



JULIANA JUNQUEIRA PINELLI

**ÓLEOS ESSENCIAIS EMULSIONADOS E
NANOEMULSIONADOS NO CONTROLE DE *C. botulinum* E *C.*
sporogenes EM MORTADELA**

**LAVRAS – MG
2022**

JULIANA JUNQUEIRA PINELLI

**ÓLEOS ESSENCIAIS EMULSIONADOS E NANOEMULSIONADOS NO CONTROLE
DE *C. botulinum* E *C. sporogenes* EM MORTADELA**

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

Orientadora
Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS – MG
2022**

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

Pinelli, Juliana Junqueira.

Óleos essenciais emulsionados e nanoemulsionados no controle
de *C. botulinum* e *C. sporogenes* em mortadela / Juliana Junqueira

Pinelli. - 2022.

90 p. : il.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. microbiologia. 2. nanotecnologia. 3. segurança alimentar. I.
Piccoli, Roberta Hilsdorf. II. Título.

JULIANA JUNQUEIRA PINELLI

**ÓLEOS ESSENCIAIS EMULSIONADOS E NANOEMULSIONADOS NO CONTROLE
DE *C. botulinum* E *C. sporogenes* EM MORTADELA**

**EMULSIONED AND NANOEMULSIONED ESSENTIAL OILS IN THE CONTROL OF
C. botulinum AND *C. sporogenes* IN MORTADELLA**

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

APROVADA em 28 de setembro de 2022.

Dra. Angélica Cristina de Souza UFLA

Dra. Heloísa Helena de Abreu Martins IFBA

Dra. Luciana Silva Ribeiro UFLA

Dra. Monique Suela Silva UFLA



Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS – MG
2022**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me iluminado nesta trajetória e por ter me dado forças para superar os momentos difíceis. “Venham a mim, todos os que estão cansados e sobrecarregados, e eu darei descanso a vocês”.

Aos meus pais, Lucila e Antônio, por todo o apoio e suporte, e por terem me ensinado tudo aquilo que sei hoje. Pelo amor incondicional e incentivo. Sem vocês eu não teria chegado até aqui!

Ao meu noivo Daniel, por todo amor, carinho, compreensão e paciência ao longo dessa jornada que juntos percorremos.

Aos meus amigos de república, Tatiana, Cibelle e Alex, por serem minha família em Lavras, sempre me apoiando e ajudando nos momentos desesperadores.

À toda a minha família e amigos, por estarem sempre presentes e torcendo por mim.

À minha orientadora e amiga Roberta Piccoli, pela paciência, pelo carinho e amizade, pelos ensinamentos e sugestões transmitidas, contribuindo assim para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus colegas de laboratório que se tornaram grandes amigos, compartilhando comigo suas experiências e ensinamentos, me incentivando e apoiando nos momentos de dificuldades. Sem a ajuda de vocês, esse trabalho não seria possível!

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realização do doutorado.

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

**Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho,
meu muito obrigada e eterna gratidão!**

RESUMO

A crescente demanda por parte dos consumidores por produtos naturais têm se intensificado nos últimos anos, fazendo com que a indústria alimentícia invista cada vez mais na pesquisa e desenvolvimento de conservantes naturais que possam ser aplicados nos alimentos sem oferecer riscos à saúde humana e que tenham as mesmas funções dos conservantes sintéticos. Diante deste cenário, os óleos essenciais obtidos de plantas se destacam, uma vez que possuem ação antimicrobiana e antioxidante já comprovada e têm sua aplicação em alimentos considerada segura (*GRAS*). Apesar dos óleos essenciais apresentarem atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos, sua aplicação nos alimentos encontra restrições, principalmente devido a sua baixa solubilidade em água, seus efeitos sensoriais indesejados e às interações com constituintes alimentares que dificultam sua ação. Com isso, novas formas de aplicação desses óleos nos alimentos vêm sendo estudadas, como a utilização de nanoemulsões de óleos essenciais, que busca tornar esses compostos mais reativos, porém com menores efeitos nas propriedades sensoriais do produto. Objetivou-se neste trabalho avaliar a atividade antimicrobiana da combinação de óleos essenciais de alho, cravo botão, pimenta rosa e pimenta preta, e sua respectiva nanoemulsão, no controle de endósporos de *Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes* inoculados em mortadela, bem como sua influência nas características tecnológicas (pH, atividade de água e cor) e sensoriais do produto. A combinação de óleos testada, bem como sua nanoemulsão, apresentou efeitos satisfatórios sobre os endósporos de ambos os microrganismos testados. Porém, quanto às características tecnológicas e sensoriais do produto, a adição dos óleos essenciais combinados, tanto emulsionados quanto nanoemulsionados, teve forte impacto na cor das mortadelas e no sabor/aroma, indicando a necessidade de outros estudos para que essas alterações sejam minimizadas.

PALAVRAS-CHAVE: Óleos essenciais. Conservantes naturais. *Clostridium botulinum*. Nanoemulsões. Segurança alimentar.

ABSTRACT

The growing demand by consumers for natural products has intensified in recent years, causing the food industry to invest more and more in the research and development of natural preservatives that can be applied to food without posing risks to human health and that have the same functions as synthetic preservatives. In this scenario, essential oils obtained from plants stand out, since they have already proven antimicrobial and antioxidant action and their application in foods is considered safe (*GRAS*). Although essential oils have antimicrobial activity against several microorganisms, their application in foods is restricted, mainly due to their low water solubility, their unwanted sensory effects and interactions with food constituents that make their action difficult. Thus, new ways of applying these oils in food have been studied, such as the use of essential oil nanoemulsions, which seeks to make these compounds more reactive, but with lesser effects on the sensory properties of the product. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of the combination of essential oils of garlic, clove, pink pepper and black pepper, and their respective nanoemulsion, in the control of endospores of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* inoculated in mortadella, as well as their influence on technological (pH, water activity and color) and sensory characteristics of the product. The combination of oils tested, as well as its nanoemulsion, showed satisfactory effects on the endospores of both microorganisms tested. However, regarding the technological and sensorial characteristics of the product, the addition of combined essential oils, both emulsified and nanoemulsified, had a strong impact on the color of the mortadella and on the flavor/aroma, indicating the need for further studies to minimize these changes.

KEYWORDS: Essential oils. Natural preservatives. *Clostridium botulinum*. Nanoemulsions. Food security.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1. <i>Doenças transmitidas por alimentos (DTA's)</i>	12
2.2. <i>Clostridium sp.</i>	13
2.3. <i>Óleos essenciais como conservantes naturais em alimentos</i>	17
2.3.1. <i>Atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais</i>	20
2.4. <i>Conservantes sintéticos aplicados em produtos cárneos: nitrito e nitrato de sódio</i>	24
2.5. <i>Interações alimentares e nanoemulsões de óleos essenciais</i>	27
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
SEGUNDA PARTE	38
ARTIGO: Óleos essenciais emulsionados e nanoemulsionados no controle de <i>C. botulinum</i> e <i>C. sporogenes</i> em mortadela	39
RESUMO	40
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAIS E MÉTODOS	44
2.1. <i>Óleos essenciais e caracterização química (GC-MS e GC-FID)</i>	44
2.2. <i>Microrganismo, obtenção e padronização do inóculo (endósporos)</i>	45
2.3. <i>Atividade antimicrobiana in vitro</i>	46
2.4. <i>Preparo da nanoemulsão dos óleos essenciais</i>	47
2.5. <i>Estabilidade da nanoemulsão</i>	48
2.6. <i>Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo (MEV-FEG)</i>	49
2.7. <i>Fabricação das Mortadelas</i>	50
2.8. <i>Quantificação de Clostridium botulinum e Clostridium sporogenes nas mortadelas</i>	51
2.9. <i>Análises tecnológicas</i>	52
2.9.1. <i>Atividade de água e pH</i>	52
2.9.2. <i>Análise de cor</i>	52
2.10. <i>Análises sensoriais</i>	53
2.11. <i>Análises estatísticas</i>	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1. <i>Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais e suas combinações</i>	55
3.2. <i>Estabilidade da nanoemulsão de óleos essenciais</i>	60
3.3. <i>Análises microbiológicas na matriz alimentar</i>	62

3.4. <i>Análises tecnológicas</i>	68
3.5. <i>Análises sensoriais</i>	74
4. CONCLUSÃO	77
5. AGRADECIMENTOS	78
6. CONFLITO DE INTERESSES	78
7. REFERÊNCIAS	78

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA's), que são causadas pela ingestão de alimentos contaminados com microrganismos patogênicos ou com toxinas produzidas por estes, têm despertado cada vez mais a atenção dos consumidores, se tornando motivo de intensa preocupação por parte destes e da indústria alimentícia. Dentre os principais causadores dessas doenças, destacam-se as bactérias, especialmente *Clostridium botulinum* através do consumo de embutidos cárneos cozidos.

Clostridium botulinum é uma bactéria Gram-Positiva, anaeróbia obrigatória e formadora de esporos altamente resistentes ao calor. É encontrada em diversos ambientes, como solo e sedimentos aquáticos, sendo responsável pela produção de potentes neurotoxinas que levam ao desenvolvimento de uma doença potencialmente letal, que atinge tanto humanos quanto animais e que provoca intensos distúrbios neurológicos e digestivos, conhecida como botulismo. Diversos alimentos têm sido relacionados aos surtos de botulismo, especialmente alimentos produzidos de forma artesanal (como conservas de vegetais caseiras), conservados de forma inadequada e que não passaram por um tratamento térmico adequado suficiente para inativar seus endósporos.

Por possuírem valores de pH superiores a 4.5, elevada atividade de água, serem embalados à vácuo propiciando um ambiente anaeróbico e o fato de apresentarem prévio cozimento, que elimina a microbiota competente, os produtos cárneos cozidos curados, como a mortadela, se tornam meios favoráveis ao crescimento da bactéria *Clostridium botulinum*.

Como forma de controlar o crescimento microbiano, a indústria de carnes tem utilizado de conservantes sintéticos, especialmente os sais de nitrito e nitrato. Em produtos cozidos curados, estes sais além de possuírem ação antimicrobiana comprovada contra *Clostridium botulinum* e diversas outras bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes*, contribuem para coloração rósea e sabor característico desse tipo de produto, além de exercerem ação antioxidante. Apesar desses conservantes sintéticos serem amplamente empregados, quando utilizados a longo prazo podem apresentar risco a saúde humana, contribuindo para a formação de compostos chamados de N-nitrosaminas que são substâncias consideradas carcinogênicas. Diante da percepção negativa da utilização de antimicrobianos sintéticos em diversos produtos alimentícios, tem-se intensificado o interesse tanto da indústria quanto dos consumidores pela substituição desses

conservantes por compostos ditos “naturais” capazes de exercer as mesmas funções antimicrobianas e antioxidantes, porém sem oferecer riscos à saúde do consumidor. Nesse contexto, destacam-se os óleos essenciais condimentares e aromáticos.

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis aromáticos, obtidos de diversas partes de plantas, que possuem ação antimicrobiana e antioxidante comprovada. Por serem reconhecidos como seguros GRAS (*Generally Recognized as Safe*), têm apresentado ampla aplicação pela indústria alimentícia, sendo utilizados ainda como aromatizantes em diversos produtos. Embora seu uso apresente uma série de vantagens, a aplicação destes óleos em alimentos encontra restrições quanto sua aceitabilidade sensorial, uma vez que, por serem adicionados em matrizes complexas, são necessárias altas concentrações destes óleos nos alimentos para que seja alcançada elevada atividade microbiana, fazendo assim com que possam ser desenvolvidos sabores e odores indesejáveis no produto. Como forma de minimizar os efeitos sensoriais e aumentar a atividade antimicrobiana, alguns trabalhos têm apontado a utilização destes óleos essenciais de forma nanoemulsionada, tornando então esses compostos mais reativos, porém com efeitos menores nas propriedades sensoriais do produto, tratando-se de um método de alta eficiência para entrega de compostos bioativos lipofílicos.

Apesar de *C. botulinum* ser um patógeno de intenso interesse e preocupação devido a sua alta patogenicidade e capacidade de contaminação, estudos atuais têm utilizado um microrganismo substituto, *Clostridium sporogenes*, nos ensaios microbiológicos envolvendo, principalmente, resistência de seus esporos, uma vez que este não produz toxinas e é filogeneticamente semelhante ao *C. botulinum* tipo A. *C. sporogenes* apresenta-se na forma de bastonetes Gram-Positivos, anaeróbios e formadores de endósporos com semelhanças morfológicas e genéticas com *C. botulinum*, porém com maior resistência térmica.

Em busca de alternativas ao uso de nitrito de sódio em elevadas concentrações em produtos cárneos, este estudo avaliou a atividade antimicrobiana sinérgica entre combinações dos óleos essenciais de alho, pimenta preta, pimenta rosa e cravo botão, com o intuito de elaborar nanoemulsões e avaliar sua atividade antimicrobiana sobre endósporos e células vegetativas de *Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes* em produto cárneo curado e cozido.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Doenças transmitidas por alimentos (DTA's)

A deterioração de alimentos por microrganismos e a presença de bactérias patogênicas nestes é motivo de intensa preocupação para a indústria alimentícia mesmo nos tempos de hoje e com as tecnologias de preservação existentes, levando a perdas inestimáveis e grandes prejuízos à indústria. Em produtos altamente perecíveis, como carnes e produtos cárneos, as bactérias deteriorantes levam a uma diminuição na vida útil do produto, ocasionando alterações desagradáveis no sabor, odor, coloração e produção de gás, por exemplo (Mith et al., 2014). Já as bactérias patogênicas podem produzir toxinas nestes alimentos, levando ao desenvolvimento de doenças conhecidas como Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) (Law et al., 2015).

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) são aquelas causadas pela ingestão de alimentos e água contaminados por agentes físicos, químicos ou biológicos, sendo este último grupo representado principalmente pelas bactérias que podem estar presentes diretamente no alimento ou produzir toxinas nestes (de Melo et al., 2018). Essas bactérias podem ser divididas em grupos segundo o tipo de manifestação clínica: as infecciosas mais importantes são *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Campylobacter*; as principais intoxicantes são *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum* e as principais toxigênicas são *E. coli* enterotoxigênica, *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus* (BRASIL, 2010). Os principais agentes etiológicos relacionados aos surtos no Brasil são as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* entérica, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (Pombo et al., 2018).

Diversos fatores têm contribuído para a propagação das DTA's e alterações em seu perfil: rápido crescimento populacional e uma mudança demográfica em direção ao envelhecimento da população; desenvolvimento de um mercado cada vez mais global de vegetais, frutas, carnes e até mesmo animais de fazenda, alguns dos quais se originam de países com procedimentos inadequados de segurança microbiológica; condições de transporte aprimoradas, que facilitam o crescimento de microrganismos nos produtos alimentares, chegando ao consumidor em número viável; uma população humana cada vez mais transitória que carrega em seu intestino uma microbiota variável; alterações nos hábitos alimentares, como o consumo de alimentos crus ou levemente cozidos; aumento no número de indivíduos imunologicamente comprometidos em

decorrência da mudança demográfica gerando grupos altamente suscetíveis a doenças ou tratamentos imunossupressores e, principalmente, alimentos mais baratos oriundos de alterações nas práticas agrícolas (Newell et al., 2010).

