos microrganismos aderidos à superfície das fatias de mortadela utilizando microscópio eletrônico de varredura Evo 040 Leo (Alves, 2004).

2.5 Análise estatística

A análise da CMB e combinação dos OE foi submetida à análise dos componentes principais (PCA). Os dados foram pré-processados, sendo estes centrados na média, para um melhor ajuste dos dados antes das análises, utilizando o software Chemoface (Versão 1.5).

O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3x4, sendo três tratamentos em quatro tempos de armazenamento com três repetições em triplicata. Foram realizadas análises de regressão no tempo para cada tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias foi estabelecidas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software STATISTICA versão 5.0, da STATSOFT.

3 RESULTADOS

3.1 Concentração mínima bactericida e seleção de OE

Triagem inicial foram realizadas testando a CMB de vários OE sobre *C. difficile*. O OE de *P. nigrum* não foi efetivo a 10%, apresentando crescimento semelhante ao controle, os OE de *R. officinalis*, *C. Camphora*, e *F. vulgare* apresentaram CMB semelhante com inibição a 1%, enquanto *M. fragans*, *C. limon* e *M. piperita* tiveram efeitos semelhantes com CMB a 0,12%, já *T. vulgaris* e *C. nobilis* foram inibitórios a 0,06%, e *O. vulgare*, *C. zeylanicum*, *O. basilicum*, *L. cubeba* e *P. anisum* tiveram CMB a 0,015% constituindo os OE com menores

concentrações mínimas inibitórias analisadas. O OE de cravo não teve efeito semelhante a nenhum outro com CMB a 4%, como pode ser observado na figura 1.

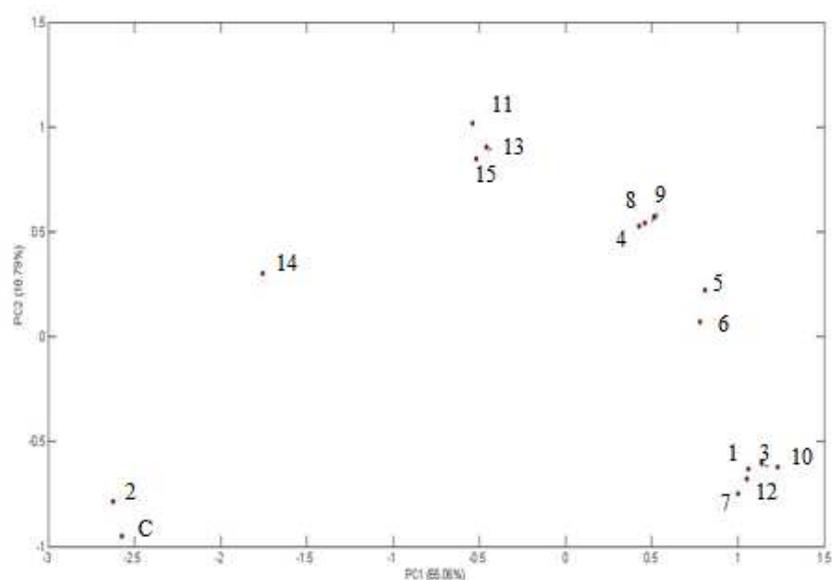


Figura 1 PCA da concentração mínima bactericida dos óleos essenciais de *O. basilicum*/basilicão (1), *P. nigrum*/pimenta (2), *P. anisum*/anis estrelado (3), *M. Fragans*/noz moscada (4), *T. vulgaris*/tomilho (5), *C. nobilis*/mandarina (6), *L. cubeba*/pimenta chinesa (7), *M. piperita*/menta (8), *C. limon*/limão (9), *O. vulgare*/orégano (10), *R. officinalis*/alecrim (11), *C. zeylanicum*/canela (12), *C. Camphora*/Ho Wood (13), *S. aromaticum*/cravo (14), *F. vulgare*/funcho (15) e controle (C) sobre *C. difficile*

Diante dos resultados foram selecionados os OE *O. vulgare*, *T. vulgaris* e *L. cubeba* com potencial bactericida e também sensoriais para possível análise em mortadela, para confirmar a confiabilidade dos resultados utilizou-se tubos à vácuo, visto a sensibilidade do micro-organismo analisado. A CMB do OE de *O. basilicum* foi de 1,2%, enquanto o de *O. vulgare* e *T. vulgaris* apresentaram efeito bactericida a 0,3% e *L. cubeba* a 0,15%, demonstrando que a concentração mínima bactericida teve pequeno aumento para o todos os OE testados.

Foram selecionados os três melhores óleos para análise de efeito sinérgico entre eles, sendo OE de *O. vulgare*, *T. vulgaris* e *L. cubeba*, entretanto todas as misturas testadas se mostraram eficientes, não permitindo o crescimento de *C. difficil*.

Diante disto, para elaboração da mortadela foram escolhidos o ensaio 7 do planejamento experimental com 67% da proporção da CMB do OE de *O. vulgare*, e 17% da CMB dos demais OE, e o ensaio 10 que corresponde a utilização de 33% da CMB de todos os óleos testados. Portanto, para formulação 1 (F1) adicionou-se a combinação dos OE de *O. vulgare* (0,2%), *T. vulgaris* (0,05%) e *L. cubeba* (0,025%); para formulação 2 (F2) foi adicionada as concentrações de OE de *O. vulgare* (0,1%), *T. vulgaris* (0,1%) e *L. cubeba* (0,05%).

3.2 Caracterização química dos óleos essenciais

O carvacrol é o composto majoritário do *O. vulgare* representando 73,1% de seus constituintes, já o timol representa 50,9% dos compostos químicos contidos no OE de *T. vulgaris*, enquanto os citral (geranial e

neral) correspondem a 71,83% dos compostos do OE de *L. cubeba* (Tabela 2).

Tabela 2 Constituintes químicos dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *T. vulgaris* e *L. cubeba*, identificados por cromatografia gasosa

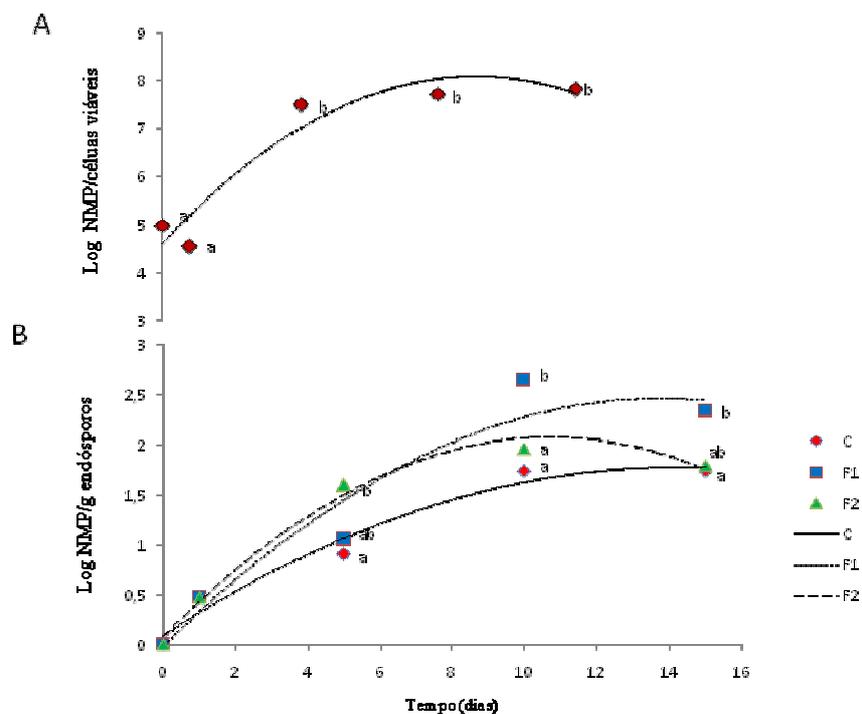
Óleo essencial	Compostos majoritários (%)	Total (%)
<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol	73,11
	β -cariofileno	4,32
	γ -terpineno	3,93
	ρ -cimeno	3,92
	Timol	2,97
	Total	88,25
<i>Thymus vulgaris</i>	Timol	50,89
	σ -cimeno	24,97
	γ -terpineno	5,91
	Linalol	4,46
	Carvacrol	2,93
	Total	89,16
<i>Litsea cubeba</i>	Geranial	40,5
	Neral	31,33
	Limoneno	13,21
	α -pineno	1,34
	Sabineno	1,28
	Total	87,66

3.3 Efeito dos OE em *C. difficile* inoculados em mortadela

Foi observada interação significativa entre os tratamentos durante o tempo de estocagem da mortadela por 15 dias a 25°C. Não houve diferença ($p > 0,05$), do crescimento de células viáveis entre os tratamentos contendo OE e controle, entretanto este efeito foi significativo durante o

tempo de armazenagem do produto. Não apresentou crescimento ($P < 0,05$) de *C. difficile* no primeiro dia de estocagem, entretanto houve aumento de aproximadamente $2,5 \log_{10}$ de NMP/g de células viáveis após o quinto dia de armazenamento não apresentando demais crescimento significativo nos próximos dias de estocagem.