Os principais alimentos diretamente relacionados aos surtos de DTA's são as carnes, produtos lácteos, peixe, frutos do mar, ovos e vegetais. Ainda que a maioria dos patógenos presentes nesses alimentos possa ser eliminada facilmente com o processamento térmico adequado, como *Escherichia coli*, algumas formas esporuladas apresentam-se altamente resistentes a condições adversas como os microrganismos dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* (Cortés-Sánchez, & Salgado-Cruz, 2017).

2.2. *Clostridium sp.*

Clostridium botulinum é uma bactéria Gram-Positiva, bacilar, anaeróbia obrigatória e formadora de esporos, estando presente no solo e sedimentos aquáticos, por exemplo. Seus endósporos são formados geralmente sob condições de estresse, sobrevivendo às medidas padrão de cozimento e processamento dos alimentos e, germinando em condições propícias como ambientes anaeróbios, pH acima de 4,6, baixo conteúdo de sal e açúcar e elevada atividade de água (Chalk et al., 2019; Cereser et al., 2008).

Apresenta a produção de sete potentes neurotoxinas, diferenciadas pela antigenicidade da neurotoxina produzida (A-G), divididas em quatro grupos (I - IV) que levam a uma doença potencialmente letal conhecida como botulismo, uma doença neuroparalítica. Dentre todos os quatro grupos, apenas os Grupos I e II são os responsáveis pelo botulismo em humanos. Os demais estão relacionados com a doença em várias espécies de animais (Grupo III) ou não parecem estar associados com o botulismo em humanos ou animais (Grupo IV) (Carter; Peck, 2015; Chalk et al., 2019).

Existem três tipos principais de botulismo em humanos: o botulismo alimentar, o botulismo infantil / intestinal (adulto) e o botulismo de ferida. O botulismo alimentar é causado pela ingestão de alimentos contaminados com a neurotoxina botulínica pré-formada, após o crescimento de *C. botulinum* no alimento. Já os demais são infecções causadas pela produção de toxinas *in situ* (Peck et al., 2011).

Independente do tipo de botulismo, o mecanismo de ação da toxina e a causa da doença são comuns, levando a sintomas muito semelhantes, como vômitos, náuseas, paralisia flácida e dificuldade respiratória (Pignata-Viana et al., 2019). A toxina é absorvida no trato gastrointestinal, ou no caso do botulismo de feridas, no ferimento, se disseminando via corrente sanguínea até alcançar as terminações neuromusculares. Ela então bloqueia o lançamento da acetilcolina, levando ao seu efeito tóxico (paralisia dos nervos motores e por fim do nervo frênico) (de Macedo et al., 2017; Pignata-Viana et al., 2019).

Os produtos associados a surtos de botulismo são muito diversos, incluindo principalmente embutidos cárneos, peixes, legumes e conservas artesanais, produtos lácteos e mel, que não tiveram um tratamento térmico adequado aplicado ou que não foram preservados de forma correta (Brown, 2000; Cereser et al., 2008). Alimentos embalados a vácuo e sem tratamento adequado possibilitam o desenvolvimento da bactéria e, conseqüentemente, produção da toxina botulínica. Além desses fatores, temperatura, pH e atividade de água também influenciam no desenvolvimento dessa bactéria no alimento (Gelli et al., 2002).

Segundo da Silva et al. (2020), entre os anos de 2008 e 2018 foram confirmados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) 69 casos de botulismo no país, sendo São Paulo o estado que registrou maior número de casos (30.5%). Provavelmente isso ocorreu devido ao fato de que São Paulo apresenta uma grande quantidade de produtos industrializados e preparados no comércio que são distribuídos em grande escala, aumentando-se o então o risco de possíveis surtos de botulismo alimentar.

Como forma de se evitar a contaminação dos alimentos por essa bactéria e conseqüente produção na neurotoxina, são recomendadas algumas medidas de segurança. Por exemplo, recomenda-se utilizar em conjunto valores de pH abaixo de 4.5 e concentrações de NaCl iguais ou superiores a 3.5% em todo o alimento, diminuindo a atividade de água para valores inferiores que 0.97. Para alimentos refrigerados, por exemplo, adotam-se os seguintes procedimentos: armazenamento em baixas temperaturas, normalmente iguais ou inferiores a 8°C, e vida útil inferior a 10 dias; tratamento térmico a 90°C por 10 min ou letalidade equivalente combinada com armazenamento a baixas temperaturas e adição de nitritos em concentrações superiores a 100 ppm (Silva; Gibbs, 2010; Peck et al., 2011).

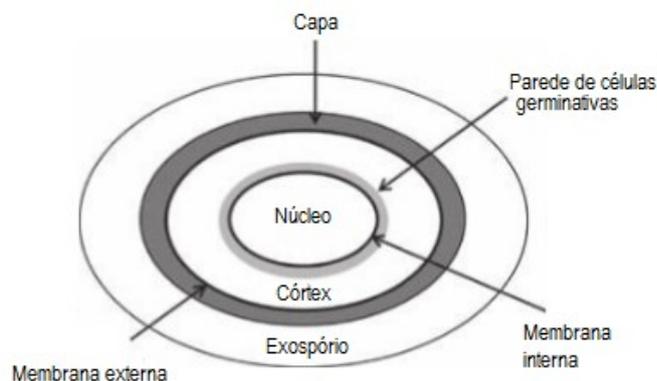
Devido a sua elevada patogenicidade, estudos têm sido conduzidos com *Clostridium sporogenes*, uma bactéria filogeneticamente e fisiologicamente semelhante ao *Clostridium botulinum* tipo A, porém não produtora de toxinas (Brown et al., 2012).

Assim como *Clostridium botulinum*, ela é uma bactéria anaeróbia e formadora de endósporos, porém não é patogênica e sim putrefativa (Cho, & Chung, 2018). É amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada no solo, na água e no intestino de humanos e animais (Kubiak et al., 2015).

Seus endósporos são encontrados em diversos ambientes e persistem por longos períodos nestes devido a sua estrutura composta por diversas camadas. Este estado dormente altamente resistente característico desses esporos permite a sobrevivência em condições hostis, como na presença de oxigênio; ausência de nutrientes; tratamento térmico; dessecação; alta pressão e produtos químicos tóxicos, que seriam letais para as células vegetativas (Brunt et al., 2015).

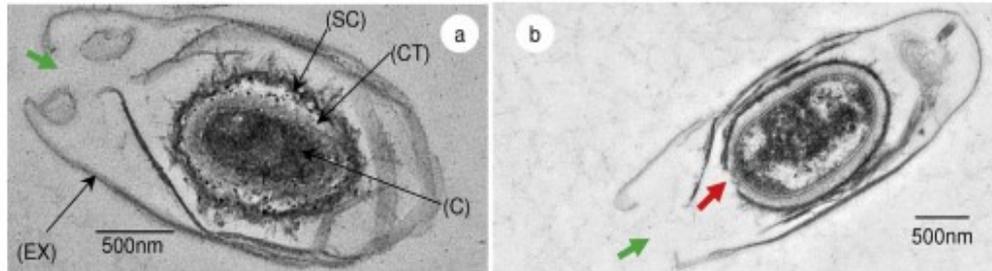
Quanto a sua morfologia, estes endósporos apresentam estruturas semelhantes aos esporos bacterianos típicos: uma capa de revestimento do esporo; membrana externa; córtex; membrana interna e um núcleo (FIGURA 1) (Leggett et al., 2012). Apresentam uma camada membranosa externa que reveste o endósporo bacteriano chamada de exospório que possui papel muito importante na germinação, crescimento e fixação do esporo, sendo o primeiro ponto de contato entre o esporo e o meio (FIGURA 2) (Brunt et al., 2015).

Figura 1 – Esporo bacteriano típico



FONTE: Leggett et al. (2012) com modificações.

Figura 2 – Imagem de uma microscopia eletrônica de transmissão de esporos de *Clostridium sporogenes*.



(a): micrografia eletrônica de transmissão de uma seção transversal de um esporo de *Clostridium sporogenes* com córtex intacto. (CT) córtex; (SC) capas do esporo; (C) núcleo do esporo; (EX) exosporio. (b) Esporo germinando. A seta vermelha indica quebras e distorções do revestimento de esporos. Seta verde indica uma seção aberta no exosporio que pode permitir a liberação da célula recém-formada.

FONTE: Brunt et al. (2015) com modificações.

A dormência dos esporos bacterianos pode ser quebrada quando o ambiente apresenta condições favoráveis, como presença de nutrientes, temperatura adequada, ou até mesmo pode ser induzida pela presença de muopeptídeos no ambiente produzidos por outras bactérias (Keynan et al., 1964; Shah et al., 2008). Diz-se então que a germinação ocorreu e a multiplicação celular recomeça.

Durante a germinação, todas as propriedades intrínsecas de resistência dos esporos bacterianos são perdidas, podendo ser mortos facilmente por agentes estressores que também atuam sobre as células vegetativas (Olguín-Araneda et al., 2015). Uma vez que a fase de dormência é interrompida, os endósporos produzem estruturas membranosas exosporiais específicas, no início da germinação, que facilitam a fixação do esporo ao substrato, a outro esporo ou até mesmo a bactérias vizinhas, sendo esta fase marcada por um odor de putrefação característico de microrganismos do gênero *Clostridium* (Panessa-Warren et al., 1994). Vale destacar que, apesar dos esporos de *Clostridium* germinarem normalmente sob condições aeróbicas, a presença de oxigênio dificulta o desenvolvimento e o crescimento subsequentes da célula vegetativa nascente, uma vez que ela apresenta elevada sensibilidade ao oxigênio (Olguín-Araneda et al., 2015).

Existem diversos fatores responsáveis pela resistência dos esporos bacterianos ao calor, radiação e produtos químicos. Estes fatores estão principalmente relacionados à estrutura morfológica dos esporos. Por exemplo, a membrana interna apresenta baixa permeabilidade que retarda o fluxo de produtos químicos tóxicos para o núcleo da célula. Ainda, algumas cepas

apresentam proteínas com uma termoestabilidade intrínseca que contribui para a resistência ao calor úmido. Outro fator importante diz respeito ao reparo do DNA, um importante mecanismo na resistência a tratamentos que danificam essa molécula, como radiação, calor seco e produtos químicos genotóxicos (Setlow, 2006).

Devido às semelhanças citadas acima e à resistência térmica comparável de seus endósporos para maior parte dos alimentos, *C. sporogenes* tem sido utilizado como um modelo substituto para *C. botulinum* no estudo de processamento térmico para alimentos, sendo ainda de fácil detecção uma vez que apresentam odor e formação de gás característicos e relativa facilidade em cultivar seus esporos (Brown et al., 2012).

2.3. Óleos essenciais como conservantes naturais em alimentos

Uma das maiores preocupações da indústria alimentícia, especialmente de produtos altamente perecíveis, como os produtos cárneos, refere-se ao controle do crescimento microbiano nesses produtos, que pode levar tanto a deteriorações nestes ocasionando grandes perdas econômicas, quanto ao desenvolvimento de doenças, afetando todo o sistema de saúde da população. Uma das formas de controlar este crescimento microbiano é por meio da adição de conservantes, como forma de um aditivo (substâncias adicionadas intencionalmente no alimento, mas não são consumidas como alimento, tornando-se componentes deste) a fim de garantir maior vida útil e segurança alimentar (Woraprayote et al., 2016).

Além do sal comum, alguns conservantes sintéticos são amplamente utilizados, principalmente em produtos cárneos, como sais de nitrito/nitrato, benzoatos, sulfitos e sorbatos. Ainda que apresentem uma série de vantagens em sua aplicação, seu uso em excesso e a longo prazo pode oferecer riscos à saúde do consumidor, que vão desde reações alérgicas, crises de asma, erupções cutâneas, dermatite de contato, até casos mais graves podendo levar ao desenvolvimento de câncer de estômago, este relacionado principalmente com a utilização de sais de nitrito/nitrato (Sharma, 2015).

Diante da crescente preocupação dos malefícios a saúde humana advindos da utilização em excesso destes conservantes sintéticos, aliados ao aumento da demanda por produtos alimentícios “*Clean Label*” que sejam mais saudáveis e livres de aditivos sintéticos, tem-se intensificado a procura por aditivos naturais, especialmente os oriundos de plantas. Estes não

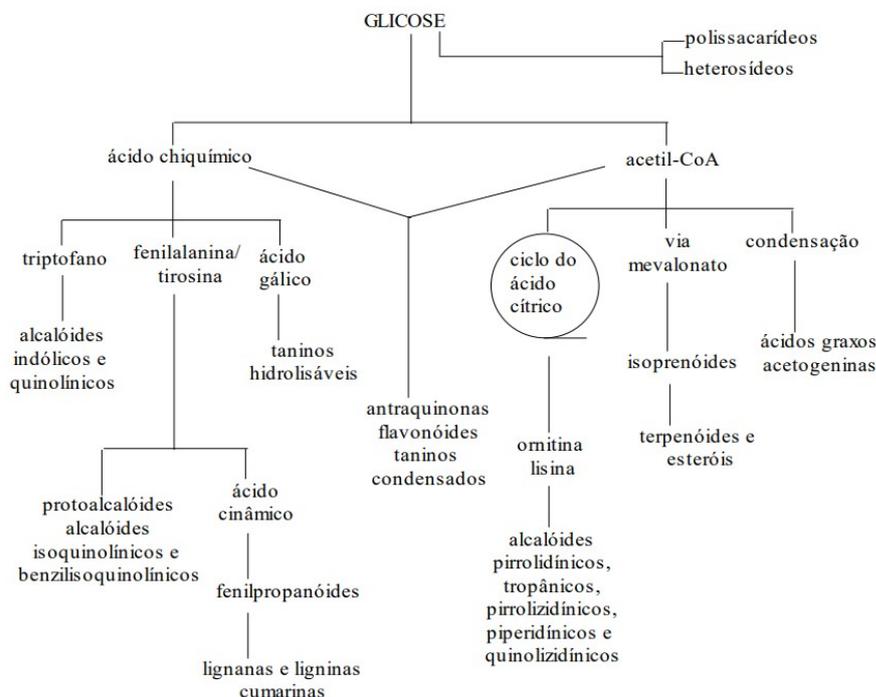
apresentam riscos à saúde do consumidor e suas ações antimicrobianas, antissépticas e terapêuticas vêm sendo reconhecidas desde os períodos pré-históricos, apresentando ampla utilização por todas as civilizações com o decorrer do tempo (Sakkas; Papadopoulou, 2017; Martínez-Zamora et al., 2021).