Ao analisar a contagem de esporos de *C. difficile*, foi observada interação significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos durante o tempo de estocagem da mortadela por 15 dias a 25°C . No dia de inoculação não foi observada endósporos o que confirma que utilizou-se no trabalho apenas células viáveis, já no primeiro dia de armazenamento não houve diferença entre os tratamentos com $0,48 \log_{10}$ NMP/g de endósporos, entretanto houve aumento da esporulação durante a estocagem, observando maior quantidade de NMP de endósporos nos tratamentos contendo OE, principalmente na F1 com $2,3 \log_{10}$ NMP/g de endósporos na mortadela ao final de sua estocagem (Figura 2).



C: 75ppm de nitrito de sódio; F1: 75ppm de nitrito de sódio e OE de *O. vulgare* (0,2%), *T. vulgaris* (0,05%) e *L. cubeba* (0,025); F2: 75ppm de nitrito de sódio e OE de *O. vulgare* (0,1%), *T. vulgaris* (0,1%) e *L. cubeba* (0,05%). Equações para \log_{10} NMP/g de células viáveis: $y = -0,026x^2 + 0,608x + 4,623$ ($R^2=0,91$); \log_{10} NMP/g de endósporos: C: $y = -0,008x^2 + 0,237x + 0,085$ ($R^2=0,97$); F1: $y = -0,013x^2 + 0,359x - 0,011$ ($R^2=0,94$); F2: $y = -0,017x^2 + 0,373x + 0,073$ ($R^2=0,99$). Valores seguidos por letras diferentes na linha (NMP/células) e na mesma coluna (NMP/endósporos) diferem entre si significativamente ($P<0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 2 Crescimento (A) e esporulação (B) de *C. difficile* (\log_{10} NMP/g) em mortadelas formuladas teor reduzido de nitrito de sódio e adição de óleos essenciais armazenadas a 25°C durante 15 dias

A atividade de água (A_w) da mortadela permaneceu em aproximadamente $0,97 \pm 0,005$ em todos os tratamentos e tempos de armazenamento.

Quanto ao pH, as mortadelas também não se diferiram quanto aos tratamentos, entretanto foi presenciada uma leve redução linear ($P < 0,05$) durante sua estocagem passando de 6,17 no primeiro dia 6,07 no quinto dia e 6,04 no décimo dia chegando a 5,93 no décimo quinto dia de estocagem a 25°C .

Ao analisar o nitrito residual das mortadelas não houve interação entre os tratamentos e período de estocagem ($P > 0,05$), entretanto foi observado maior quantidade ($P < 0,05$) de nitrito residual na F1, seguida da F2 que não se diferenciou nem desta nem do controle (Tabela 3).

Tabela 3 Nitrito residual em mortadelas elaboradas com redução de nitrito de sódio e diferentes combinações de óleos essenciais armazenadas a 25°C durante 15 dias

Tratamentos	Nitrito residual (ppm)
C	$7,63 \pm 6,20^a$
F1	$10,23 \pm 6,41^b$
F2	$8,86 \pm 5,85^{ab}$

C: 75ppm de nitrito de sódio; F1: 75ppm de nitrito de sódio e OE de *O. vulgare* (0,2%), *T. vulgaris* (0,05%) e *L. cubeba* (0,025); F2: 75ppm de nitrito de sódio e OE de *O. vulgare* (0,1%), *T. vulgaris* (0,1%) e *L. cubeba* (0,05%). Médias \pm Desvio padrão. Valores seguidos por letras diferentes na coluna diferem entre si significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Observou-se decréscimo do nitrito residual logo no primeiro dia de análise, visto que foram formuladas mortadelas com 75 ppm de nitrito e no primeiro dia continha 18,75 ppm, reduzindo significativamente após 5 dias de estocagem e ligeira redução ($P>0,05$) durante todo o armazenamento (Tabela 4).

Tabela 4 Nitrito residual durante o armazenamento de mortadelas elaboradas com teor reduzido de nitrito de sódio e diferentes combinações de óleos essenciais

Tempo (dias)	Nitrito residual (ppm)
1	18,75 ±2,15 ^a
5	6,62 ±2,53 ^b
10	5,14 ±1,64 ^b
15	5,11 ±0,87 ^b

C: 75ppm de nitrito de sódio; F1: 75ppm de nitrito de sódio e OE de *O. vulgare* (0,2%), *T. vulgaris* (0,05%) e *L. cubeba* (0,025); F2: 75ppm de nitrito de sódio e OE de *O. vulgare* (0,1%), *T. vulgaris* (0,1%) e *L. cubeba* (0,05%). Médias ±Desvio padrão. Valores seguidos por letras diferentes na coluna diferem entre si significativamente ($P<0,05$) pelo teste de Tukey.

3.4 Análise ultraestrutural

A ultraestrutura da superfície de mortadela e a morfologia de *C. difficile* após a exposição de 2 horas aos tratamentos são demonstrados pela micrografia eletrônica de varredura, como apresentado na Figura 3. É possível observar as estruturas de gorduras e/ou OE no controle negativo, já no controle positivo presencia-se grande crescimento de *C. difficile*, na F1 é possível identificar as células intactas, sem alterações morfológicas,

o mesmo ocorre com a F2, entretanto pode-se evidenciar maior crescimento destas que da F1 que apresentou células isoladas.

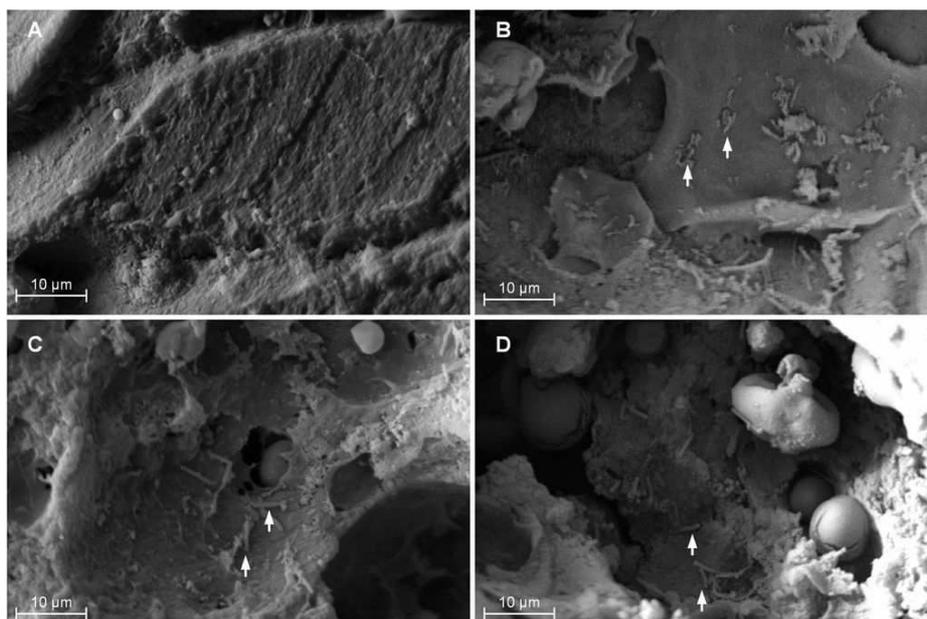


Figura 3 Micrografia eletrônica de varredura de mortadelas formuladas com redução de nitrito e óleos essenciais inoculadas com *C. difficile*. (A) Controle negativo; (B) Controle positivo; (C) F1: OE *O. vulgare* (0,2%), *T. vulgaris* (0,05%) e *L. cubeba* (0,025%); (D) F2: OE de *O. vulgare* (0,1%), *T. vulgaris* (0,1%) e *L. cubeba* (0,05%). As setas indicam as células de *C. difficile*

4 DISCUSSÃO

Principal componente dos OEs de *L. cubeba* é o limoneno, apresentando maior CMB analisada, seguida pelo OE de *S. aromaticum* (eugenol); *R. officinalis* (cineol), *C. Camphora* (linalol) e *F. vulgare*

(anetol), *M. Fragans* (α,β -pineno), *C. limon* (limoneno) e *M. piperita* (mentol), enquanto os OE mais eficazes foram o *T. vulgaris* (timol), *C. nobilis* (limoneno), seguido dos OE de *O. vulgare* (carvacrol), *C. zeylanicum* (aldeído cinâmico), *O. basilicum* (linalol), *L. cubeba* (citrál) e *P. anisum* (anetol), segundo o laudo cromatográfico disponibilizado pela indústria FERQUIMA.

Lambert et al. (2001) afirmam que a elevada atividade antimicrobiana dos OE sobre patógenos provavelmente se dá devido às altas porcentagens de compostos fenólicos como carvacrol, eugenol e timol, sendo isto retratado por alguns OE analisados, entretanto, sugere-se que a atividade antimicrobiana dos OE está relacionada principalmente ao seu composto majoritário, embora alguns autores mencionem a sinergia com os compostos minoritários (Bakkali et al., 2008; Burt, 2004; Tajkarimi et al., 2010).