Óleos essenciais (OE's) são misturas complexas de compostos naturais antimicrobianos e voláteis, obtidos de células especiais ou grupos de células de plantas aromáticas, como folhas e caule, comumente concentrados em uma região particular, como cascas, flores, raízes e até mesmo frutas. São incolores à temperatura ambiente e apresentam odor característico agradável e sabor distinguível, possuindo uma ampla aplicação em alimentos como condimentos, além de serem muito utilizados como aromatizantes e na indústria de perfumes e cosméticos, podendo ser obtidos por meio de fermentações, extração por solventes, hidrodestilação ou destilação a vapor. Apesar de receberem essa denominação, não são estritamente óleos, porém apresentam baixa solubilidade em água, característica dos óleos, sendo altamente solúveis em álcool, solventes orgânicos e óleos fixos (Burt, 2004; Gutierrez et al., 2008; Calo et al., 2015; Falleh et al., 2020).

São produtos do metabolismo secundários das plantas, apresentando um papel fundamental na interação entre estas plantas e o meio ambiente, tanto na defesa quanto na atração, seja com outras plantas, patógenos e polinizadores. Sua produção é afetada por condições ambientais como temperatura, disponibilidade hídrica, nutrientes e altitude. Apresentam aplicações em alimentos, além de farmacêuticas e medicinais (Gobbo-Neto; Lopes, 2007; Figueiredo et al., 2008).

A grande maioria dos OE's apresenta em sua constituição derivados de terpenóides ou fenilpropanóides. Ambos os compostos têm sua origem a partir do metabolismo da glicose. Os primeiros são derivados do isopreno, podendo ser formados a partir da via do mevalonato (ou ciclo do ácido cítrico), cujos precursores são o piruvato e acetil-coA. Já os fenilpropanóides são derivados do ácido chiquímico responsável pela formação dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico (FIGURA 3) (Ootani et al., 2013).

Figura 3 – Ciclo biossintético dos metabólitos secundários em plantas.



FONTE: Simões; Spitzer (2004) com modificações.

Além dos terpenóides e fenilpropanóides, os OE's apresentam diferentes componentes em sua constituição, sendo sua porcentagem variável de acordo com a espécie e a parte da planta na qual ele é obtido. Por exemplo, podem ser constituídos por 20 a 100 metabólitos secundários pertencentes a uma grande variedade de classes químicas. Alguns constituintes aromáticos e alifáticos também estão presentes. Monoterpenos, sesquiterpenos e derivados oxigenados desses dois representam o maior grupo de entidades químicas em OE's (Solórzano-Santos; Miranda-Novales, 2012; Raut; Karuppayil, 2014).

Possuem, em sua maioria, atividade antimicrobiana, antifúngica e antioxidante, além de apresentarem propriedades anti-inflamatórias e anti-carcinogênicas, por exemplo. Cerca de 60% destes óleos presentes em plantas medicinais, ervas e condimentos apresentam propriedades antifúngicas e 35% propriedades antibacterianas e por isso apresentam grande potencial para serem utilizados como conservantes naturais principalmente em alimentos industrializados (Kalemba; Kunicka, 2003; Guerra et al., 2012). Já foram produzidos cerca de 3000 óleos

essenciais, utilizando pelo menos 2000 espécies de plantas, das quais 300 apresentam grande importância do ponto de vista comercial (Raut; Karuppaiyl, 2014).

Normalmente, a atividade antimicrobiana de um óleo essencial é atribuída pela presença de um ou dois compostos, sendo chamados de compostos majoritários, que se encontram em maiores concentrações (20 – 70%), enquanto os demais componentes se encontram em menores concentrações (elementos traços). Por exemplo, carvacrol (30%) e timol (27%) são os componentes principais do óleo essencial de *Origanum compactum*, e 1,8-cineole (50%) do óleo essencial de *Cinnamomum camphora* (Bakkali et al., 2008). Porém, os compostos presentes em baixas concentrações podem desempenhar papel crítico nessa atividade, possivelmente, pelo efeito sinérgico entre eles e os demais componentes (Burt, 2004).

Embora os vários componentes dos óleos possuam alguma ação antibacteriana, a maior parte deles, quando utilizados sozinhos, apresenta baixa atividade e espectro de ação limitado. As interações entre esses componentes podem levar a efeitos antagônicos, aditivos ou sinérgicos. Alguns estudos demonstraram que OE's totais geralmente têm atividade antibacteriana mais alta do que as misturas de seus principais componentes, sugerindo que os componentes traços são críticos para a atividade sinérgica, embora efeitos antagônicos e aditivos também tenham sido observados (Tamgue et al., 2010; Ntalli et al., 2011; Bassolé; Juliani, 2012).

Os óleos essenciais são reconhecidos como seguros GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (U.S Food And Drug Administration, 2006) uma vez que não há qualquer impacto prejudicial documentado relacionado ao seu uso tradicional. Também são considerados relativamente baratos, estando prontamente disponíveis para a população de baixo nível socioeconômico (Bag; Chattopadhyay, 2015). Tendo em vista seus efeitos benéficos, os óleos essenciais estão ganhando importância nos últimos anos como potencial fonte de conservantes naturais em alimentos, sendo alternativas ao uso dos conservantes sintéticos tradicionalmente utilizados que podem apresentar algum malefício à saúde do consumidor.

2.3.1. Atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais

Diversos trabalhos têm avaliado a atividade antimicrobiana e antioxidante de óleos essenciais contra patógenos, principalmente de alimentos altamente perecíveis como frutas e

carnes, em que a maioria dos patógenos são representados por bactérias que conseguem atuar em diversos substratos, crescem em diferentes valores de pH, temperatura e condições ambientais (Hernández-Ochoa et al., 2014; Vasilijević et al., 2019; Orhan-Yanikan et al., 2019; Saricaoglu; Turhan, 2020; Moon et al., 2020), como uma forma de substituição aos tradicionais conservantes químicos utilizados.

Elshafie et al. (2022) avaliaram a atividade antimicrobiana de quatro óleos essenciais (tomilho, funcho, anis e manjerona), extraídos de diferentes partes, contra nove patógenos alimentares isolados de produtos cárneos industriais (carne moída, salsicha e hambúrguer). Além disso, foi realizado um teste sensorial para avaliação de algumas propriedades organolépticas (cor, odor, consistência, sabor) dos produtos cárneos elaborados com os óleos. Os autores obtiveram resultados antimicrobianos satisfatórios de todos os óleos utilizados, sendo o óleo essencial de tomilho o que apresentou os melhores resultados tanto para as bactérias avaliadas quanto para os fungos. Quanto ao teste sensorial, os resultados revelaram que os tratamentos contendo os óleos essenciais não se diferenciaram do tratamento controle, não possuindo impacto negativo nas propriedades organolépticas dos produtos cárneos processados.

García-Díez et al. (2017) avaliaram os efeitos antimicrobianos de treze diferentes óleos essenciais contra algumas cepas de microrganismos patogênicos e deterioradores presentes em produtos curados secos e no ambiente de fabricação destes produtos, alcançando maiores atividades com os óleos essenciais de tomilho e canela, que inibiram todos os sete grupos de microrganismos testados (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp. e *Pseudomonas* spp.)

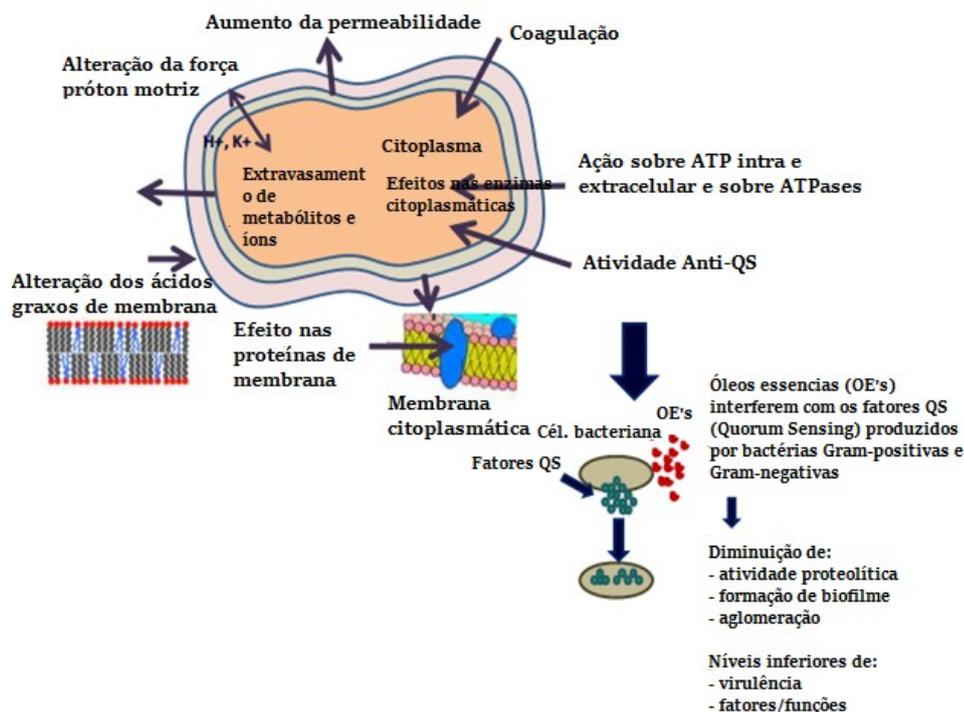
De Oliveira et al. (2011) avaliaram o efeito do óleo essencial de segurelha (*Satureja montana* L.) sobre *C. perfringens* tipo A ATCC 3624, patógeno associado a surtos de toxinfecções alimentares por consumo de produtos cárneos contaminados, inoculado em mortadelas elaboradas com diferentes níveis de nitrito de sódio, alcançando atividade do óleo essencial sobre o microrganismo testado tanto nos ensaios *in vitro* quanto no produto cárneo (em concentrações superiores a 1.56%).

Os mecanismos de ação antibacteriana da maioria dos óleos essenciais ainda não estão totalmente elucidados e variam de óleo para óleo, uma vez que os diferentes tipos de constituintes químicos é que determinam as propriedades antimicrobianas. Diversos mecanismos de ação têm sido propostos (FIGURA 4), sendo que esta atividade está relacionada ao caráter hidrofílico ou

lipofílico dos constituintes dos óleos, do tipo de microrganismo e sua estrutura de parede celular (Khorshidian et al., 2018).

A hidrofobicidade dos óleos essenciais é uma característica importante que permite que estes atravessem facilmente a membrana celular, interferindo nos mecanismos de transporte molecular e levando a alterações de permeabilidade na célula. Eles podem atuar na membrana celular, levando a uma quebra de sua integridade, ocasionando interrupção, por exemplo, da produção de energia (acoplada à membrana), transporte pela membrana, interrupção das bombas de prótons e conseqüente síntese de ATP, extravasamento de componentes celulares, perda de íons, comprometimento de enzimas e extensas perdas de constituintes celulares que poderão ocasionar a morte celular. Essas alterações na organização celular podem causar um efeito cascata, afetando outras organelas celulares (Diao et al., 2014; Swamy et al., 2016).

Figura 4 - Mecanismo de ação e sítios alvos dos óleos essenciais em células microbianas.



FONTE: Nazzaro et al. (2013) com modificações.

A ação destes óleos também pode variar de acordo com o tipo de bactéria. Bactérias Gram-Positivas costumam ser mais sensíveis a esses agentes antimicrobianos do que bactérias Gram-Negativas. Estas últimas são geralmente menos suscetíveis a ação destes óleos uma vez que possuem em sua membrana externa lipopolissacarídeos hidrofílicos (LPS), que criam uma

barreira contra macromoléculas e compostos hidrofóbicos, fornecendo às bactérias Gram-Negativas maior tolerância a compostos antimicrobianos hidrofóbicos como aqueles encontrados em óleos essenciais (Hyldgaard et al., 2012).

Além de atividade antimicrobiana, muitos óleos essenciais comumente utilizados também possuem ação antioxidante. Antioxidantes são compostos capazes de retardar ou diminuir a oxidação de um material oxidável, como lipídios, proteínas e carboidratos, mesmo quando usados em concentrações muito baixas (<1%; normalmente entre 1-1000 mg/L) em comparação com a quantidade de material que é protegido por eles (Amorati et al., 2013). A oxidação lipídica, que pode ocorrer em produtos que contenham óleos ou gorduras em sua composição e que reagem com o oxigênio atmosférico, formando-se peróxidos e hidroperóxidos, além de compostos carbonila que são produzidos como produtos de oxidação secundária, é uma das principais causas da formação de ranço nos alimentos (devido a formação de aldeídos, ácidos, cetonas e álcoois) que leva a alterações nas características sensoriais e nutricionais destes, causando uma deterioração no produto, além de poder levar a efeitos indesejáveis no organismo. Ela pode acontecer em uma série de etapas de produção do alimento, como armazenamento das matérias-primas, processamento, tratamento térmico e armazenamento dos produtos (Tomaino et al., 2005; Embuscado, 2015).

Como forma de evitar este tipo de oxidação, a indústria alimentícia utiliza principalmente de antioxidantes sintéticos, sendo os mais comuns o BHT (butil hidroxitolueno), BHA (butil hidroxianisol), PG (propil galato), TBHQ (terc-butil hidroquinona) e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), sendo que este último atua como um agente quelante, podendo se ligar a metais redutores contribuindo para o processo. Porém, alguns estudos sugerem que alguns destes agentes antioxidantes sintéticos comumente utilizados, como o BHT e BHA, podem ser potencialmente prejudiciais à saúde humana (Viuda-Martos et al., 2010; Brewer, 2011; Amorati et al., 2013). Com isso, a busca por agentes naturais que possam substituir os agentes sintéticos utilizados, não apresentando riscos à saúde do consumidor e que não alterem as características do produto se intensificou, observando um aumento no interesse nas plantas aromáticas e medicinais.

Assim como a atividade antimicrobiana, a ação antioxidante dos óleos essenciais também se deve, principalmente, pela presença de compostos fenólicos que atuam interferindo no processo de oxidação como terminadores de radicais livres e, às vezes, também como quelantes

de metais. Outros compostos como flavonóides e terpenóides (como timol, carvacrol e eugenol) também apresentam essa atividade antioxidante (DelRé; Jorge, 2012; Shahidi; Ambigaipalan, 2015).

Behbahani et al. (2020) avaliaram a atividade antioxidante e antiproliferativa do óleo essencial da casca de *Cinnamomum zeylanicum* e seus possíveis mecanismos de ação antimicrobiana sobre bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos, alcançando forte ação antioxidante devido à presença em níveis notáveis de compostos fenólicos e bioativos com excelente capacidade de eliminar os radicais livres e inibir a oxidação do β -caroteno.

Baj et al. (2018) avaliaram a atividade antioxidante de três diferentes óleos essenciais (*Ocimum basilicum*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*) de forma isolada e combinados (por meio do planejamento estatístico em rede simplex) em diferentes proporções, alcançando uma maior atividade antioxidante para uma mistura de 75% (*Origanum majorana* OE), 8% (*Ocimum basilicum* OE) e 17% (*Rosmarinus officinalis*), demonstrando possíveis efeitos sinérgicos entre os diferentes óleos essenciais analisados.