A atividade antimicrobiana do *O. vulgare* é atribuída aos seus OE que contem terpenos como carvacrol e timol, o γ -terpinene e o p-cimeno que são precursores do timol e carvacrol, respectivamente, portanto, sua concentração no produto é proporcional aos teores de seus precursores (Burt, 2004). O óleo essencial de *O. vulgare* é constituído de 73,1% do composto majoritário carvacrol, além da presença de β -cariofileno, γ -terpineno, p-cimeno e Timol. Stefanakis et al. (2013) avaliou sete amostras de *O. vulgare* e observou que a atividade antibacteriana depende do tipo de erva, bem como sua composição, no entanto, o teor de componentes fenólicos dos óleos não são os únicos fatores que contribuem para sua atividade.

O óleo essencial de *T. vulgaris* apresenta elevada atividade antimicrobiana, sendo esta atribuída principalmente aos seus compostos fenólicos, timol e carvacrol, considerados ingredientes importantes para a indústria de alimentos, visto que todos proporcionaram inibição de várias espécies de bactérias (ROTA et al., 2008). O componente majoritário deste OE foi o timol contendo 50,9%, seguido do σ -cimeno, γ -terpineno, Linalol e Carvacrol. Grosso et al. (2008), afirma que os principais componentes dos OE podem constituir até 85%, e outros componentes são geralmente em níveis residuais.

Yang et al. (2014) e Wang; Liu (2010) encontraram resultados diferentes do identificado neste estudo quanto a cromatografia do OE de *L. cubeba*. Resultados diferentes podem ter sido devido a época da colheita e local, fatores climáticos e sazonais, bem como a duração de armazenamento (Yang et al., 2014).

Dimitrijević et al. (2007) destaca que OE de orégano, tomilho e alecrim estão entre os mais ativos antimicrobianos, e SI et al. (2009) estudaram o potencial de inibição de 66 OE e vários de seus componentes em *C. perfringens* tipo A, encontrando inibição de mais de 80%, sendo o timol e carvacrol os inibidores mais eficazes entre os testados pelos autores.

CMB dos óleos de *O. vulgare*, *T. vulgaris* e *L. cubeba* podem ter se diferido ao ser analisado em tubos de ensaio utilizando óleo mineral e tubos á vácuo diante do vestígio de oxigênio presentes no meio; visto a sensibilidade do *C. difficile* ao oxigênio (Hoover and Rodriguez-Palacios, 2013; Weese, 2010).

Quando o efeito combinado das substâncias é maior do que a soma dos efeitos individuais, isto é sinergia (Burt, 2004). Os efeitos sinérgicos de alguns compostos e OE foram representados em alguns estudos (Abdalla et al., 2007; Aleixo, G, 2013; Dias, 2011; Jayasena and Jo, 2013; Martins, 2013, 2014; Rodrigues, 2014; Rota et al., 2008), também sendo observado neste estudo, aonde as combinações dos óleos de *O. vulgare*, *T. vulgaris* e *L. cubeba* inibiram o crescimento de *C. difficile* em todas concentrações analisadas *in vitro*; as combinações de OE permite utilizar concentrações menores de óleos, conseguindo o duplo objetivo de reduzir impacto indesejável na qualidade sensorial e controlar crescimento microbiano.

Considerando a variabilidade de grupos de compostos químicos presentes nos OE, observa-se que sua atividade antibacteriana não é atribuída somente a um mecanismo específico, havendo diferentes alvos na célula microbiana (Carson et al., 2002). Vários compostos possuem atividade antibacteriana, interferindo na permeabilidade da membrana citoplasmática, atuando principalmente nas proteínas de membrana, causando perdas de constituintes celulares, prejudicando sistemas enzimáticos, inativando ou destruindo o material genético de bactérias, afetando diretamente a força próton motiva (Burt, 2004; Tajkarimi et al., 2010; Ultee and Smid, 2001; Ultee et al., 1999) e causando lise da parede celular (Oliveira et al., 2011), portanto, os OE agem causando danos estruturais e funcionais na membrana celular bacteriana (Goñi et al., 2009). Moreira et al. (2005), afirmam que os compostos fenólicos dos OE se ligam à bicamada fosfolipídica da membrana celular aumentando sua permeabilidade e extravasando os constituintes intracelulares ou

danificando o sistema enzimático da célula, enquanto Souza et al., (2010) relata que mesmo pequenas mudanças ocorridas na estrutura da membrana citoplasmática podem afetar o metabolismo, incluindo a síntese de macromoléculas (Ceylan and Fung, 2004). Os compostos lipofílicos encontrados nos OE são mais ativos em bactérias gram-positivas. No entanto, isto não significa que as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis sempre, como observado em alguns estudos em que as bactérias Gram-positivas têm sido menos ou igualmente sensíveis que bactérias Gram-negativas a OE (Bakkali et al., 2008; Burt, 2004; Oussalah et al., 2007; Pereira et al., 2014).

Alguns estudos tem demonstrado a eficiência da utilização de OE como antimicrobianos naturais e são considerados fontes potenciais de aditivos para a indústria de alimentos, inclusive para carnes e produtos cárneos (Bakkali et al., 2008; Burt, 2004; Dias, 2011; Emiroglu et al., 2010; Gutierrez et al., 2008; Jayasena and Jo, 2013; Liu and Yang, 2012; Oliveira et al., 2013; Rota et al., 2008; Tajkarimi et al., 2010; Viuda-Martos et al., 2010), sendo que o modelo alimentar mortadela utilizada em vários experimentos é um excelente meio para o crescimento de micro-organismos anaeróbios, apresenta grande quantidade de nutrientes, com quantidade considerável de carboidratos, umidade mínima exigida (A_w) e teor de proteínas que fornecem todos os aminoácidos essenciais necessários para o crescimento, além disso, fatores como temperatura de armazenamento e embalagem em atmosfera (reduzidas tensões de oxigênio) contribuem para o crescimento da população nas amostras controle (Oliveira et al., 2011), justificando a escolha quanto à mortadela

para análise in situ deste trabalho, e armazenadas a 25°C, temperatura em que muitas mortadelas são comercializadas.

Deans e Ritche (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% (Gutierrez et al., 2008), neste trabalho utilizou-se concentração final de OE na F1 de 2,75% e na F2 2,5% de combinações de OE.

Rota et al. (2008) sugeriram que OE de *Thymus hyemalis*, *T. zygis* e *T. vulgaris* possuem propriedades antimicrobianas e são considerados fontes potenciais de ingredientes para a indústria de alimentos, assim como orégano combinado com tomilho em doses baixas deve ser considerado como uma alternativa para o controle de agentes patogênicos (Gutierrez et al., 2008). Ismaiel e Pierson (2006) testaram os efeitos inibitórios de OE sobre cepas de *C. botulinum*, classificando os óleos testados em três categorias, muito ativo (canela, orégano e cravo), ativa (pimenta chinesa e tomilho) e menos ativa (alho, cebola e pimenta preta), entretanto a aplicação de antimicrobianos por diferentes análises demonstram diferenças notáveis (Goñi et al., 2009), o grande desafio é a determinação da concentração ideal que exerça, simultaneamente, efeito antimicrobiano, realçador de sabor e aroma dos alimentos para a utilização dos OE, em substituição aos aditivos sintéticos para alimentos.

Existem diferenças entre ensaios in vitro e in situ de antimicrobianos de origem vegetal (Tajkarimi et al., 2010), as aplicações

de OE em alimentos geralmente apresentam sua eficácia reduzida por certos componentes (Glass and Johnson, 2004; Jayasena and Jo, 2013). Em geral, supõe-se que elevados níveis de gordura e/ou proteínas presentes nos alimentos podem proteger as bactérias da ação dos OE, reduzindo a disponibilidade destes (Mejlholm and Dalgaard, 2002), já os carboidratos não parecem proteger as bactérias das ações de OE tanto quanto a gordura e as proteínas, entretanto elevada atividade de água e altas concentrações de sal facilitam a ação destes antimicrobianos (Tsigarida et al., 2000), podendo justificar os resultados encontrados neste trabalho, não sendo observado efeito antimicrobiano nas mortadelas devido ao uso de OE, e permitindo o crescimento de *C.difficile* durante sua estocagem. Burt (2004) afirma que para obter resultados semelhantes em uma matriz alimentar concentrações superiores de óleo essencial a partir de testes in vitro geralmente são geralmente necessários.

Segundo Mitchell (2001) a esporulação é iniciada, principalmente, em resposta à escassez de nutrientes, porém, outros fatores podem alterar a esporulação, como pH, oxigênio e temperatura, sendo favorecida em geral por condições que resultem em redução da taxa de crescimento, fato observado neste estudo com o aumento da esporulação de *C.difficile* durante o tempo de estocagem, e maior contagem de esporos em mortadelas adicionadas de OE, comparadas ao controle.