2.4. Conservantes sintéticos aplicados em produtos cárneos: nitrito e nitrato de sódio

Os produtos cárneos representam uma das fontes de nutrientes de maior consumo por grande parte da população mundial, fornecendo proteínas, vitaminas e minerais necessários para o bom funcionamento do organismo humano. Devido a sua rica constituição, favorecem o crescimento de diversos microrganismos, especialmente patogênicos. Com isso, como forma de se preservar a qualidade e segurança desse tipo de produto altamente perecível, são utilizados principalmente conservantes sintéticos, que podem ser adicionados em diversas etapas (produção, processamento, tratamento, acondicionamento, transporte ou armazenamento do alimento) (Mpountoukas et al., 2008).

Dentre os conservantes sintéticos de maior utilização em produtos cárneos, principalmente em produtos curados, destacam-se os sais de nitrito (NO^-2) e nitrato (NO_3). O termo "curado", em relação às carnes processadas, refere-se à adição de nitrito ou nitrato com sal e outros ingredientes, como açúcares e fosfatos, à carne para melhor preservação. Esses sais atuam protegendo o alimento contra microrganismos patogênicos, destacando-se as bactérias *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes*, aumentando sua vida útil; contribuem para

coloração rósea característica de produtos cozidos como presunto e mortadela; contribuem para a formação do sabor e exercem ação antioxidante contra gorduras (Sebranek; Bacus, 2007; Barbieri et al., 2013).

Segundo a Legislação Brasileira, é permitida a utilização de nitrato de sódio ou potássio, associados ou não a nitrito de sódio ou potássio, com quantidade residual máxima de 300 mg/Kg de produtos cárneos curados. O nitrito de sódio ou potássio, utilizados de forma isolada ou combinados, possuem como limite residual máximo permitido 150 mg/Kg em produtos cárneos curados (BRASIL, 2006).

Apesar do nitrato de sódio não possuir uma ação antimicrobiana direta no produto, ele é uma importante fonte de nitrito de sódio, sendo convertido a ele em condições anaeróbicas por bactérias pertencentes à microbiota da carne que utilizam uma enzima chamada nitrato redutase. Alguns estudos ainda sugerem que a conversão de nitrato de sódio a nitrito também pode ocorrer devido a redução de nitrato por Fe^{2+} na presença de pequenas concentrações de cobre. Uma vez reduzidos a nitritos, estes reagem com a água em ambientes ácidos, originando ácido nitroso que, por sua vez, se converte a óxido nítrico por ação de substâncias redutoras. O óxido nítrico reage com as proteínas hidrossolúveis da carne, a mioglobina e hemoglobina, conferindo a fixação da coloração rósea características de muitos produtos cárneos (Faria et al., 2001; Hammes, 2012).

A coloração vermelha da carne se deve a um pigmento instável, chamado de mioglobina que se altera na ausência de oxigênio ou quando submetido a elevadas temperaturas. Em produtos curados, a manutenção da cor vermelha é o resultado da reação química entre a mioglobina e o óxido nítrico (resultante da degradação química do nitrito de sódio adicionado), produzindo o pigmento estável denominado nitrosomioglobina que, devido ao calor do cozimento, transforma-se em nitrosohemocromo, de coloração rósea que é mais estável que a nitrosomioglobina, conferindo a coloração característica deste tipo de produto (EMBRAPA, 1996).

Os sais de nitritos e nitratos apresentam diversos mecanismos de ação antimicrobiana, porém nem todos estão totalmente elucidados: podem atuar em enzimas e proteínas; no sistema genético; nas membranas e paredes celulares e na ligação de nutrientes essenciais. Por exemplo, o óxido nítrico pode atuar sobre as enzimas aconitases, pertencentes ao Ciclo de Krebs e fundamentais na interconversão de citrato e isocitrato, inativando-as e levando a diminuições na síntese de ATP. Ácido nitroso pode reagir com tióis, produzindo nitrosotióis, que podem impedir a ação da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, alterando também a síntese de ATP. O

óxido nítrico também pode atuar sobre ribonucleotídeos redutases, enzimas essenciais para a formação do DNA. O nitrato pode desativar grupos importantes para a viabilidade celular, como sulfidrilas, presentes na membrana celular, causando danos permanentes a ela (Cammack et al., 1999).

Diversos mecanismos de ação antimicrobiana do nitrito de sódio sobre espécies do gênero *Clostridium* têm sido propostos. Um dos principais mecanismos está relacionado a uma importante via de obtenção de energia desses microrganismos conhecida como sistema fosforoclástico, no qual o piruvato é oxidado em acetato com a produção concomitante de ATP. O NO reage com o ferro de dois compostos envolvidos no transporte de elétrons e nas reações de oxidação-redução dentro da célula germinada: ferredoxina e piruvato-ferredoxina oxidorreductase. Ele é um potente ligante capaz de formar complexos de coordenação com o ferro em ambos os compostos, inibindo o sistema fosforoclástico e, conseqüentemente, síntese de ATP e o crescimento do microrganismo (Grever; Ruiter, 2001).

Uma das principais características do nitrito é sua forte ação antioxidante, sendo capaz de retardar efetivamente o desenvolvimento da rancidez oxidativa. Seu efeito antioxidante é provavelmente devido aos mesmos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da cor rósea característica de produtos curados envolvendo reações com proteínas heme e íons metálicos; quelação de radicais livres pelo óxido nítrico e a formação de compostos nitroso e nitrosil com propriedades antioxidantes (Sindelar; Milkowski, 2011).

Apesar de serem de grande utilização, esses conservantes representam um forte risco à saúde humana, uma vez que quando utilizados em elevadas concentrações a longo prazo podem interagir com aminas secundárias presentes no alimento, levando a formação de compostos conhecidos como N-nitrosaminas possivelmente carcinogênicas para humanos. O mecanismo e a extensão da formação desses compostos dependem da estrutura da substância amina, da fonte do agente nitrosante e das condições da reação (como pH, alcalinidade da amina e temperatura). Além desses fatores químicos, os microrganismos também podem desenvolver um importante papel na formação de N nitrosaminas por diferentes mecanismos, como pela redução dos nitratos a nitritos; pela degradação de proteínas em aminas e aminoácidos; pela produção de enzimas que realizam a nitrosação e pela estabilidade de um pH adequado para a nitrosação (Drabik-Markiewicz et al., 2009).

2.5. Interações alimentares e nanoemulsões de óleos essenciais

Ainda que os óleos essenciais sejam reconhecidos como seguros à saúde humana, podendo ser utilizados em alimentos como conservantes devido às suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais já descritas, seu uso nesses produtos encontra algumas restrições, uma vez que alguns componentes alimentares podem reduzir a ação dos óleos essenciais.

Alguns estudos têm demonstrado que, quando aplicados em sistemas alimentares, as concentrações dos óleos essenciais a serem utilizadas podem ser de 10 a 100 vezes maiores que as concentrações utilizadas nos ensaios *in vitro*, principalmente pela presença de constituintes lipídicos, proteínas e outros componentes capazes de interagir com o óleo, diminuindo assim sua disponibilidade para atuar contra os microrganismos. Ainda, alguns nutrientes presentes no alimento podem acabar favorecendo a recuperação do microrganismo que sofreu algum tipo de lesão e estresse, diminuindo assim a eficácia do óleo (da Silva et al., 2021).

Por exemplo, elevadas concentrações de gorduras ou proteínas nos alimentos podem acabar protegendo o microrganismo, absorvendo o óleo essencial devido a formação de uma camada protetora, diminuindo assim sua concentração na fase aquosa e consequente eficácia. No entanto, altos níveis de sal podem facilitar a ação destes óleos. Fatores como pH e temperatura também desempenham importante função nessa atividade antimicrobiana (Perricone et al., 2015). Ainda, a estrutura heterogênea de produtos perecíveis, como os produtos cárneos, leva a uma distribuição também heterogênea desses agentes antimicrobianos, dificultando sua ação contra as células bacterianas alvo (Bouarab-Chibane et al., 2018).

Os óleos essenciais ainda podem apresentar alta susceptibilidade a reações químicas, como degradação e oxidação, que são influenciadas por parâmetros ambientais como temperatura, luz e oxigênio atmosférico; elevada insolubilidade em água (uma vez que são compostos lipofílicos); alta volatilidade e tempo de meia-vida curto; e podem inclusive apresentar alguma toxicidade (Donsì et al., 2012; Pavoni et al., 2020).

Outro fator determinante na utilização dos óleos essenciais em alimentos diz respeito às concentrações que normalmente são necessárias para que seja alcançada uma elevada atividade antimicrobiana. Geralmente, é necessário que se utilize uma maior concentração do óleo essencial no alimento para que seja alcançada a mesma atividade antimicrobiana obtida nos

ensaios *in vitro*. Este fato pode levar a um forte impacto organoléptico, já que o uso de conservantes naturais pode alterar o sabor dos alimentos e exceder o limiar de sabor aceitável pelos consumidores (Lv et al., 2011).

Logo, diante dessas restrições que podem dificultar a utilização dos óleos essenciais, são necessários maiores estudos a fim de determinar quais óleos essenciais/ compostos majoritários e quais concentrações podem ser utilizadas nos alimentos sem oferecer riscos à saúde humana; como minimizar os efeitos das interações entre eles e os componentes da matriz alimentar e como reduzir os efeitos sensoriais sem afetar sua ação antimicrobiana.

Uma das formas utilizadas para otimizar as propriedades físico-químicas e biológicas de um composto inicial e que pode ser aplicada aos óleos essenciais e seus compostos majoritários é a utilização destes compostos bioativos na forma de nanoemulsões. As nanoemulsões de óleos essenciais são alternativas eficazes e sustentáveis para a indústria alimentícia que deseja obter um conservante natural, seguro e com menores restrições quando aplicados nos alimentos, uma vez que ela permite um aumento da estabilidade física das substâncias ativas; protegendo-as das interações com os ingredientes alimentares e aumentando sua bioatividade devido ao tamanho subcelular (Donsì et al., 2011; São Pedro et al., 2013).

A nanotecnologia tem despontado nos últimos anos como uma ciência interdisciplinar que permite o desenvolvimento de novos materiais em escala nanométrica (10^{-9} m), alterando dessa forma suas propriedades físicas, químicas e biológicas, além de suas funções. O fato de apresentarem uma diminuição no tamanho da partícula proporciona uma maior superfície de contato que confere as nanopartículas características únicas e, dessa forma, seu enorme potencial para aplicações (Sozer; Kokini, 2009; Bromberg, 2010; Durán; Marcato, 2013).

Há diversos relatos na literatura que trazem os benefícios da encapsulação de óleos essenciais em partículas de escala micrométrica (microencapsulação, como as microemulsões) que acabam protegendo esses compostos de interações com fatores ambientais. Porém, ao se comparar com processos em escala nanométrica, como as nanoemulsões, observa-se que, devido à diminuição do tamanho da partícula para escala nanométrica, há um aumento na área superficial das partículas e com isso um aumento nos mecanismos passivos de absorção da célula microbiana, fazendo com que haja um melhor direcionamento dos compostos encapsulados. Além disso, observa-se uma diminuição na resistência de transferência de massa e com isso um aumento na atividade antimicrobiana, além de uma melhora na solubilidade, tornando a

nanoencapsulação um método mais eficiente do que a microencapsulação (Donsi et al., 2011; Prakash et al., 2018).

As nanoemulsões são dispersões do tipo óleo em água (O/A), em que o óleo é a fase dispersa e a água a fase contínua, ou água em óleo (A/O), em que a água é a fase dispersa e o óleo a fase contínua, de dois líquidos imiscíveis, estabilizados por um agente surfactante apropriado, uma vez que são sistemas termodinamicamente instáveis, cujo diâmetro médio das gotículas é em torno de 500 nm, conferindo-as uma aparência clara/transparente, diferente da coloração branca leitosa associada às emulsões de partículas maiores (Jaiswal et al., 2015; Singh et al., 2017).

O fato de apresentarem partículas tão pequenas faz com que haja forte redução da força gravitacional, permitindo que a ocorrência do movimento Browniano (movimento aleatório das partículas microscópicas imersas em um fluido) seja suficiente para superar a gravidade, evitando assim a sedimentação durante o armazenamento, além da floculação e coalescência das gotículas (Tadros et al., 2004). Elas possuem maior capacidade de solubilização do que as soluções micelares simples, como as emulsões, podendo ser fabricadas com métodos que utilizam pouca energia e têm uma vida útil longa (Shafiq et al., 2007). As nanoemulsões podem ser diluídas em água infinitamente sem que o tamanho das partículas se altere, o que não é observado nas microemulsões (10^{-6} m) (Morales et al., 2003).

As nanoemulsões não são sistemas em equilíbrio, não podendo ser formadas de forma espontânea, necessitando de algum tipo de energia, seja oriunda de forças mecânicas ou de potenciais químicos de seus componentes para sua formação (Solans et al., 2005). O preparo das nanoemulsões pode ser classificado em dois grupos principais: métodos de alta energia, como a homogeneização à alta pressão e a ultrassonificação, que consomem energia significativa para formação das gotículas; e métodos de baixa energia, como o método da temperatura de inversão de fase e ponto de inversão de emulsão, que consomem uma quantidade de energia baixa e exploram outras propriedades específicas do sistema (Gupta et al., 2016).

O método de ultrassonificação é um método muito utilizado em escala laboratorial, devido a sua eficiência e rapidez para formar nanoemulsões estáveis com partículas de tamanhos menores por meio da produção de ondas de intensas vibrações ultrasônicas que rompem as gotículas primárias da emulsão, com a formação de gotículas de tamanhos em escala nanométrica (Holkem et al., 2015).

Com isso, a nanoemulsão de óleos essenciais se apresenta como uma alternativa viável e eficiente para contornar essas limitações, aumentando a estabilidade física dos compostos bioativos; protegendo-os das interações com os ingredientes alimentares; minimizando o impacto nas propriedades sensoriais dos produtos alimentícios e aumentando sua atividade antimicrobiana devido ao seu tamanho subcelular que leva a um aumento nos mecanismos de absorção celular passivos e redução na resistência da transferência de massa (Moraes-Lovison et al., 2017).

As nanoemulsões podem interagir com as células microbianas por meio de quatro mecanismos principais (Donsì; Ferrari, 2016):

- 1) Transporte passivo através da membrana celular: o óleo essencial é transportado para a superfície da membrana por meio das pequenas gotas de nanoemulsões, permitindo assim sua ruptura e aumentando a acessibilidade às células microbianas. Possivelmente ocorre alteração da integridade da bicamada fosfolipídica ou interferência nas proteínas de transporte ativo incorporadas na bicamada fosfolipídica;
- 2) Fusão das gotículas de nanoemulsões com a bicamada fosfolipídica da membrana celular: permite a liberação direcionada dos óleos essenciais;
- 3) Partição na fase aquosa: ocorre a liberação prolongada dos óleos essenciais pelas nanoemulsões conduzida pela partição do óleo essencial entre as gotículas de óleo e a fase aquosa, fazendo com que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais seja prolongada;
- 4) Interação eletrostática com a membrana celular: permite o aumento da ação dos óleos essenciais devido à interação entre as partículas carregadas positivamente das gotículas das nanoemulsões com as partículas carregadas negativamente da parede celular microbiana, ocasionando um aumento da concentração dos óleos essenciais no local de ação.