A maior perda do nitrito é observada durante a fabricação até o final do processo de aquecimento, a perda ocorre em cerca de 65%, e após 20 dias de estocagem a uma redução de um terço da concentração após o aquecimento (Honikel, 2008), efeito semelhante foi observado neste estudo havendo redução de 75% do nitrito inicial até o primeiro dia de

estocagem, com maior redução após o quinto dia, e pequena redução no final do armazenamento. Segundo Cassens (1997), após adicionar nitrito ao sistema cárneo, aproximadamente 1% a 10% são oxidados a nitrato, de 5% a 10% reagem 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 detectados após o processamento de produtos curados e este nível reduz gradualmente com o armazenamento.

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), fato observado neste trabalho que ao final do décimo quinto dia apresentava 5,11 de nitrito residual, entretanto, o tratamento F1, que continha maior quantidade de OE de orégano apresentou nitrito residual final de 10,23, sendo superior ao observado na amostra controle. Em trabalho realizado por Dias (2011) foi observado que mortadelas contendo OE tiveram maior concentração de nitrito residual que as demais e, conseqüentemente melhor efeito antibacteriano durante 20 dias armazenamento, entretanto, Viuda-Martos et al., (2010), observaram que as amostras de mortadelas adicionadas de fibras de

laranja e óleo essencial de tomilho (0,02%) e alecrim (0,02%) reduziram a concentração de nitrito residual em relação ao controle.

CONCLUSÃO

Houve efeito sinérgico da combinação dos OE de *O. vulgare*, *T. vulgaris* e *L. cubeba in vitro*, entretanto suas combinações não foram eficientes para inibir o crescimento de *C. difficile* em mortadelas, contudo, o tratamento F1 elaboradas com a combinação dos OE de *O. vulgare* (0,2%), *T. vulgaris* (0,05%) e *L. cubeba* (0,025%); apresentou maior concentração de nitrito residual no final da estocagem, além de apresentar células isoladas em micrografias e maior esporulação, comparada ao controle.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Abdalla, A.E.M., Darwish, S.M., Ayad, E.H.E., El-Hamahmy, R.M., 2007. Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. *Food Chem.* 103, 1141–1152. doi:10.1016/j.foodchem.2006.10.026
- Adams, R.P., 2007. Adams, R. P. (2007). Identification of essential oils components by gás chromatography/quadrupole mass spectroscopy (4th ed.). Carol Stream: Allured. 2007.
- Aleixo, G. C., 2013. Efeito dos óleos essenciais e compostos majoritários sobre endósporos de *Clostridium botulinum* inoculados em mortadela. 2013. 58p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Alves, E., 2004. Introdução à microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Lavras: UFLA- FAEPE.
- AOAC, 1995. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC international. Virginia, 1995. v.16.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- 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 1998.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

- Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T. V, 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother* 46, 1914–1920. doi:10.1128/AAC.46.6.1914
- Cassens, R.G., 1997. Residual nitrite in cured meat. *Food Technol.* 51, 53–55.
- Ceylan, E., Fung, D.Y.C., 2004. Antimicrobial activity of spices. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* 12, 2004.
- Deans, S.G., Ritche, G., 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 5, 165–180.
- Deng, K., Plaza-Garrido, A., Torres, J.A., Paredes-Sabja, D., 2015. Survival of *Clostridium difficile* spores at low temperatures. *Food Microbiol.* 46, 218–21. doi:10.1016/j.fm.2014.07.022
- Dias, N.A.A., 2011. Avaliações microbiológica e físico-química de mortadelas elaboradas com óleos essenciais e inoculados com *Clostridium perfringens* tipo A . 2011. 111p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Dimitrijević, S.I., Mihajlovski, K.R., Antonović, D.G., Milanović-Stevanović, M.R., Mijin, D.Ž., 2007. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officianlis* L. and *Origanum vulgare* L. *Food Chem.* 104, 774–782. doi:10.1016/j.foodchem.2006.12.028
- Dutra, M.P., Ramos, E.M., Cardoso, G.P., Leal, A.S., 2011. Radiação gama e tempo de armazenamento sobre a oxidação lipídica , cor objetiva , pigmentos heme e nitrito residual de mortadelas elaboradas com diferentes níveis de nitrito. *Ciência Rural* 1–7.

- Emiroglu, Z.K., YEMIS, G.P., COSKUN, B.K., CANDOGAN, K., 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Sci.* 86, 283–288.
- Feiner, G., 2006. *Meat products handbook practical science and technology*. Boca Raton: CRC, 2006. p. 627.
- Francis, F.J., 2000. *Encyclopedia of food science and technology*. New York: J. Wiley, 2000.
- Glass, K.A., Johnson, E.A., 2004. Antagonistic effect of fat on the antibotulinal activity of food preservatives and fatty acids. *Food Microbiol.* 21, 675–682. doi:10.1016/j.fm.2004.03.002
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., Nerín, C., 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem.* 116, 982–989. doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.058
- Grosso, C., Ferraro, V., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Coelho, J.A., Palavra, A.M., 2008. Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds. *Food Chem.* 111, 197–203.
- Gutierrez, J., Barry-ryan, C., Bourke, P., 2008. The anti-microbial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Sch. Food Sci. Environ. Heal.* 124, 0–34.
- Honikel, K.-O., 2008. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Sci.* 78, 68–76. doi:10.1016/j.meatsci.2007.05.030
- Hoover, D.G., Rodriguez-Palacios, A., 2013. Transmission of *Clostridium difficile* in foods. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 27, 675–85. doi:10.1016/j.idc.2013.05.004

- Ismaiel, A.A., Pierson, M.D., 2006. Inhibition of growth and germination of *C. botulinum* 33 A, 40 B e 1623E by essential oil spices. *J. Food Sci.* 55, 1676–1678.
- Jayasena, D.D., Jo, C., 2013. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 34, 96–108. doi:10.1016/j.tifs.2013.09.002
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.-J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91, 453–462. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x
- Liu, T.-T., Yang, T.-S., 2012. Antimicrobial impact of the components of essential oil of *Litsea cubeba* from Taiwan and antimicrobial activity of the oil in food systems. *Int. J. Food Microbiol.* 156, 68–75. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.005
- Loo, V., Oughton, M., Libman, M.D., Michaud, S., Bourgault, A., Nguyen, T., Frenette, C., Kelly, M., Vibien, A., Brassard, P., Fenn, S., Dewar, K., Hudson, T.J., Horn, R., René, P., Monczak, Y., Dascal, A., 2005. A Predominantly Clonal Multi-Institutional Outbreak of. *N. Engl. J. Med.* 353, 2442–2449.
- Martins, A.P., 2013. Atividade de antimicrobianos naturais sobre endósporos de *Clostridium perfringens* em mortadelas . 2013. 123p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Martins, H.H. de A., 2014. Atividade de combinações de óleos essenciais sobre *Clostridium perfringens* tipo a inoculadas em mortadela. 2014. 52p. Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Mejlholm, O., Dalgaard, P., 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 27–31.

- Mitchell, W.J., 2001. General biology and physiology. In: BAHL, H.; DÜRRE, P. Clostridia: biotechnology and medical applications. New York: J. Wiley.
- Moreira, M.R., Ponce, a. ., del Valle, C.E., Roura, S.I., 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. LWT - Food Sci. Technol. 38, 565–570. doi:10.1016/j.lwt.2004.07.012
- Oliveira, T.L.C. de, Malfitano de Carvalho, S., de Araújo Soares, R., Andrade, M.A., Cardoso, M.D.G., Ramos, E.M., Piccoli, R.H., 2012. Antioxidant effects of *Satureja montana* L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. LWT - Food Sci. Technol. 45, 204–212. doi:10.1016/j.lwt.2011.09.006
- Oliveira, T.L.C., Soares, R. de A., Ramos, E.M., Cardoso, M. das G., Alves, E., Piccoli, R.H., 2011. 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. Int. J. Food Microbiol. 144, 546–555. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.022
- Oliveira, T.L.C., Soares, R.D.A., Piccoli, R.H., 2013. A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. Meat Sci. 93, 645–51. doi:10.1016/j.meatsci.2012.11.004
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M., 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* 18, 414–420. doi:10.1016/j.foodcont.2005.11.009
- Paredes-Sabja, D., Sarker, M.R., 2011. Germination response of spores of the pathogenic bacterium *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* to cultured human epithelial cells. Anaerobe 17, 78–84. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.02.001

- Pereira, A.D., Piccoli, R.H., Batista, N.N., Camargos, N.G., Oliveira, M.M.M., 2014. Thermochemical inactivation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Enteritidis by essential oils. *Ciência Rural* 44, 2022–2028.
- Rodrigues, L.T. de S., 2014. RODRIGUES, L. T. de S. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre *Clostridium botulinum* inoculado em mortadelas. 2014. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 98.
- Rodriguez-Palacios, A., STAEMPFLI, H., DUFFIELD, T., WEESE, J., 2007. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 485–487.
- Rodríguez-Pardo, D., Mirelis, B., Navarro, F., 2013. Infections caused by *Clostridium difficile*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 31, 254–63. doi:10.1016/j.eimc.2012.12.010
- Rota, M.C., Herrera, A., Martínez, R.M., Sotomayor, J. a., Jordán, M.J., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* 19, 681–687. doi:10.1016/j.foodcont.2007.07.007
- Rywotycki, R., 2002. The effect of selected functional additives and heat treatment on nitrosamine content in pasteurized pork ham 60, 335–339.
- Sangwan, N.S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F., Sangwan, R.S., 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul.* 34, 3–21.
- Scott, V.N., Anderson, J.E., Wang, G., 2001. Mesophilic anaerobic sporeformers, In: Downes, F.P., Ito, K. (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4 ed. American Public Health Association, Washington, pp. 325–330 (chap. 34).

- Shelef, L.A., 1984. Antimicrobial effects of spices. *J. Food Saf.* 6, 1984.
- Si, W., Ni, X., Gong, J., Yu, H., Tsao, R., Han, Y., Chambers, J.R., 2009. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards *Clostridium perfringens* 106, 213–220. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03994.x
- Souza, E.L., Barros, J.C., Oliveira, C.E.V., Conceição, M.L., 2010. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 308–11. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.025
- Stefanakis, M.K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H.E., Makridis, P., 2013. Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control* 34, 539–546. doi:10.1016/j.foodcont.2013.05.024
- Sunenshine, R.H., McDonald, L., 2006. *Clostridium difficile* -associated disease: New challenges from an established pathogen. *Cleve. Clin. J. Med.* 73, 187–197.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S. a., Cliver, D.O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21, 1199–1218. doi:10.1016/j.foodcont.2010.02.003
- Toldrá, F., 2010. Handbook of meat processing. Boston: Editorial Office, 2010. 584 p.
- Tsigarida, E., Skandamis, P., Nychas, G.E., 2000. 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. *J. Appl. Microbiol.* 89, 901–909.
- Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J., 1999. Mechanisms of Action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4606–4610.

- Ultee, A., Smid, E.J., 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 373–378. doi:10.1016/S0168-1605(00)00480-3
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., 2010. Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of mortadella. *Meat Sci.* 85, 568–576. doi:10.1016/j.meatsci.2010.03.007
- Wang, H., Liu, Y., 2010. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from Different Parts of *Litsea cubeba*. *Chem. e Biodivers.* 7, 229–235.
- Weese, J.S., 2010. *Clostridium difficile* in food-innocent bystander or serious threat? *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 3–10. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03108.x
- Yang, K., Wang, C.F., You, C.X., Geng, Z.F., Sun, R.Q., Guo, S.S., Du, S.S., Liu, Z.L., Deng, Z.W., 2014. Bioactivity of essential oil of *Litsea cubeba* from China and its main compounds against two stored product insects. *J. Asia. Pac. Entomol.* 17, 459–466. doi:10.1016/j.aspen.2014.03.011

Artigo 2

Normas da Revista científica
“LWT – Food Science and Technology” (versão preliminar)

**Caracterização tecnológica e sensorial de mortadela adicionada de
óleos essenciais**

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos da combinação de óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e *Litsea cubeba* sobre as características tecnológicas e sensoriais de mortadelas armazenadas a 25°C durante 15 dias. Foram elaboradas mortadelas controle com 75ppm de nitrito; para F1 adicionou-se a combinação dos OE de *O. vulgare* (0,2%), *T. vulgaris* (0,05%) e *L. cubeba* (0,025%); para F2 foi adicionada as concentrações de OE de *O. vulgare* (0,1%), *T. vulgaris* (0,1%) e *L. cubeba* (0,05%). A oxidação lipídica foi avaliada pela mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, os índices de cores utilizando o sistema de cor CIELAB, para análise do perfil de textura utilizou-se texturômetro TA.XT2i e as características sensoriais das mortadelas foram avaliadas utilizando o teste de Comparação Múltipla. Houve maior oxidação lipídica ($P < 0,05$) em mortadelas controle, não sendo observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) de oxidação em mortadelas adicionadas de OE durante todo o armazenamento; A adição de OE não influenciou a cor ($P > 0,05$) das mortadelas, quanto à textura reduziram a dureza e mastigabilidade durante o tempo de armazenamento com aumento da adesividade ($P < 0,05$). Ao aplicar o teste de comparação múltipla a cor não foi diferida da amostra controle, e o atributo mais afetado pelos OE foi o sabor, que implicaram em baixa aceitação do produto.

Palavras-chave: Antioxidante natural. Teste de Comparação Múltipla. Nitrito de sódio

1 INTRODUÇÃO

Produtos a base de carne são amplamente consumidos, dentre eles destacam-se a mortadela. Cujo um dos principais ingredientes está a figura do nitrito, que apresentam como finalidades básicas conferir a cor rósea e sabor característicos de produtos curados, prevenir alterações

desagradáveis oriundos da rancidez oxidativa dos lipídios e atuar como conservante, principalmente contra o crescimento e a produção de toxina do *Clostridium botulinum* (Cassens, 1997; Feiner, 2006; Toldrá, 2010). Entretanto, a alta ingestão de nitrito apresenta riscos à saúde, incluindo efeitos alérgicos, vasodilatadores (Cammack et al., 1999) e formação de compostos N-nitrosos, em especial as nitrosaminas, que possuem efeito tóxico, mutagênico, neuro, nefrotóxico e carcinogênicos (Francis, 2000; Rywotycki, 2002).

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) (ORDÓÑEZ et al., 2005), entretanto, 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). Os consumidores estão cada vez mais exigentes quanto ao consumo de alimentos seguros e de alta qualidade, visto que a segurança dos aditivos sintéticos está sendo questionadas, havendo cada vez mais recusa em relação ao uso de conservantes químicos e antimicrobianos artificiais (Tajkarimi, Ibrahim, & Cliver, 2010), aumentando a demanda por alimentos naturais que melhoram a qualidade da carne e produtos cárneos sem deixar resíduos no produto ou ambiente (Jayasena & Jo, 2013). Sendo assim, pesquisas são realizadas em busca de compostos naturais que podem atuar como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e diminuir o uso dos antioxidantes sintéticos, prolongando a vida útil de vários alimentos (Ramalho & Jorge, 2006).

Os óleos essenciais tem atraído a atenção de vários pesquisadores, devido ao potencial antioxidante, antimicrobiano, flavorizante, aromático, antisséptico, carminativo, antiespasmódico e expectorante (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008; Burt, 2004; Oliveira et al., 2012; Oussalah, Caillet, Saucier, & Lacroix, 2007; Pereira, Piccoli, Batista, Camargos, & Oliveira, 2014; Sangwan, Farooqi, Shabih, & Sangwan, 2001; Tajkarimi et al., 2010), para tanto, alguns componentes já apresentam registros pela Comissão Européia para utilização como aromatizante em gêneros alimentícios, sendo seguro a saúde do consumidor (*Comission Decision of 23 January, 2009*). Muitos trabalhos confirmam a capacidade antioxidante de óleos essenciais, sendo constatada inclusive em carnes e produtos cárneos (Abdalla, Darwish, Ayad, & El-Hamahmy, 2007; Bakkali et al., 2008; Castilho, Savluchinske-Feio, Weinhold, & Gouveia, 2012; Hwang, Choi, & Lee, 2005; Oliveira et al., 2012; Viuda-Martos, Ruiz-Navajas, Fernández-López, & Pérez-Álvarez, 2010; Ye, Dai, & Hu, 2013).

Deans e Ritche (1987) afirmam que a substituição de aditivos sintéticos por naturais, dependerá fundamentalmente da determinação de uma concentração ideal, que apresente efeito antimicrobiano, antioxidante e a aceitação do produto sobre o impacto sensorial.

Diante disto, este trabalho objetivou avaliar os efeitos da combinação de óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e *Litsea cubeba* sobre as características tecnológicas e sensoriais de mortadelas armazenadas a 25°C durante 15 dias.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE) de *Litsea cubeba* (pimenta chinesa), *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho) foram adquiridos da empresa FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda, Brasil.

2.2 Elaboração da mortadela

As mortadelas foram elaboradas no Laboratório de Tecnologia de Carnes e Derivados, DCA/UFLA.

Utilizou-se a formulação típica de mortadela brasileira, segundo Dutra et al. (2011): A carne bovina (58,5%) previamente moída foi adicionada ao *cutter*, seguida de cloreto de sódio (1,9%), polifosfato Fosmax (0,3%, New Max Industrial, Brasil), nitrito de sódio (0,0075%), ácido ascórbico (0,05%), água/gelo (20%), fécula de mandioca (5%) e toucinho (14%), respectivamente.

Todos tratamentos foram elaborados utilizando 75ppm de NaNO_2 , visando a utilização conjunta com a combinação de OE baseados em ensaios microbiológicos *in vitro*, realizados no artigo 1. O controle (C) foi elaborado, apenas com os ingredientes descritos; para formulação 1 (F1) adicionou-se a combinação dos OE de *O. vulgare* (0,2%), *T. vulgaris* (0,05%) e *L. cubeba* (0,025%); para formulação 2 (F2) foi adicionada as concentrações de OE de *O. vulgare* (0,1%), *T. vulgaris* (0,1%) e *L. cubeba* (0,05%),

Após completa emulsificação a massa foi embutida em tripa sintética (CALEBRE, 67 mm, empresa Shur) e cozidas em banho-maria, até temperatura final de 73^oC no ponto frio da amostra, monitorado com uso de termômetro. Após o cozimento as mortadelas foram mantidas em banho-de-gelo por 20 min e armazenadas sob refrigeração a 4^oC durante 12 horas.