Diversos trabalhos já foram realizados utilizando nanoemulsões com óleos essenciais ou compostos majoritários a fim de avaliar a atividade antimicrobiana. Ozogul et al. (2020) avaliaram os efeitos antimicrobianos do óleo essencial de tomilho nanoemulsionado e purificado contra patógenos de origem alimentar (*S. Paratyphi* A, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *E. faecalis*) e bactérias deterioradoras de peixes (*P. luteola*, *P. damsela*, *V. vulnificus*, *E. faecalis*, *S. liquefaciens* e *P. mirabilis*), alcançando atividades antimicrobianas significativamente maiores ($P < 0.05$) para as nanoemulsões quando comparadas com o óleo essencial de tomilho purificado, sugerindo que a conversão do óleo essencial de tomilho em nanoemulsões aumentou a atividade

antimicrobiana. Zhang et al. (2017) avaliaram os efeitos antimicrobianos de nanoemulsões elaboradas com misturas dos óleos essenciais de cravo e canela contra *E. coli*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* e *S. aureus*, alcançando maior atividade antimicrobiana da nanoemulsão quando comparada aos tratamentos contendo apenas os óleos essenciais, mesmo em concentrações muito baixas.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação de produtos alimentícios (especialmente de produtos cárneos) representa uma grande preocupação para a indústria de alimentos que utiliza, muitas vezes, conservantes sintéticos para controlar o crescimento de patógenos, como o *Clostridium botulinum*. Porém, estes podem oferecer riscos à saúde do consumidor quando utilizados por longos períodos de tempo. Com isso, a busca por agentes antimicrobianos naturais, como os óleos essenciais, tem se destacado. Esses possuem sua aplicação em alimentos reconhecida como segura (*GRAS*), com ações antimicrobianas e antioxidantes comprovadas. Entretanto, podem interagir com constituintes alimentares, diminuindo suas ações, além de poderem alterar as características organolépticas do produto, devido as suas características sensoriais marcantes, o que não é desejável. Com isso, o estudo de novas formas de aplicação destes no produto se faz necessário, como a utilização de nanoemulsões de óleos essenciais, que faz com que ocorra um aumento da bioatividade desses óleos devido a diminuição do tamanho das partículas, além de os protegerem de interações alimentares.

REFERÊNCIAS

- AMORATI, R., FOTI, M. C., & VALGIMIGLI, L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, *61*, 10835-10847. DOI: 10.1021/jf403496k
- BAG, A., & CHATTOPADHYAY, R. R. (2015). Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. **PloS One**, *10*, e0131321. DOI: 10.1371/journal.pone.0131321
- BAJ, T., BARYLUK, A., & SIENIAWSKA, E. (2018). Application of mixture design for optimum antioxidant activity of mixtures of essential oils from *Ocimum basilicum L.*, *Origanum majorana L.* and *Rosmarinus officinalis L.* **Industrial Crops and Products**, *115*, 52-61. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.02.006
- 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
- BARBIERI, G., BERGAMASCHI, M., BARBIERI, G., & FRANCESCHINI, M. (2013). Kinetics of nitrite evaluated in a meat product. **Meat Science**, *93*, 282-286. DOI: 10.1016/j.meatsci.2012.09.003
- BASSOLÉ, I. H. N., & JULIANI, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, *17*, 3989-4006. DOI: 10.3390/molecules17043989
- BOUARAB-CHIBANE, L., OULAHAL, N., DUMAS, E., THANH, N. T. T., BOUJILA, J., SOUCHARD, J. P., & DEGRAEVE, P. (2018). Effect of interaction with food constituents on plant extracts antibacterial activity. **Food Science and Applied Biotechnology**, *1*, 77-85. DOI: 10.30721/fsab2018.v1.i1.27
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 51 de 29 de dezembro de 2006. **Adota o Regulamento Técnico de Atribuições de Aditivos e seus Limites de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Carneos**. Brasília, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. 2010. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. 2. ed. Brasília.
- BREWER, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, *10*, 221-247. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x
- BROMBERG, R. Aspectos relacionados ao uso da nanotecnologia na indústria de alimentos. **Tecno Carnes Expresso**, p. 72-76, 2010.
- BROWN, J. L., TRAN-DINH, N., & CHAPMAN, B. (2012). *Clostridium sporogenes* PA 3679 and its uses in the derivation of thermal processing schedules for low-acid shelf-stable foods and as a research model for proteolytic *Clostridium botulinum*. **Journal of Food Protection**, *75*, 779-792. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-391
- BROWN, K. L. (2000). Control of bacterial spores. **British Medical Bulletin**, *56*, 158-171. DOI: 10.1258/0007142001902860
- BRUNT, J., CROSS, K. L., & PECK, M. W. (2015). Apertures in the *Clostridium sporogenes* spore coat and exosporium align to facilitate emergence of the vegetative cell. **Food Microbiology**, *51*, 45-50. DOI: 10.1016/j.fm.2015.04.013
- BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, *94*, 223-253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- CALO, J. R., CRANDALL, P. G., O'BRYAN, C. A., & RICKE, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. **Food Control**, *54*, 111-119. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.12.040

- CAMMACK, R., JOANNOU, C. L., CUI, X. Y., MARTINEZ, C. T., MARAJ, S. R., & HUGHES, M. N. (1999). Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, *1411*, 475-488. DOI: 10.1016/S0005-2728(99)00033-X
- CARTER, A. T., & PECK, M. W. (2015). Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* Group I and Group II. **Research in Microbiology**, *166*, 303-317. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.10.010
- CERESER, N. D., COSTA, F. M. R., ROSSI JÚNIOR, O. D., SILVA, D. A. R. D., & SPEROTTO, V. D. R. (2008). Botulismo de origem alimentar. **Ciência Rural**, *38*, 280-287. DOI: 10.1590/S0103-84782008000100049
- CHALK, C. H., BENSTEAD, T. J., POUND, J. D., & KEEZER, M. R. (2019). Medical treatment for botulism. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, *4*. DOI: 10.1002/14651858.CD008123.pub4
- CHO, W. I., & CHUNG, M. S. (2018). Sporicidal activities and mechanism of surfactant components against *Clostridium sporogenes* spores. **Journal of Food Science and Technology**, *55*, 4675-4680. DOI: 10.1007/s13197-018-3384-7
- CORTÉS-SÁNCHEZ, A. J., & SALGADO-CRUZ, M. P. (2017). *Escherichia coli* O157: H7 in the context of foodborne diseases and public health. **Environmental and Experimental Biology**, *15*, 191-200. DOI: 10.22364/eeb.15.19
- da SILVA, B. D., BERNARDES, P. C., PINHEIRO, P. F., FANTUZZI, E., & ROBERTO, C. D. (2021). Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. **Meat Science**, *176*, 108463. DOI: 10.1016/j.meatsci.2021.108463
- de MACEDO, A. T., SANTOS, J. C. B., COELHO, R. R., FIRMO, W. D. C. A., & NUNES, M. A. S. (2017). Intoxicações por *Clostridium botulinum*, *Vibrio cholerae* e *Salmonella typhi* no Brasil entre os anos de 2001 e 2014. **Revista Ceuma Perspectivas**, *30*, 180-192. DOI: 10.24863/rccp.v30i2.112
- de MELO, E. S., DE AMORIM, W. R., PINHEIRO, R. E. E., DO NASCIMENTO CORRÊA, P. G., DE CARVALHO, S. M. R., SANTOS, A. R. S. S., & DE SOUSA, F. V. (2018). Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil. **PUBVET**, *12*, 131. DOI: 10.31533/pubvet.v12n10a191.1-9
- de OLIVEIRA, T. L. C., DE ARAÚJO SOARES, R., RAMOS, E. M., DAS GRAÇAS CARDOSO, M., 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. **International Journal of Food Microbiology**, *144*, 546-555. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.022
- DEL RÉ, P. V., & JORGE, N. (2012). Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 389-399. DOI: 10.1590/S1516-05722012000200021
- DIAO, W. R., HU, Q. P., ZHANG, H., & XU, J. G. (2014). Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, *35*, 109-116. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.06.056
- DONSÌ, F., & FERRARI, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, *233*, 106-120. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.07.005
- DONSÌ, F., ANNUNZIATA, M., SESSA, M., & FERRARI, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT-Food Science and Technology**, *44*, 1908-1914. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.03.003

- DONSÌ, F., ANNUNZIATA, M., VINCENSI, M., & FERRARI, G. (2012). Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. **Journal of biotechnology**, *159*, 342-350. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.07.001
- DRABIK-MARKIEWICZ, G., VAN DEN MAAGDENBERG, K., DE MEY, E., DEPREZ, S., KOWALSKA, T., & PAELINCK, H. (2009). Role of proline and hydroxyproline in N-nitrosamine formation during heating in cured meat. **Meat Science**, *81*, 479-486. DOI: 10.1016/j.meatsci.2008.10.002
- DURÁN, N., & MARCATO, P. D. (2013). Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, *48*, 1127-1134. DOI: 10.1111/ijfs.12027
- ELSHAFIE, S. S., ELSHAFIE, H. S., EL BAYOMI, R. M., CAMELE, I., & MORSHDY, A. E. (2022). Evaluation of the antimicrobial activity of four plant essential oils against some food and phytopathogens isolated from processed meat products in Egypt. **Foods**, *11*, 1159. DOI: 10.3390/foods11081159
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embutidos, Frios e Defumados. Coleção Saber, 4. Ed.: Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 1996.
- EMBUSCADO, M. E. (2015). Spices and herbs: Natural sources of antioxidants—a mini review. **Journal of Functional Foods**, *18*, 811-819. DOI: 10.1016/j.jff.2015.03.005
- FALLEH, H., JEMAA, M. B., SAADA, M., & KSOURI, R. (2020). Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. **Food Chemistry**, *330*, 127268. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127268
- FARIA, J. A. F., FELÍCIO, P. E., NEVES, M. A., & ROMANO, M. A. (2001). Formação e estabilidade da cor de produtos cárneos curados—revisão. **Rev Tecnol Carnes**, *3*, 16-22.
- FIGUEIREDO, A. C., BARROSO, J. G., PEDRO, L. G., & SCHEFFER, J. J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, *23*, 213-226. DOI: 10.1002/ffj.1875
- GARCÍA-DÍEZ, J., ALHEIRO, J., FALCO, V., FRAQUEZA, M. J., & PATARATA, L. (2017). Chemical characterization and antimicrobial properties of herbs and spices essential oils against pathogens and spoilage bacteria associated to dry-cured meat products. **Journal of Essential Oil Research**, *29*, 117-125. DOI: 10.1080/10412905.2016.1212738
- GELLI, D. S., JAKABI, M., & SOUZA, A. D. (2002). Botulism: a laboratory investigation on biological and food samples from cases and outbreaks in Brazil (1982-2001). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, *44*, 321-324. DOI: 10.1590/S0036-46652002000600005
- GOBBO-NETO, L., & LOPES, N. P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, *30*, 374-381. DOI: 10.1590/S0100-40422007000200026
- GREVER, A. B., & RUITER, A. (2001). Prevention of *Clostridium* outgrowth in heated and hermetically sealed meat products by nitrite—a review. **European Food Research and Technology**, *213*, 165-169. DOI: 10.1007/s002170100341
- GUERRA, F. Q. S., MENDES, J. M., OLIVEIRA, W. A., RODRIGUES, A. S., SANTOS, B. H. C., LIMA, E. O. (2012). Atividade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre cepas de *Acinetobacter* spp. multidrogas-resistentes. **Revista de Biologia e Farmácia**, *7*, 1-10.
- GUPTA, A., ERAL, H. B., HATTON, T. A., & DOYLE, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft matter**, *12*, 2826-2841. DOI: 10.1039/C5SM02958A

- GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C., & BOURKE, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, *124*, 91-97. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.028
- HAMMES, W. P. (2012). Metabolism of nitrate in fermented meats: the characteristic feature of a specific group of fermented foods. **Food Microbiology**, *29*, 151-156. DOI: 10.1016/j.fm.2011.06.016
- HERNÁNDEZ-OCHOA, L., AGUIRRE-PRIETO, Y. B., NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V., GUTIERREZ-MENDEZ, N., & SALAS-MUÑOZ, E. (2014). Use of essential oils and extracts from spices in meat protection. **Journal of Food Science and Technology**, *51*, 957-963. DOI: 10.1007/s13197-011-0598-3
- HOLKEM, A. T., CODEVILLA, C. F., DA SILVA, C. D. B., & DE MENEZES, C. R. (2015). Técnicas de preparação de sistemas nanotecnológicos aplicados a alimentos. **Ciência e Natura**, *37*, 87-96. DOI: 10.5902/2179-460X19720
- HYLDGAARD, M., MYGIND, T., & MEYER, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, *3*, 12. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00012
- JAISWAL, M., DUDHE, R., & SHARMA, P. K. (2015). Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*, *5*, 123-127. DOI: 10.1007/s13205-014-0214-0
- KALEMBA, D. A. A. K., & KUNICKA, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, *10*, 813-829. DOI: 10.2174/0929867033457719
- KEYNAN, A., EVENCHIK, Z., HALVORSON, H. O., & HASTINGS, J. W. (1964). Activation of bacterial endospores. **Journal of Bacteriology**, *88*, 313-318.
- KHORSHIDIAN, N., YOUSEFI, M., KHANNIRI, E., & MORTAZAVIAN, A. M. (2018). Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, *45*, 62-72. DOI: 10.1016/j.ifset.2017.09.020
- KUBIAK, A. M., POEHLEIN, A., BUDD, P., KUEHNE, S. A., WINZER, K., THEYS, J., & MINTON, N. P. (2015). Complete genome sequence of the nonpathogenic soil-dwelling bacterium *Clostridium sporogenes* strain NCIMB 10696. **Genome Announcements**, *3*, e00942-15. DOI: 10.1128/genomeA.00942-15
- LAW, J. W. F., AB MUTALIB, N. S., CHAN, K. G., & LEE, L. H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. **Frontiers in Microbiology**, *5*, 770. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00770
- LEGGETT, M. J., MCDONNELL, G., DENYER, S. P., SETLOW, P., & MAILLARD, J. Y. (2012). Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. **Journal of Applied Microbiology**, *113*, 485-498. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05336.x
- LV, F., LIANG, H., YUAN, Q., & LI, C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, *44*, 3057-3064. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.07.030
- MARTÍNEZ-ZAMORA, L., PEÑALVER, R., ROS, G., & NIETO, G. (2021). Substitution of synthetic nitrates and antioxidants by spices, fruits and vegetables in Clean label Spanish chorizo. **Food Research International**, *139*, 109835. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109835
- MITH, H., DURE, R., DELCENSERIE, V., ZHIRI, A., DAUBE, G., & CLINQUART, A. (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. **Food Science & Nutrition**, *2*, 403-416. DOI: 10.1002/fsn3.116