As amostras foram separadas em fatias de aproximadamente 100g e seladas a vácuo em embalagens plásticas. Todas as amostras foram armazenadas em estufa tipo BOD a 25^oC e retiradas para análise nos tempos 1, 5, 10 e 15 dias. Todas as análises foram realizadas em três repetições no tempo e em triplicata.

2.3 Análises tecnológicas e sensoriais

2.3.1 Oxidação lipídica

O efeito dos OE tratamentos sobre a oxidação lipídica da mortadela foi avaliada pela mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), seguindo a metodologia de Raharjo, Sofos, & Schmidt (1992), com algumas modificações. Porções de 10g de mortadelas foram combinadas com 40 mL de ácido tricloroacético a 5% (TCA) e 1 mL de antioxidante BHT 0,15% (em etanol) e homogeneizadas, por 1 minuto em Politron. O homogenizado foi centrifugado (3000 rpm/2min) e filtrado em filtro de papel, o volume foi ajustado em balão volumétrico para 50 mL com TCA 5%. Alíquotas de 2 mL foram retiradas, e combinadas com reagente de TBA 0,08mol/L, homogeneizadas e submetidas a banho-maria fervente (100±5^oC) por 10

min. Após resfriar em água foi conduzida a leitura da absorbância a 532 nm e os valores de TBARS foram expressos em miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra (mg de MAD/kg), calculado a partir da curva analítica com 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), fator de conversão=8,93.

2.3.2 Análise da cor objetiva

A cor das mortadelas foram mensuradas por colorímetro espectrofotométrico CM-700 (Konica Minolta, Osaka, Japão). Para o cálculo dos índices de cor, foi estabelecido o ângulo do observador de 10°, iluminante D65, modo componente especular excluído (SCE). Os índices de cores foram avaliados no sistema de cor CIELAB - luminosidade (L^*), índice de vermelho (a^*) e índice de amarelo (b^*) - considerando-se o valor médio de três leituras realizadas em diferentes pontos nas fatias de mortadela. Estas foram partidas ao meio para garantir a leitura da cor no interior do produto, visto que estavam em contato com embalagens plásticas. A saturação (C^*) e o ângulo de tonalidade (h^*) foram calculados da seguinte forma, $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$; e $h^* = \arctg(b^*/a^*)$. Para acompanhar as mudanças de cor nas amostras, avaliou-se o índice de descoloração (*fading*), utilizando as razões de reflectâncias 650/570nm (Ramos & Gomide, 2009).

2.3.3 Análise perfil de textura

A Análise do Perfil de Textura (TPA) das mortadelas foi conduzida segundo Jorge et al. (2015), utilizando um texturômetro TA.XT2i (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, England). Cinco amostras

(cubos com 1 mm de arestas) foram obtidas e comprimidas duas vezes até 50% de seu tamanho, à temperatura ambiente, com uma probe cilíndrica de compressão plana de alumínio (36 mm de diâmetro). Não houve tempo de repouso entre os dois ciclos de compressão. A curva de deformação com o tempo foi obtida a uma velocidade de compressão de 200 mm/minuto (3,33 mm/s), a partir da qual foram obtidas cinco características de textura: Dureza; coesividade; adesividade; flexibilidade e mastigabilidade (Ramos, & Gomide, 2009). A TPA foi analisada no primeiro e último dia de armazenamento.

2.3.4 Avaliação sensorial

As características sensoriais das mortadelas foram avaliadas utilizando o teste de Comparação Múltipla, segundo a metodologia descrita por Dutra et al. (2012) e Meilgaard et al. (1999), por 50 provadores não treinados e consumidores de mortadela.

Foram servidas aos provadores a amostra padrão designada como P, semelhante a controle, seguida das amostras codificadas e servidas de forma balanceada (C, F1, F2) de aproximadamente 10g. Foi solicitado que o provador comparasse cada amostra com a amostra padrão e avaliasse o grau de diferença quanto aos atributos cor, sabor e textura, de acordo com a escala de diferença (0 = nenhuma diferença do Padrão; 1 = Diferença muito ligeira; 2 = Diferença ligeira/moderada; 3 = Diferença moderada; 4 = Diferença moderada/grande; 5 = Diferença grande; 6 = Diferença muito grande da padrão). Em seguida, com teste de aceitação, os provadores aplicaram uma nota em relação ao aspecto impressão global de acordo com a escala de 9 pontos (em que 1 corresponde ao

desgostei extremamente, 5 nem gostei/nem desgostei e 9 gostei extremamente).

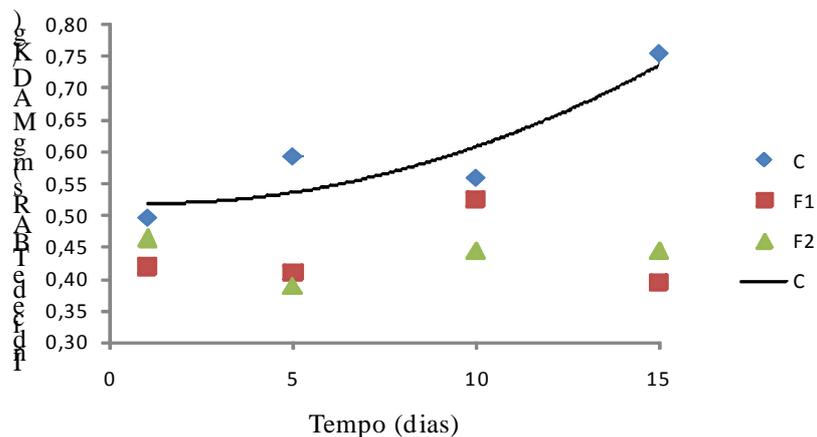
2.4 Análise estatística

O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3x4, sendo três tratamentos em quatro tempos de armazenamento com três repetições em triplicata. Foram realizadas análises de regressão no tempo para cada tratamento. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias das análises físico-químicas e sensoriais foram estabelecidas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software STATISTICA versão 5.0, da STATSOFT. Todos os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicata.

3 RESULTADOS

3.2 Efeitos dos tratamentos sobre as mortadelas

A oxidação lipídica apresentou interação significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos e os dias de armazenamento das mortadelas (Figura 1). No primeiro dia de estocagem não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos, entretanto no decorrer dos dias constatou-se maior oxidação lipídica ($P < 0,05$) na amostra controle, comparada com as amostras contendo combinações de OE, que mantiveram sem alterações ($P > 0,05$) na oxidação lipídica durante todo o período de armazenamento.



C: 75ppm de nitrito de sódio; F1: 75ppm de nitrito de sódio e OE de *O. vulgare* (0,2%), *T. vulgaris* (0,05%) e *L. cubeba* (0,025); F2:75ppm de nitrito de sódio e OE de *O. vulgare* (0,1%), *T. vulgaris* (0,1%) e *L. cubeba* (0,05%). Equações para C: $y=0,001x^2 - 0,002x + 0,519$ ($R^2=0,82$); F1: $y=0,430$; F2: $y=0,432$.

Figura 1 Índices de TBARS de mortadelas elaboradas com teor reduzido de nitrito adicionadas de óleos essenciais armazenadas a 25°C durante 15 dias.

Não foi observada interação significativa ($P>0,05$) entre tratamento e tempo quanto aos parâmetros de cor das mortadelas durante todo o armazenamento, demonstrando que a adição de OE não interferiu na cor das mortadelas, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 Índice de luminosidade (L*), vermelho (a*), amarelo (b*), saturação (C*), ângulo de tonalidade (h*) e índice de descoloração em mortadelas elaboradas com teor reduzido de nitrito de sódio e óleos essenciais armazenadas a 25°C durante 15 dias

Amostras	L*	a*	b*	C*	h*	Fading
C	57,92 ±1,41	10,72 ±0,47	14,32 ±0,80	17,94 ±0,69	52,94 ±1,99	2,12 ±0,35
F1	57,24 ±1,17	11,76 ±0,75	14,40 ±0,47	18,68 ±0,73	50,96 ±1,52	2,23 ±0,39
F2	57,22 ±1,95	11,49 ±0,42	14,52 ±0,90	18,52 ±0,92	51,59 ±1,14	2,23 ±0,33
Média	57,46	11,32	14,41	18,38	51,83	2,19

C: 75ppm de nitrito de sódio; F1: 75ppm de nitrito de sódio e OE de *O. vulgare* (0,2%), *T. vulgaris* (0,05%) e *L. cubeba* (0,025); F2:75ppm de nitrito de sódio e OE de *O. vulgare* (0,1%), *T. vulgaris* (0,1%) e *L. cubeba* (0,05%).. Médias ±Desvio padrão. Valores seguidos por letras diferentes na coluna diferem entre si significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Ao analisar a textura de mortadelas foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) no tempo de armazenamento com redução da dureza e mastigabilidade, e aumento da adesividade das mortadelas durante sua estocagem, contudo a coesividade e flexibilidade mantiveram-se sem efeito adicional ($P > 0,05$), como observado na Tabela 2.