- MOON, S. H., WAITE-CUSIC, J., & HUANG, E. (2020). Control of *Salmonella* in chicken meat using a combination of a commercial bacteriophage and plant-based essential oils. **Food Control**, *110*, 106984. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106984
- MORAES-LOVISON, M., MAROSTEGAN, L. F., PERES, M. S., MENEZES, I. F., GHIRALDI, M., RODRIGUES, R. A., & PINHO, S. C. (2017). Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: Production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken pâté. **LWT**, *77*, 233-240. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.11.061
- MORALES, D., GUTIÉRREZ, J. M., GARCIA-CELMA, M. J., & SOLANS, Y. C. (2003). A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nano-emulsion formation. **Langmuir**, *19*, 7196-7200. DOI: 10.1021/la0300737
- MPOUNTOUKAS, P., VANTARAKIS, A., SIVRIDIS, E., & LIALIARIS, T. (2008). Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. **Food and Chemical Toxicology**, *46*, 2390-2393. DOI: 10.1016/j.fct.2008.03.021
- NAZZARO, F., FRATIANNI, F., DE MARTINO, L., COPPOLA, R., & DE FEO, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, *6*, 1451-1474. DOI: 10.3390/ph6121451
- NEWELL, D. G., KOOPMANS, M., VERHOEF, L., DUIZER, E., AIDARA-KANE, A., SPRONG, H., & VAN DER GIESSEN, J. (2010). Food-borne diseases—the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, *139*, S3-S15. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021
- NTALLI, N. G., FERRARI, F., GIANNAKOU, I., & MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. (2011). Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematocidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. **Pest Management Science**, *67*, 341-351. DOI: 10.1002/ps.2070
- OLGUÍN-ARANEDA, V., BANAWAS, S., SARKER, M. R., & PAREDES-SABJA, D. (2015). Recent advances in germination of *Clostridium* spores. **Research in Microbiology**, *166*, 236-243. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.07.017
- OOTANI, M. A., AGUIAR, R. W., RAMOS, A. C., BRITO, D. R., SILVA, J. B. D., & CAJAZEIRA, J. P. (2013). Use of essential oils in agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, *4*, 162-175. DOI: 10.20873/jbb.uft.cemaf.v4n2.ootani
- ORHAN-YANIKAN, E., DA SILVA-JANEIRO, S., RUIZ-RICO, M., JIMÉNEZ-BELENGUER, A. I., AYHAN, K., & BARAT, J. M. (2019). Essential oils compounds as antimicrobial and antibiofilm agents against strains present in the meat industry. **Food Control**, *101*, 29-38. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.02.035
- OZOGUL, Y., BOĞA, E. K., AKYOL, I., DURMUS, M., UCAR, Y., REGENSTEIN, J. M., & KÖŞKER, A. R. (2020). Antimicrobial activity of thyme essential oil nanoemulsions on spoilage bacteria of fish and food-borne pathogens. **Food Bioscience**, *36*, 100635. DOI: 10.1016/j.fbio.2020.100635
- PANESSA-WARREN, B. J., TORTORA, G. T., & WARREN, J. B. (1994). Electron Microscopy of *C. sporogenes* endospore attachment and germination. **Scanning**, *16*, 227-240. DOI: 10.1002/sca.4950160408
- PAVONI, L., PERINELLI, D. R., BONACUCINA, G., CESPI, M., & PALMIERI, G. F. (2020). An overview of micro-and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. **Nanomaterials**, *10*, 135. DOI: 10.3390/nano10010135
- PECK, M. W., STRINGER, S. C., & CARTER, A. T. (2011). *Clostridium botulinum* in the post-genomic era. **Food Microbiology**, *28*, 183-191. DOI: 10.1016/j.fm.2010.03.005
- PERRICONE, M., ARACE, E., CORBO, M. R., SINIGAGLIA, M., & BEVILACQUA, A. (2015). Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. **Frontiers in Microbiology**, *6*, 76. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00076

- PIGNATA-VIANA, M. C., SANTOS, J. S., & VIANA, P. T. (2019). Epidemiologia e fatores de riscos relacionados à intoxicação alimentar causada por *Clostridium botulinum*: uma revisão narrativa. **Clinical and Biomedical Research**, 39, 161-170. DOI: 10.4322/2357-9730.85961
- POMBO, J. C. P., RIBEIRO, E. R., PINTO, R. DE L., & SILVA, B. J. M. DA. (2018). Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Segurança Alimentar E Nutricional**, 25, 108-117. DOI: 10.20396/san.v25i2.8651785
- PRAKASH, B., KUJUR, A., YADAV, A., KUMAR, A., SINGH, P. P., & DUBEY, N. K. (2018). Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, 89, 1-11. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.01.018
- RAUT, J. S., & KARUPPAYIL, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, 62, 250-264. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.05.055
- SAKKAS, H., & PAPADOPOULOU, C. (2017). Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 27, 429-438. DOI: 10.4014/jmb.1608.08024
- SÃO PEDRO, A., SANTO, I., SILVA, C., DETONI, C., & ALBUQUERQUE, E. (2013). The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them* (Méndez-Vilas, A., ed.) Formatex Research Center Publisher, 2, 1364-1374.
- SARICA OGLU, F. T., & TURHAN, S. (2020). Physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties of mechanically deboned chicken meat protein films enriched with various essential oils. **Food Packaging and Shelf Life**, 25, 100527. DOI: 10.1016/j.fpsl.2020.100527
- SEBRANEK, J. G., & BACUS, J. N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? **Meat Science**, 77, 136-147. DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.03.025
- SETLOW, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. **Journal of Applied Microbiology**, 101, 514-525. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x
- SHAFIQ, S., SHAKEEL, F., TALEGAONKAR, S., AHMAD, F. J., KHAR, R. K., & ALI, M. (2007). Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 66, 227-243. DOI: 10.1016/j.ejpb.2006.10.014
- SHAH, I. M., LAABERKI, M. H., POPHAM, D. L., & DWORKIN, J. (2008). A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. **Cell**, 135, 486-496. DOI: 10.1016/j.cell.2008.08.039
- SHAHIDI, F., & AMBIGAIPALAN, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of Functional Foods**, 18, 820-897. DOI: 10.1016/j.jff.2015.06.018
- SHARMA, S. (2015). Food Preservatives and their harmful effects. **International Journal of Scientific and Research Publications**, 5, 1-2.
- SILVA, A. P. DA; LIMA, B. T. DE M.; CÂNDIDO, M. DE B.; ARAÚJO, J. M. D. DE; DUARTE, A. B. S.; ANDRADE JÚNIOR, F. P. DE. (2020). Epidemiological profile of people affected by botulism in Brazil between 2008 and 2018. **Research, Society and Development**, [S. l.], 9, e101942891. DOI: 10.33448/rsd-v9i4.2891
- SILVA, F. V., & GIBBS, P. A. (2010). Non-proteolytic *Clostridium botulinum* spores in low-acid cold-distributed foods and design of pasteurization processes. **Trends in Food Science & Technology**, 21, 95-105. DOI: 10.1016/j.tifs.2009.10.011

- SIMÕES, C. M. O., & SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMOES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2004. p. 467- 495.
- SINDELAR, J. J., & MILKOWSKI, A. L. (2011). Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curing and examining the risk/benefit of its use. **American Meat Science Association White Paper Series**, 3, 1-14.
- SINGH, Y., MEHER, J. G., RAVAL, K., KHAN, F. A., CHAURASIA, M., JAIN, N. K., & CHOURASIA, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, 252, 28-49. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.03.008
- SOLANS, C., IZQUIERDO, P., NOLLA, J., AZEMAR, N., & GARCIA-CELMA, M. J. (2005). Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 10, 102-110. DOI: 10.1016/j.cocis.2005.06.004
- SOLÓRZANO-SANTOS, F., & MIRANDA-NOVALES, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, 23, 136-141. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.08.005
- SOZER, N., & KOKINI, J. L. (2009). Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, 27, 82-89. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.10.010
- SWAMY, M. K., AKHTAR, M. S., & SINNIAH, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2016. DOI: 10.1155/2016/3012462
- TADROS, T., IZQUIERDO, P., ESQUENA, J., & SOLANS, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, 108, 303-318. DOI: 10.1016/j.cis.2003.10.023
- TAMGUE, O., LOUIS, B., NGUEFACK, J., DONGMO, J. B. L., & DAKOLE, C. D. (2010). Synergism and antagonism of essential oil fractions of *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **International Journal of Plant Pathology**, 2, 51-62. DOI: 10.3923/ijpp.2011.51.62
- TOMAINO, A., CIMINO, F., ZIMBALATTI, V., VENUTI, V., SULFARO, V., DE PASQUALE, A., & SAIJA, A. (2005). Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, 89, 549-554. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.03.011
- VASILJEVIĆ, B., MITIĆ-ĆULAFIĆ, D., DJEKIĆ, I., MARKOVIĆ, T., KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J., TOMASEVIĆ, I., & NIKOLIĆ, B. (2019). Antibacterial effect of *Juniperus communis* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* in vitro and in wine marinated beef. **Food Control**, 100, 247-256. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.01.025
- VIUDA-MARTOS, M., RUIZ NAVAJAS, Y., SÁNCHEZ ZAPATA, E., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., & PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. (2010). Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. **Flavour and Fragrance Journal**, 25, 13-19. <https://doi-org/10.1002/ffj.1951>
- WORAPRAYOTE, W., MALILA, Y., SORAPUKDEE, S., SWETWIWATHANA, A., BENJAKUL, S., & VISESSANGUAN, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **Meat Science**, 120, 118-132. DOI: 10.1016/j.meatsci.2016.04.004
- ZHANG, S., ZHANG, M., FANG, Z., & LIU, Y. (2017). Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions. **LWT**, 75, 316-322. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.08.046

SEGUNDA PARTE

ARTIGO: Óleos essenciais emulsionados e nanoemulsionados no controle de *C. botulinum* e *C. sporogenes* em mortadela

Juliana Junqueira Pinelli^{1*}; Roberta Hilsdorf Piccoli^{1,2}

¹Department of Biology, Federal University of Lavras, Av. Doutor Sylvio Menicucci 1001, 37200000. Lavras, Minas Gerais, Brazil.

²Department of Food Science, Federal University of Lavras, Av. Doutor Sylvio Menicucci 1001, 37200000. Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Formatado de acordo com LWT

Autora correspondente: jujpinelli@gmail.com

RESUMO

Avaliou-se a atividade antimicrobiana de nanoemulsões elaboradas com misturas de óleos essenciais de alho, cravo botão pimenta rosa e pimenta preta sobre endósporos e células vegetativas de *Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes* inoculados em mortadela, elaborada com 50 ppm de nitrito de sódio (NaNO₂). Também foram avaliados os efeitos sobre as características tecnológicas (pH, atividade de água e cor) e sensoriais do produto. As combinações de óleos essenciais e suas nanoemulsões apresentaram efeitos esporocidas sobre os endósporos de ambos os microrganismos testados, não sendo observada contagem a partir do décimo dia de análise. Ainda, foram observados efeitos bacteriostáticos sobre os microrganismos estudados. Quanto às características tecnológicas e sensoriais do produto, a adição dos óleos essenciais combinados teve impacto negativo na cor das mortadelas e no sabor/aroma. Apesar do forte apelo comercial pela adição de conservantes naturais em alimentos, os efeitos no sabor e na cor devem ser considerados. Este estudo mostra que a aplicação de óleos essenciais emulsionados e nanoemulsionados como conservante natural em produtos cárneos tem alcançado bons resultados, incentivando novas pesquisas nesse sentido.

Palavras-chave: Essential oils; natural preservatives; nanoemulsions; *Clostridium botulinum*; food security; endospores; meat products.

1. INTRODUÇÃO

A atual demanda do mercado consumidor por produtos alimentícios “*Clean Label*”, que sejam mais saudáveis, seguros e de maior entendimento devido a uma clara rotulagem, tem incentivado à indústria de alimentos a buscar novas estratégias naturais de preservação que não alterem a qualidade destes produtos e que possam conferir maior segurança a estes, visando proporcionar uma melhor qualidade de vida aos seus consumidores por meio de um produto com um apelo diferencial de saudabilidade e livre de aditivos sintéticos (Yong et al., 2021).

Com isso, tem-se desenvolvido pesquisas em busca de aditivos naturais com ação conservante que possam substituir total ou parcialmente os aditivos sintéticos tradicionalmente utilizados (Tomović et al., 2020; Pilevar et al., 2017; de Oliveira et al., 2011), principalmente em produtos cárneos processados, nos quais se destacam o nitrito e nitrato de sódio. Estes conservantes são necessários para manutenção das características dos produtos curados, porém oferecem risco à saúde do consumidor quando consumidos em excesso, levando a controvérsias quanto a sua utilização (Ziarati et al., 20018; Bedale et al., 2016; Sindelar & Milkowski, 2011).

A cura de produtos cárneos representa um método de preservação do alimento, por meio da adição de sais de nitrato e nitrito e outros ingredientes, como cloreto de sódio e fosfatos, aumentando a qualidade e segurança do produto (Sebranek, 2009). Dentre os ingredientes utilizados, o nitrito de sódio desempenha papel fundamental nas características únicas e distintas desse tipo de produto, como coloração, sabor e textura, além de possuir forte ação antioxidante e antimicrobiana (Sebranek & Bacus, 2007).

Apesar de apresentar ampla utilização por prevenir e controlar o crescimento microbiano, especialmente em se tratando da bactéria patogênica *Clostridium botulinum* (Jo et al., 2020), seu uso requer atenção, uma vez que pode levar a formação de substâncias químicas carcinogênicas conhecidas como N-nitrosaminas durante o processamento térmico e armazenamento do produto

(Herrmann et al., 2015). O risco de formação dessas substâncias tóxicas neste tipo de produto ocasionado, principalmente, pelo uso de concentrações mais elevadas dos sais de nitrito necessárias para o controle do crescimento microbiano e inibição da germinação dos esporos de *C. botulinum*, fez com que em, 2015, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer declarasse que produtos cárneos processados são carcinogênicos aos humanos (Domingo & Nadal, 2017; Sindelar & Milkowski, 2011).

Clostridium botulinum é uma bactéria anaeróbia e esporulada que desperta grande interesse na indústria alimentícia devido a sua elevada patogenicidade. Ela é produtora de potentes neurotoxinas que levam ao desenvolvimento de uma doença potencialmente letal conhecida como botulismo (Lonati et al., 2020). Ainda, a distribuição ampla de seus esporos no ambiente, permitindo que alcancem facilmente os alimentos, e elevada resistência desses aos métodos de processamento tradicionalmente aplicados juntamente com a capacidade desse microrganismo de crescer e formar toxinas nos alimentos em condições que seriam desfavoráveis para a grande maioria dos patógenos de origem alimentar fazem com que a indústria alimentícia tenha grande preocupação com o crescimento dessa bactéria (Johnson, 2019; Peck & van Vliet, 2016).

Devido à elevada patogenicidade do *Clostridium botulinum*, estudos atuais têm utilizado um microrganismo substituto, *Clostridium sporogenes*, nos ensaios microbiológicos envolvendo, principalmente, resistência de seus esporos, uma vez que este não produz toxinas e é filogeneticamente semelhante ao *C. botulinum* tipo A, além de seus endósporos possuírem semelhanças morfológicas e genéticas com *C. botulinum* (Brown et al., 2012).

Diante da crescente percepção negativa da utilização desses conservantes sintéticos em alimentos, tem-se intensificado o interesse tanto da indústria quanto dos consumidores de se substituir esses por compostos naturais capazes de exercer as mesmas funções antimicrobianas e

antioxidantes, porém sem oferecer riscos à saúde do consumidor. Nesse contexto, destacam-se os óleos essenciais (OEs) condimentares e aromáticos obtidos de plantas (Dias et al., 2022; Hastaoğlu et al., 2021; Bakhtiary et al., 2018).

Os OEs são misturas complexas de compostos voláteis extraídos de diferentes partes e tipos de plantas, com aplicação nas mais diversas áreas, como na indústria farmacêutica, de cosméticos, área agrícola e de alimentos (El Asbahani et al., 2015). Seu uso em alimentos é reconhecido como seguro (*GRAS*) (FDA, 2017), sendo muito utilizados como aromatizantes em diversos produtos. Possuem ação antimicrobiana e antioxidante comprovada devido a sua constituição química variada, podendo apresentar até 60 componentes individuais, em que alguns aparecem em concentrações mais elevadas (componentes majoritários) e os demais estão presentes em traços (Chouhan et al., 2017).

Apesar dos OEs terem seu uso como agente antimicrobiano comprovado, sua aplicação em alimentos encontra restrições principalmente pela sua elevada volatilidade; baixa solubilidade em água e pelas elevadas concentrações que são necessárias para que seja alcançada a mesma atividade antimicrobiana nos alimentos do que a encontrada nos ensaios *in vitro*, alterando então as características organolépticas do produto e excedendo o limite de sabor aceitável pelos consumidores (Rao et al., 2019; Fernández-López & Viuda-Martos, 2018; Lv et al., 2011). Ainda, a presença de constituintes lipídicos, proteínas e outros componentes na matriz alimentar podem interagir com o óleo, afetando sua disponibilidade e conseqüentemente sua ação (Hyldgaard et al., 2012). Diante desse cenário, o uso da nanotecnologia tem apresentado grande potencial para contornar esses problemas, seja através da nanoencapsulação dos óleos essenciais, que busca uma liberação controlada desses compostos bioativos, ou pela utilização de nanoemulsões desses óleos nos alimentos (Moazeni et al., 2021; Yazgan, 2020; Benjema et al., 2018; Moghimi et al., 2016).

As nanoemulsões são sistemas coloidais que podem encapsular, proteger e liberar compostos bioativos lipofílicos, como os OEs, aumentando sua solubilidade e estabilidade devido ao pequeno tamanho das partículas (Barradas & Silva, 2021). Ainda, as nanoemulsões promovem uma liberação sítio-controlada, protegendo os compostos bioativos de degradações ambientais (Pavoni et al., 2020). Assim, em muitos aspectos, os óleos essenciais nanoemulsionados podem apresentar maior estabilidade físico-química, menor impacto sensorial nos produtos onde são incorporados, bem como maior atividade antimicrobiana.

Em busca de alternativa ao uso de elevadas concentrações de nitrito, este estudo comparou a atividade antimicrobiana sinérgica entre combinações dos óleos essenciais de alho, cravo botão, pimenta rosa e pimenta preta, e suas nanoemulsões sobre endósporos de *Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes* inoculado em mortadela contendo baixo teor de nitrito e sobre as características sensoriais e tecnológicas do produto, como pH, atividade de água e cor.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Óleos essenciais e caracterização química (GC-MS e GC-FID)

Os óleos essenciais de alho (*Allium sativum*), cravo botão (*Eugenia caryophyllus*), pimenta rosa (*Schinus terebinthifolia*) e pimenta preta (*Piper nigrum*) (100 % puros) foram adquiridos na Ferquima Ind. e Comércio LTDA (Vargem Grande, São Paulo, Brazil). Seus constituintes químicos foram caracterizados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) (Shimadzu, GCMS-QP2010 Plus) utilizando coluna cromatográfica do tipo SBLTM-5MS de 0.25 µm de espessura, 30 m de comprimento e 0.25 mm de diâmetro interno (fase ligada; 5% diphenyl, 95% dimethyl polysiloxane). Utilizou-se hélio como gás de arraste a um fluxo de 1.18 mL/min. Foi empregada rampa de temperatura de 60°C a 240°C, numa taxa de 3°C/min, depois para 300°C a 10°C/min e mantida constante por 7 min. Os demais parâmetros

utilizados foram: temperatura de injeção de 220°C; modo de injeção SPLIT 1:100; temperatura da fonte de íons: 200°C; temperatura da interface: 240°C; corte do solvente: 2.4 min e faixa de m/z analisada: 45-500 Da. Injetou-se 0.1 µL de cada óleo essencial diluído em hexano a uma taxa de partição de 1:100 v:v. Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (GC-FID) (Shimadzu, FID-2010) foram utilizados para quantificação. Os parâmetros experimentais foram os mesmos aplicados na identificação.

Os espectros de massas obtidos foram comparados à biblioteca do equipamento Wiley 8.0 e os índices de retenção dos compostos calculados após análise prévia de uma série homóloga de alcanos, comparando-se os dados obtidos com os da literatura (Adams, 2007).

2.2. Microrganismo, obtenção e padronização do inóculo (endósporos)

Clostridium botulinum INCQS 00054 e *Clostridium sporogenes* INCQS 00004 utilizados neste estudo foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Seguiu-se metodologia proposta por Martins et al. (2021) com pequenas alterações para reativação, obtenção e padronização dos endósporos.

A reativação da cepa ocorreu em 10 mL de meio Differential Reinforced *Clostridium* Base Broth (DRCBB; Himedia®, Mumbai, Índia) a 37°C/24 h, em condições de anaerobiose gerada pela adição de óleo mineral estéril. Decorrido este período, alíquotas de 0.1 mL foram transferidas novamente para tubos contendo 10 mL do mesmo meio de cultura nas mesmas condições de incubação por mais 24 h. Alíquotas de 0.1 mL da cultura foram transferidas para placas de Petri contendo Ágar AK n° 2 (Himedia®, Mumbai, Índia) e incubadas novamente a 37°C/120 h em anaerobiose (geradores de anaerobiose ANAEROBAC) (Probac do Brasil®, São Paulo, Brasil) para a obtenção dos endósporos.

O número de endósporos foi padronizado após lavagem da superfície do ágar com 10 mL de solução salina (0.9% m/v) e observação no microscópio óptico dos endósporos, utilizando a técnica de Wirtz-Conklin para corá-los com solução corante de Verde Malaquita (5% m/v) e contra corante Safranina (0.5% m/v). Após verificação da presença de endósporos, a suspensão obtida foi submetida ao choque térmico (70°C/15 min) e rápido resfriamento em banho de gelo, com o intuito de eliminar todas as células vegetativas ainda presentes.

Posteriormente, alíquotas de 1 mL foram transferidas para eppendorfs e centrifugadas a 10.000 rpm/5 min. Descartou-se o sobrenadante, adicionando-se 1 mL de meio de congelamento com dupla concentração de glicerol (30 mL de glicerol; 0.5 g peptona bacteriológica; 0.3 g extrato de levedura; 0.5 g NaCl; 100 mL água destilada), congelando-se as amostras. A suspensão de esporos foi padronizada a 10^7 UFC/ mL por meio da contagem do número de colônias em placas, utilizando-se DRCB Ágar (Himedia[®], Mumbai, Índia) por meio do plaqueamento em profundidade com sobrecamada. As placas foram incubadas em 37°C/48 h em anaerobiose, gerada por geradores de anaerobiose ANAEROBAC (Probac do Brasil[®], São Paulo, Brasil).

2.3. Atividade antimicrobiana *in vitro*

As concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos óleos essenciais foram determinadas por meio da técnica de macrodiluição em caldo (NCCLS, 2019). Os óleos foram diluídos em DRCBB acrescido de 0.5% (v/v) de Tween 80. Alíquotas de 25 µL da suspensão padronizada de endósporos (10^7 UFC/mL) foram transferidas para tubos de rosca, contendo 5 mL de DRCBB acrescido de 0.5% de Tween 80 e óleos essenciais nas concentrações de: 0; 0,09375; 0.1875; 0.375; 0.75; 1.5 e 3.0% (v/v). Após homogeneização, os tubos foram incubados a 37°C/24 h em anaerobiose. Decorrido esse período alíquotas de 200 µL das culturas foram transferidas

novamente para tubos de rosca contendo 5 mL de DRCBB, incubando a 37 °C/48 h em anaerobiose. Foram consideradas CMI dos óleos a menor concentração de cada um onde não se observou crescimento do microrganismo nos tubos após incubação, observando-se a turvação do meio e formação de gás. O experimento foi realizado em triplicata e três repetições.

O estudo da sinergia antimicrobiana entre os óleos foi realizado com base nas CMI de cada. Devido às similaridades encontradas entre os microrganismos estudados, definiu-se uma combinação de óleos essenciais a ser testada para ambas as cepas baseada em 1/3 dos valores de CMI encontrados para cada óleo essencial sobre os endósporos de *C. sporogenes*, com o intuito de comparar o comportamento de ambos os microrganismos estudados. As variações nas concentrações dos óleos foram geradas utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) no programa Chemoface versão 1.5, utilizando “Experimental design”, por meio de 27 ensaios. As variáveis +2 e -2 foram calculadas de acordo com a CMI (Tabela 1).

Tabela 1 Variáveis codificadas e valores reais das concentrações de óleos essenciais (%) utilizadas nos ensaios da combinação.

Variáveis codificadas	-2	-1	0	+1	+2
Combinação	Óleo essencial (%)				
Alho	0.05	0.29	0.53	0.76	1.00
Cravo	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
Pimenta rosa	0.05	0.29	0.53	0.76	1.00
Pimenta preta	0.05	0.29	0.53	0.76	1.00

As porcentagens foram calculadas com base em 1/3 da concentração mínima inibitória (CMI) de cada óleo essencial sobre os endósporos de *Clostridium sporogenes*.

2.4. Preparo da nanoemulsão dos óleos essenciais

Após os ensaios definidos pelo DCCR serem realizados, foi selecionado um ensaio da combinação de óleos que apresentou atividade antimicrobiana contra os endósporos de ambos os microrganismos avaliados para a elaboração da emulsão e sua respectiva nanoemulsão, pensando

no impacto sensorial da aplicação destes na mortadela. Assim, foram avaliados dois tratamentos para cada cepa: um contendo os óleos emulsionados e um com os óleos nanoemulsionados. A nanoemulsão foi preparada segundo metodologia proposta por Pinelli et al. (2021) com modificações, com 10% de óleos essenciais, 30% de agente tensoativo não iônico, Tween 80, e 60% de água destilada em 100 mL. Ressalta-se que, apesar de ter sido preparada com 10% de óleos essenciais, a nanoemulsão elaborada foi adicionada no produto cárneo na mesma proporção que sua respectiva combinação de óleos emulsionados (Tabela 2).

A mistura foi homogeneizada por, aproximadamente, 10 minutos/22.500 rpm em Ultra-Turrax (Ika Labortechnik), e transferidas para um homogeneizador ultrassônico (Ultrassom digital Sonifier, Modelo 450, Brason Ultrasonic Corporation) a 70 amplitude, onde permaneceu por 10 minutos. A temperatura da emulsão (15°C) foi controlada por banho de gelo. Ao final do processo, a temperatura final da nanoemulsão foi aferida. Para análise do tamanho das partículas, realizou-se uma Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo (ver item 2.6).

2.5. Estabilidade da nanoemulsão

Por se tratar de um sistema instável, diversos fatores podem desestabilizar uma nanoemulsão durante seu período de armazenamento. Neste estudo, a estabilidade da nanoemulsão elaborada foi avaliada conforme metodologia proposta por de Abreu Martins et al. (2021), considerando diferentes pH e temperaturas, parâmetros normalmente associados ao processamento dos alimentos.

Após passar pelo Ultrassom, a nanoemulsão contendo óleos essenciais teve seu pH ajustado para 7.0 e 3.0 utilizando HCl e NaOH. Ela foi dividida e transferida para tubos de vidro e as amostras foram armazenadas a 4°C e 25°C sem luz. A estabilidade foi avaliada visualmente

nos tempos 0 e 60 dias de armazenamento, em que se observou se houve alterações na cor e turvação das amostras. As análises foram realizadas em triplicata.

2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo (MEV-FEG)

Com o intuito de avaliar o tamanho das partículas da nanoemulsão elaborada, bem como os possíveis danos causados pelos óleos essenciais nos endósporos dos microrganismos testados, realizou-se uma Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo (MEV-FEG), segundo procedimentos descritos por Bozzola & Russell (1999).

Após passar pelo Ultrassom, uma alíquota correspondente a 0.97% da nanoemulsão elaborada contendo os óleos essenciais foi transferida para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio DRCBB e 25 µL da suspensão padronizadas de endósporos (10^7 UFC/mL) de cada cepa e incubadas a 37°C por 4 horas em anaerobiose, gerada pela adição de óleo mineral estéril. Decorrido este período, retirou-se uma alíquota de 2 mL de cada tubo para análise microscópica. Foi realizado um tratamento controle contendo apenas a nanoemulsão para conferência do tamanho das partículas.

Pipetou-se 7 µL de poli-L-lisina 0.1% sobre lamínulas circulares de 60 mm de diâmetro, espalhando sobre sua superfície. Após secagem por 15 min a temperatura ambiente, 10 µL da suspensão bacteriana foi adicionada sobre a face da lamínula tratada com poli-L-lisina. Com a deposição e aderência das células bacterianas sobre a poli-L-lisina, após 30 minutos, realizou-se a fixação das mesmas em solução fixativa Karnovsky (glutaraldeído 2.5% e formaldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.05 M pH 7,5 e CaCl₂ 0.01 M). Após o tempo mínimo de 24 horas da fixação, as amostras foram lavadas com tampão cacodilado de sódio três vezes por 10 min e desidratadas com soluções de concentração crescente de acetona (25, 50, 75, 90 e três vezes de 100%, 10 minutos cada), seguido de secagem utilizando aparelho de ponto crítico (Bal-tec

CPD030). Após, foram montados em porta-amostras de alumínio (stubs) e estabilizados com fita de carbono para garantir eletron condutividade, e metalizados com ouro em aparelho sputtering (Bal-tec SCD050). As observações foram realizadas utilizando Microscópio Eletrônico de Varredura FEG (field-emission gun) de ultra alta resolução (UHR) (Tescan-Clara, República Tcheca) no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra estrutural da Universidade Federal de Lavras (LME/UFLA), nas condições de 20 Kev e 430 pA, com distância de trabalho de 10 mm.