Tabela 2 Análise de textura de mortadelas elaboradas com teor reduzido de nitrito de sódio e adição de óleos essenciais armazenadas a 25°C durante 15 dias

Parâmetro	Tempo (dias)		P < F
	1	15	
Dureza (N)	15,84 ± 6,01	12,02 ± 2,69	0,013
Coabilidade	0,71 ± 0,23	0,67 ± 0,08	0,239
Adesividade (N*mm)	0,06 ± 0,05	0,13 ± 0,07	0,037
Flexibilidade (mm)	4,41 ± 1,43	4,35 ± 0,46	0,734
Mastigabilidade (N*mm)	49,28 ± 18,74	36,20 ± 12,17	0,035

Médias ± Desvio padrão.

3.2 Análise sensorial de mortadelas

A maioria dos julgadores foram do sexo feminino (56%); 92% apresentando entre 18 e 30 anos de idade e 8% entre 31 e 45 anos; 50% relataram consumir mortadelas uma vez por semana, 34% uma vez ao mês e 16% três vezes ao ano.

Dentre os atributos sensoriais avaliados, a cor foi o que não diferiu ($P > 0,05$) do tratamento controle, indicando que a presença de OE não altera a cor da mortadela. Para a textura, os tratamentos F1 e F2 possuíram a mesma diferença em relação ao controle, entre ligeira a moderada. O sabor foi duramente afetado pela presença de óleo essencial em ambos os tratamentos, exibindo diferença entre grande a muito grande, o que refletiu na aceitação dos mesmos, nos quais os provadores desgostaram ligeiramente a moderadamente. Portanto, foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os atributos textura, sabor e impressão global entre a amostra controle e os tratamentos F1 e F2. Entretanto, estas amostras não se diferiram entre si (Tabela 3).

Tabela 3 Teste de diferença* e aceitação** sensorial de mortadelas com teor reduzido de nitrito de sódio adicionadas de combinações de óleos essenciais

Tratamentos	Cor*	Textura*	Sabor*	Impressão global**
C	0,86	1,42 ^a	2,16 ^a	6,36 ^a
F1	1,24	2,82 ^b	5,36 ^b	3,12 ^b
F2	1,1	2,82 ^b	5,28 ^b	3,06 ^b

*0 = nenhuma diferença do Padrão; 3 = Diferença moderada; 6 = Diferença muito grande da padrão. **1= desgostei extremamente; 5 = nem gostei/nem desgostei; 9 = gostei extremamente. C: 75ppm de nitrito de sódio; F1: 75ppm de nitrito de sódio e OE de *O. vulgare* (0,2%), *T. vulgaris* (0,05%) e *L. cubeba* (0,025); F2:75ppm de nitrito de sódio e OE de *O. vulgare* (0,1%), *T. vulgaris* (0,1%) e *L. cubeba* (0,05%). Valores seguidos por letras diferentes na coluna diferem entre si significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

4 DISCUSSÃO

O nitrito é capaz de retardar ou inibir reações de oxidação. Sua atividade antioxidante é baseada na formação de compostos estáveis entre pigmentos heme e nitrito (oxidante), sendo necessários cerca de 20 a 60 ppm de nitrito para que este atue como antioxidante (Pegg & Shahid, 2000). Neste estudo observou-se aumento da oxidação lipídica durante o período de armazenamento de mortadelas elaboradas com 75 ppm de nitrito de sódio. Contudo em estudos realizados por Oliveira et al. (2012), utilizando esta mesma metodologia, observou-se em mortadelas sem adição de nitrito valores muito superiores de mg de malonaldeído por Kg.

Neste trabalho, não foi observada aumento da oxidação lipídica dos tratamentos de mortadelas contendo OE. Muitos trabalhos confirmam a capacidade antioxidante de OE, sendo constatada inclusive em carnes e

produtos cárneos (Abdalla et al., 2007; Bakkali et al., 2008; Castilho et al., 2012; Hwang et al., 2005; Oliveira et al., 2012; Viuda-Martos et al., 2010; Ye et al., 2013). Os terpenos presentes no OE de *O. vulgare* possuem 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, Peltoketo, Hiltunen, & Tikkanen, 2003). Lee et al. (2005) encontraram no OE das folhas de manjerição 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. Enquanto Hwang et al. (2005) afirma ter efeito antioxidante no OE de pimenta chinesa. Castilho et al., (2012), relata que os OEs tem maior capacidade de eliminação de radicais livres do que os extratos mais polares, provavelmente devido aos elevados teores em timol, que demonstraram maior atividade antioxidante, entretanto, Guerra e Lajolo (2005) observaram que os compostos apolares são mais eficientes em baixas atividade de água tendo a sua ação diminuída com o aumento da água do sistema, já com os compostos polares ocorre o inverso. Vários autores afirmam que a atividade antioxidante de compostos fenólicos está relacionada com os grupos hidroxil ligados ao anel aromático, que são capazes de doar átomos de hidrogênio e estabilizar radicais livres, seqüestrando-os (Baydar, Sağdıç, Özkan, & Karadoğan, 2004; Dorman et al., 2003).

Oliveira et al. (2012) analisaram as variações no índice de TBARs em modelo alimentar do tipo mortadela contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *Satureja montana* L. e doses de nitrito,

em função do tempo de estocagem. Estes autores afirmam 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.

Em produtos emulsionados, a textura é dependente da estabilidade da emulsão, isto é, a interface água-gordura (Dutra et al., 2012), neste estudo a textura não foi afetada pela adição de OE nas mortadelas, visto que as alterações observadas foram proporcionadas pelo tempo de armazenamento e não pela diferença entre os tratamentos. Os parâmetros mais afetados foram à redução da dureza e mastigabilidade. Estes dois atributos estão relacionados, uma vez que mastigabilidade é definido como o produto de dureza, coesividade e elasticidade (Ramos & Gomide, 2009). Pietrasik (1999) relataram que a dureza da salsichas, em geral, diminui com o aumento dos níveis de gordura e umidade e com a redução do teor de proteína, o que pode ter ocorrido neste estudo durante o tempo de armazenamento. Entretanto, diferente deste estudo, Viuda-Martos et al. (2010) observaram aumento da dureza e mastigabilidade e redução da flexibilidade em mortadelas elaboradas com adição de óleo essencial e fibras de laranja. Dong et al. (2007) observou que a textura de salsicha com diferentes adições de nitrito de sódio não se diferiram, e os avaliadores não identificaram diferenças entre eles, confirmando que a quantidade de nitrito de sódio adicionada as mortadelas neste trabalho não alteraram a textura do produto.

A cor dos produtos curados são de extrema importância para aceitação do produto. Para Brewer, Zhu, Bidner, Meisinger, & Mckeith (2001) a luminosidade é o parâmetro que melhor informa a intensidade

visual da cor rósea, e segundo Garcia-Esteban, Ansorena, Gimeno, & Astiasara (2003) os valores de a^* representam o aspecto mais importante da cor. Pietrasik (1999), confirma que a cor dominante de produtos curados é o vermelho, e a diferença entre os valores de a^* podem ser considerados como de maior impacto sobre a cor do produto.

Não foram observadas alterações quanto à cor neste estudo, possivelmente devido as concentrações de OE utilizadas, não interferindo nas características do produto. Entretanto, Oliveira et al. (2012) observou alterações indesejáveis nos parâmetros de cor em mortadelas adicionadas de OE de *S. montana* e afirma que mortadelas elaboradas com nitrito de sódio apresentam índice de a^* superiores a sem nitrito, o que é esperado visto que este apresenta como finalidades básicas conferir a cor rósea e o sabor característicos de produtos curados (CASSENS, 1997; FEINER, 2006; TOLDRÁ, 2010).

Em estudos com o objetivo de reduzir o nível de nitrito utilizado na produção de salsicha, Jafari & Emam-Djomeh (2007) descobriram que os índices de cor L^* , a^* e b^* não apresentaram diferenças em amostras fabricadas com 50 e 120 mg/kg de nitrito de sódio, e os autores relatam que 50 mg/kg de nitrito parece ser suficiente para desenvolver a coloração, sabor e redução da oxidação lipídica do produto, mas concentrações mais elevadas são necessárias para a estabilidade microbiológica. O que é justificado por Feiner (2006) que afirma que 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. Estudos realizados pela Al-Shuibi e Al-Abdullah (2002) avaliaram os aspectos sensoriais de cor em mortadela produzida com diferentes níveis de nitrito de sódio substituído por sorbato de sódio; os autores relataram que os comentários dos membros do painel na cor não diferiram significativamente entre mortadelas produzidas com 120 e 40 mg/kg de nitrito. Corroborando com este trabalho, pois a utilização de 75ppm de nitrito de sódio foi suficiente para dar a característica de produto curado a mortadela.

Confirmando os resultados obtidos na cor objetiva os provadores também não identificaram diferenças entre a amostra controle e as adicionadas de OE, provando que o OE realmente não interferiu na cor do produto.

Foi observada diferença ligeira a moderada da amostra controle comparada a padrão de referencia quanto aos atributos avaliados, isto pode ser consequência de interferência sensoriais dos próprios provadores assim como das outras amostras, visto que essas amostras eram idênticas. Entretanto, não se observou diferença entre os tratamentos F1 e F2 contendo OE, caracterizando que mesmo variando as concentrações de OE entre as formulações de mortadelas, estas não interferiram no efeito sensorial.

O sabor das mortadelas adicionadas de combinações de OE foi o atributo mais afetado, com diferença “grande a muito grande” (nota 5 a 6) quando comparadas ao padrão, visto que estas apresentam combinações de OE de orégano, tomilho e pimenta chinesa que conferem diferenças ao produto, principalmente quanto ao sabor. Quando submetidas ao teste de aceitação estas foram desgostadas ligeiramente/moderadamente (nota 3).

Busatta et al. (2008) utilizaram o método de diferença de controle para analisar salsichas elaboradas com diferentes concentrações de OE de *Origanum majorana*, detectando diferenças significativas comparadas com o padrão. A aplicação de OE é parcialmente limitada devido as características marcantes que podem causar efeitos sensoriais negativos (Jayasena & Jo, 2013), sendo a aceitação inversamente relacionado com a concentração do óleo essencial utilizado (Busatta et al., 2008). As novas tecnologias, como encapsulamento de OE em nanoemulsões e a utilização de OE combinado com outros aditivos pode ser uma alternativa para este problema encontrado.

CONCLUSÃO

Os óleos essenciais adicionados as mortadelas apresentaram características antioxidantes, evitando a oxidação lipídica do produto, não interferindo negativamente na cor deste, entretanto, doses menores de OE são requeridos para a aplicação em produtos quanto ao atributo sabor.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Abdalla, A. E. M., Darwish, S. M., Ayad, E. H. E., & El-Hamahmy, R. M. (2007). Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. *Food Chemistry*, *103*(4), 1141–1152. doi:10.1016/j.foodchem.2006.10.026
2. Almeida-Doria, R. F., & Regitano-D'arce, M. A. B. (2000). Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, *20*(2), 197–203.
3. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, *46*, 446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
4. Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G., & Karadoğan, T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, *15*(3), 169–172. doi:10.1016/S0956-7135(03)00028-8
5. Brewer, M. S., Zhu, L. G., Bidner, B., Meisinger, D. J., & Mckeith, F. K. (2001). Measuring pork color: effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. *Meat Science*, *57*, 169–176.
6. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*(3), 223–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

7. Busatta, C., Vidal, R. S., Popiolski, A S., Mossi, A J., Dariva, C., Rodrigues, M. R. A., Cansian, R. L. (2008). Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*, 25(1), 207–11. doi:10.1016/j.fm.2007.07.003
8. Cammack, R., Joannou, C. ., Cui, X.-Y., Torres Martinez, C., Maraj, S. R., & Hughes, M. N. (1999). Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1411(2-3), 475–488. doi:10.1016/S0005-2728(99)00033-X
9. Cassens, R. G. (1997). Residual nitrite in cured meat. *Food Technology*, 51, 53–55.
10. Castilho, P. C., Savluchinske-Feio, S., Weinhold, T. S., & Gouveia, S. C. (2012). Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. *Food Control*, 23(2), 552–558. doi:10.1016/j.foodcont.2011.08.031
11. Deans, S. G., & Ritche, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5, 165–180.
12. Dong, Q., Tu, K., Guo, L., Yang, J., Wang, H. A. I., & Chen, Y. (2007). The effect of sodium nitrite on the textural. *Journal of Texture Studies*, 38, 537–554.

13. Dorman, H. J. D., Peltoketo, a., Hiltunen, R., & Tikkanen, M. J. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 83(2), 255–262. doi:10.1016/S0308-8146(03)00088-8
14. Dutra, M. P., Cardoso, G. P., Ramos, E. M., Lemos, A. De, Ramos, S., Carla, A. Fontes, P. R. (2012). Technological and sensory of restructured low-fat cooked ham containing liquid whey. *Ciência e Agrotecnologia*, 36(1), 86–92.
15. Dutra, M. P., Ramos, E. M., Cardoso, G. P., & Leal, A. S. (2011). Radiação gama e tempo de armazenamento sobre a oxidação lipídica, cor objetiva, pigmentos heme e nitrito residual de mortadelas elaboradas com diferentes níveis de nitrito. *Ciência Rural*, 1–7.
16. Feiner, G. (2006). *Meat products handbook practical science and technology*. Boca Raton: CRC, 2006. p. 627.
17. Francis, F. J. (2000). *Encyclopedia of food science and technology*. New York: J. Wiley, 2000.
18. Garcia-Esteban, M., Ansorena, D., Gimeno, O., & Astiasara, I. (2003). Optimization of instrumental colour analysis in dry-cured ham. *Meat Science*, 63, 287–292.
19. Guerra, N. B., & Lajolo, F. M. (2005). Ação antioxidante de especiarias face diferentes atividades de água. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(1), 45–50.

20. Hwang, J.-K., Choi, E.-M., & Lee, J. H. (2005). Antioxidant activity of *Litsea cubeba*. *Fitoterapia*, 76(7-8), 684–6. doi:10.1016/j.fitote.2005.05.007
21. Jafari, M., & Emam-Djomeh, Z. (2007). Reducing nitrite content in hot dogs by hurdle technology. *Food Control*, 18(12), 1488–1493. doi:10.1016/j.foodcont.2006.11.007
22. Jayasena, D. D., & Jo, C. (2013). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 34(2), 96–108. doi:10.1016/j.tifs.2013.09.002
23. Jorge, E. D. C., Mendes, A. C. G., Auriema, B. E., Cazedey, H. P., Fontes, P. R., Ramos, A. D. L. S., & Ramos, E. M. (2015). Application of a check-all-that-apply question for evaluating and characterizing meat products. *Meat Science*, 100C, 124–133. doi:10.1016/j.meatsci.2014.10.002
24. Lee, S.-J., Umamo, K., Shibamoto, T., & Lee, K.-G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91(1), 131–137. doi:10.1016/j.foodchem.2004.05.056
25. Meilgaard, M., Civille, G. V., & Carr, B. T. (1999). *Sensory evaluation techniques*. 3.ed. London: CRC Press, 1999. 387 p.
26. Oliveira, T. L. C. de, Malfitano de Carvalho, S., de Araújo Soares, R., Andrade, M. A., Cardoso, M. D. G., Ramos, E. M., & Piccoli, R. H. (2012). Antioxidant effects of *Satureja montana* L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated

with different levels of sodium nitrite. *LWT - Food Science and Technology*, 45(2), 204–212. doi:10.1016/j.lwt.2011.09.006

27. Ordóñez, J. A. et al. (2005). *Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 294 p.
28. Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, *Food Control*, 18 (5), 414–420. doi:10.1016/j.foodcont.2005.11.009
29. Pegg, R. B., & Shahid, F. (2000). *Nitrite curing of meat: the n-nitrosamine problem and nitrite alternatives*. 3. ed. Trumbull: Food e Nutrition, 2000. 280 p.
30. Pereira, A. D., Piccoli, R. H., Batista, N. N., Camargos, N. G., & Oliveira, M. M. M. (2014). Thermochemical inactivation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Enteritidis by essential oils. *Ciência Rural*, 44(11), 2022–2028.
31. Pietrasik, Z. (1999). Effect of content of protein, fat and modified starch on binding textural characteristics, and colour of comminuted scalded sausages. *Meat Science*, 51, 17–25.
32. Raharjo, S., Sofos, J. N., & Schmidt, G. R. (1992). Improved Speed, Specificity, and Limit of Determination of an Aqueous Acid Extraction Thiobarbituric Acid-C18 Method for Measuring Lipid Peroxidation in Beef, *J. Agric. Food Chem*, 40 (11), 2182–2185.

33. Ramalho, C. V., & Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29(4), 755–760.
34. Ramos, E. M., & Gomide, L. A. M. (2009). *Assessment of meat quality: Principles and methodologies*. Viçosa: Ed. UFV, 599 p.
35. Rywotycki, R. (2002). The effect of selected functional additives and heat treatment on nitrosamine content in pasteurized pork ham, *Meat science*, 60 (4), 335–339.
36. Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F., & Sangwan, R. S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, 34(1), 3–21.
37. Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. a., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218. doi:10.1016/j.foodcont.2010.02.003
38. Toldrá, F. (2010). *Handbook of meat processing*. Boston: Editorial Office, 2010. 584 p.
39. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of mortadella. *Meat Science*, 85(3), 568–576. doi:10.1016/j.meatsci.2010.03.007
40. Ye, C.-L., Dai, D.-H., & Hu, W.-L. (2013). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa*

L.). *Food Control*, 30(1), 48–53.
doi:10.1016/j.foodcont.2012.07.033

41. Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165–5170. doi:10.1021/jf010697n