2.7. Fabricação das Mortadelas

Para elaboração das mortadelas, seguiu-se a formulação e os procedimentos descritos por Dutra et al. (2011) com modificações. A Tabela 2 apresenta os ingredientes utilizados na fabricação das mortadelas, bem como os tratamentos estudados. Os óleos essenciais utilizados e suas proporções foram selecionados a partir do estudo da sinergia antimicrobiana entre os óleos por meio do planejamento estatístico DCCR (Tabela 3).

Tabela 2 Formulação da mortadela e os diferentes tratamentos utilizados.

Ingredientes	Quantidade (%)					
	T1 _{CB}	T1 _{CS}	T2 _{CB}	T2 _{CS}	C _{CB}	C _{CS}
Carne de porco	58.5	58.5	58.5	58.5	58.5	58.5
Água	19.08	19.08	10.35	10.35	20.05	20.05
Toucinho	14	14	14	14	14	14
Sal (NaCl)	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
Tripolifosfato de sódio (New Max)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Fécula de mandioca	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Ácido ascórbico	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Nitrito de sódio	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050
	Óleos essenciais (%)			Nanoemulsões* (%)		
	T1 _{CB}	T1 _{CS}	T2 _{CB}	T2 _{CS}	C _{CB}	C _{CS}
Alho	0.29	0.29	0.29	0.29	0	0
Cravo	0.10	0.10	0.10	0.10	0	0
Pimenta rosa	0.29	0.29	0.29	0.29	0	0

Pimenta preta	0.29	0.29	0.29	0.29	0	0
Concentração final de óleos essenciais	0.97	0.97	0.97	0.97	-	-

C_{CB}: controle, sem adição de óleos essenciais e com 50 ppm de nitrito de sódio (*C. botulinum*); C_{CS}: sem adição de óleos essenciais e com 50 ppm de nitrito de sódio (*C. sporogenes*); T1_{CB}: emulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta e 50 ppm de nitrito de sódio (*C. botulinum*); T1_{CS}: emulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo, 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta e 50 ppm de nitrito de sódio (*C. sporogenes*); T2_{CB}: nanoemulsão consistindo de 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta e 50 ppm de nitrito de sódio (*C. botulinum*); T2_{CS}: nanoemulsão consistindo de 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta e 50 ppm de nitrito de sódio (*C. sporogenes*).

* Nanoemulsões (T2_{CB} e T2_{CS}) foram preparadas contendo 10% dos óleos essenciais e aplicadas no produto cárneo nas mesmas proporções utilizadas nos tratamentos 1 e 2 (0.97%). Para ser usado na formulação nas mesmas proporções dos tratamentos 1 e 2, 9.7% da nanoemulsão (preparada a 10%) foi adicionado aos tratamentos 3 e 4, havendo então uma redução na quantidade de água adicionada.

Os ingredientes foram emulsionados em *cutter* (modelo KJ-10, Industries Jamar Ltda.; Tupa, SP, Brasil), adicionando-se os óleos essenciais no final do processo uma vez que são altamente voláteis e poderiam ser perdidos com o aumento da temperatura ao longo do processamento. A massa obtida foi embutida em tripas de poliamida, formando gomos de cerca de 500 g, que foram cozidos em imersão em água até 72°C (no ponto frio). Após o cozimento, as mortadelas foram mantidas a 4°C por 24 h.

Para as análises microbiológicas, as mortadelas foram fatiadas em porções de 25 g, trituradas, inoculadas com 10⁵ UFC/g de endósporos de *C. botulinum* e *C. sporogenes*, embaladas à vácuo (seladora TM300, Tecmaq, São Paulo, SP, Brasil) e armazenadas a 14°C ± 1°C. Para as análises físico-químicas as porções embaladas à vácuo foram de 60 g, e a temperatura de armazenamento foi de 4°C ± 1°C.

2.8. Quantificação de *Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes* nas mortadelas

As células vegetativas e endósporos foram quantificados segundo metodologias propostas por Dutra et al. (2016) e de Oliveira et al. (2011) com alterações. Às embalagens contendo 25 g de mortadelas foram adicionados 225 mL de água peptonada 0.1% (m/v) e as misturas

homogeneizadas em *Stomacher Metroterm*[®] (490 golpes/min) por 3 minutos. As células vegetativas foram quantificadas por plaqueamento em profundidade de 1 mL das diluições adequadas em SPS Ágar (Sulfite Polymyxin Sulfadiazine Agar, Himedia[®], Índia) e incubadas a 37°C/48 h em anaerobiose.

Assim como as células vegetativas, os endósporos também foram quantificados por plaqueamento em profundidade. Após homogeneização em água peptonada, as amostras foram submetidas ao choque térmico (75°C/15 min, seguido de banho de gelo) para inativação das células viáveis. Alíquotas de 1 mL das diluições adequadas foram transferidas placas de Petri contendo SPS Ágar e incubadas a 37°C/48 h em anaerobiose. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.9. Análises tecnológicas

2.9.1. Atividade de água e pH

Aproximadamente 2 g de mortadela triturada foi utilizada na análise da atividade de água (a_w) em Aqualab Modelo 3TE Series (Dacagon Devices Inc.), conduzida a $25 \pm 0.3^\circ\text{C}$. Os valores de pH das mortadelas foram medidos pela inserção de um combinado eletrodo, acoplado a um potenciômetro (DM20-Digimed, São Paulo, SP, Brasil). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

2.9.2. Análise de cor

O colorímetro espectrofotométrico Nix Pro Color Sensor (MAST, Santo André, SP, Brazil) foi utilizado. O iluminante utilizado foi o D65 com ângulo 10° para o observador, luz especular excluída e o sistema de cor CIELAB, seguindo as recomendações descritas por Ramos

et al. (2009) para produtos curados. Os índices de cor L^* , a^* e b^* foram obtidos de acordo com o valor médio de cinco leituras realizadas em diferentes pontos de superfície interna das fatias de mortadela e os índices de saturação (C^*), ângulo de tonalidade (h) e diferença global (ΔE^*) foram calculados de acordo com as fórmulas descritas por Ramos & Gomide (2007) (Equações 1, 2 e 3):

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad \text{Equação 1}$$

$$h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*) \quad \text{Equação 2}$$

$$\Delta E^* = \sqrt{(L - L_{ref})^2 + (a - a_{ref})^2 + (b - b_{ref})^2} \quad \text{Equação 3}$$

Sendo os parâmetros de referência os do controle no tempo 0 (dia 1 de análise).

2.10. Análises sensoriais

A aprovação das questões éticas para as análises sensoriais foi obtida pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFLA (CAAE: 94921318.8.0000.5148) e os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

O grupo de foco foi executado conforme Pinelli et al. (2021), sendo recrutados 16 avaliadores não treinados na Universidade Federal de Lavras (UFLA), dos quais, 75% do sexo feminino e 25% do sexo masculino, com idade entre 18 e 60 anos e consumidores de mortadela. Avaliou-se três amostras codificadas em ordem balanceada e monádica, em que fatias de mortadela de 1.0 cm de espessura em formato circular foram obtidas, embaladas a vácuo, identificadas e estocadas sob refrigeração (4 °C) e as embalagens foram abertas no momento da análise sensorial para a avaliação dos atributos de aroma, aparência, sabor e textura e os avaliadores foram instruídos a beber água para a limpeza das papilas gustativas entre as avaliações.

Em seguida, uma discussão foi estimulada por um líder para a identificação e o levantamento das características mais relevantes das amostras e, além disso, foram feitas perguntas sobre o consumo de produtos cárneos, principalmente de mortadela, questionados quanto ao entendimento sobre a utilização de nitrito de sódio e a relação com a saúde humana, um levantamento sobre a intenção de compra das amostras, utilizando uma escala estruturada (5 = certamente compraria à 1= certamente não compraria) e, também, foram solicitados que avaliassem o quanto gostaram ou não das amostras quanto aos atributos de aparência, aroma, sabor, textura e impressão global por meio de uma escala hedônica estruturada de 9 pontos (1 = desgostei extremamente à 9 = gostei extremamente).

Os dados foram organizados em uma matriz com a frequência com que as características para cada atributo foram citadas e apresentado em porcentagem graficamente.

2.11. Análises estatísticas

Um esquema de planejamento do tipo DCCR foi utilizado para análise das combinações dos óleos essenciais por meio do *software Statistica 8.0*. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 6 (tratamentos) x 5 (tempos de estocagem) para análise microbiológica e 3 (tratamentos) x 5 (tempos de estocagem) para análises tecnológicas, com três repetições. As análises dos dados foram feitas com o pacote estatístico SAS University Edition, livre para uso acadêmico (SAS, 2018). Para as variáveis Log UFC/g e Tempo, foram realizadas análises estatísticas descritivas para cada tratamento aplicado. Em cada tratamento foram realizadas três repetições reais, sendo que em cada repetição foram feitas três replicatas. As análises dos dados foram submetidas à ANOVA, considerando um nível de 5% de significância. Quando necessário, as médias dos tratamentos foram separadas pelo teste Tukey ($P < 0.05\%$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais e suas combinações

As concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos óleos essenciais sobre os endósporos de *C. botulinum* foram: alho 1.5%; cravo botão 3.0%; pimenta rosa 3.0% e pimenta preta 3.0%. Quanto aos endósporos de *C. sporogenes*, os valores de CMI encontrados foram: alho 3.0%; cravo botão 0.75%; pimenta rosa 3.0% e pimenta preta 3.0%. Na Tabela 3 observa-se o efeito esporicida das diferentes concentrações de óleos essenciais contidas na combinação sobre os endósporos de cada microrganismo estudado.

Tabela 3 Proporção (%) dos óleos essenciais usados na combinação e sua atividade antimicrobiana sobre esporos de *Clostridium sporogenes* e *Clostridium botulinum* segundo o Design Composto Central Rotacional (DCCR).

Ensaio	<i>Clostridium sporogenes</i>					<i>Clostridium botulinum</i>				
	Alho (%)	Cravo (%)	Pimenta rosa (%)	Pimenta preta (%)	Crescimento ^{0*}	Alho (%)	Cravo (%)	Pimenta rosa (%)	Pimenta preta (%)	Crescimento ^{0*}
1	0.29	0.10	0.29	0.29	-	0.29	0.10	0.29	0.29	-
2	0.29	0.10	0.29	0.76	-	0.29	0.10	0.29	0.76	+
3	0.29	0.10	0.76	0.29	-	0.29	0.10	0.76	0.29	-
4	0.29	0.10	0.76	0.76	+	0.29	0.10	0.76	0.76	-
5	0.29	0.20	0.29	0.29	-	0.29	0.20	0.29	0.29	-
6	0.29	0.20	0.29	0.76	-	0.29	0.20	0.29	0.76	-
7	0.29	0.20	0.76	0.29	+	0.29	0.20	0.76	0.29	+
8	0.29	0.20	0.76	0.76	-	0.29	0.20	0.76	0.76	+
9	0.76	0.10	0.29	0.29	+	0.76	0.10	0.29	0.29	-
10	0.76	0.10	0.29	0.76	+	0.76	0.10	0.29	0.76	-
11	0.76	0.10	0.76	0.29	+	0.76	0.10	0.76	0.29	-
12	0.76	0.10	0.76	0.76	+	0.76	0.10	0.76	0.76	-
13	0.76	0.20	0.29	0.29	+	0.76	0.20	0.29	0.29	+
14	0.76	0.20	0.29	0.76	+	0.76	0.20	0.29	0.76	+
15	0.76	0.20	0.76	0.29	+	0.76	0.20	0.76	0.29	+
16	0.76	0.20	0.76	0.76	+	0.76	0.20	0.76	0.76	+
17	0.05	0.15	0.53	0.53	-	0.05	0.15	0.53	0.53	+
18	0.99	0.15	0.53	0.53	+	0.99	0.15	0.53	0.53	+
19	0.53	0.05	0.53	0.53	+	0.53	0.05	0.53	0.53	-

20	0.53	0.25	0.53	0.53	+	0.53	0.25	0.53	0.53	+
21	0.53	0.15	0.05	0.53	+	0.53	0.15	0.05	0.53	+
22	0.53	0.15	0.99	0.53	+	0.53	0.15	0.99	0.53	-
23	0.53	0.15	0.53	0.05	+	0.53	0.15	0.53	0.05	+
24	0.53	0.15	0.53	0.99	+	0.53	0.15	0.53	0.99	+
25	0.53	0.15	0.53	0.53	+	0.53	0.15	0.53	0.53	+
26	0.53	0.15	0.53	0.53	+	0.53	0.15	0.53	0.53	+
27	0.53	0.15	0.53	0.53	+	0.53	0.15	0.53	0.53	+

* (+) observação de crescimento em placas; (-) sem crescimento em placas.

Apesar de todas as concentrações de óleos essenciais utilizadas terem sido menores que as CMI de cada um, houve excelente ação inibitória em ambas as cepas estudadas, destacando-se que, para os endósporos de *C. sporogenes*, não foi observado crescimento nas placas em, aproximadamente, 26% dos ensaios testados. Já para os endósporos de *C. botulinum*, esse número foi ainda maior: 40.74% dos ensaios não apresentaram crescimento. Esse fato confirma a elevada similaridade entre os dois microrganismos, uma vez que, mesmo utilizando os dados de CMI dos óleos essenciais sobre os endósporos de *C. sporogenes*, houve inibição do crescimento microbiano, quase duas vezes maior, para os esporos de *C. botulinum*. A íntima relação entre essas duas bactérias já está bem descrita na literatura (Wu et al., 1972; Lee & Riemann, 1970). Estudos de seqüenciamento de genoma e análise de genoma completo utilizando microarranjos de DNA e outras técnicas de tipagem confirmam a estreita relação genética entre *C. sporogenes* e *C. botulinum* Grupo I. Ainda, esses dois microrganismos compartilham propriedades metabólicas quase idênticas, além da resistência ao calor de seus esporos ser comparável (Brunt et al., 2014; Brown et al., 2012).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido diretamente associada a presença de dois ou três compostos em maiores concentrações (chegando até 85%), conhecidos como compostos majoritários, e a associação destes com componentes em menores

concentrações, conhecidos como componentes minoritários ou traços, que juntamente com o componente majoritário modificam a atividade do óleo essencial, podendo exercer efeito aditivo ou sinérgico, ou até mesmo antagônico (Chouhan et al., 2017; Cakir et al., 2004), permitindo assim que se usem menores concentrações de óleos essenciais para tal finalidade, diminuindo os impactos sensoriais no produto.

Foi observada uma gama de componentes químicos nos óleos estudados (Tabela 4), sendo os componentes majoritários identificados no óleo de alho o trissulfeto de dialila (23.89%) e o dissulfeto de dialil (17.51%); no óleo de cravo, o m-eugenol (89.87%); no óleo de pimenta rosa, o δ -3- careno (35.61%) e o limoneno (19.85%); e no óleo de pimenta preta, o (E)- β -cariofileno (40.07%).

Tabela 4 Compostos químicos identificados nos óleos essenciais de alho, cravo, pimenta rosa e pimenta preta.

TR	Composto	IR Calculado	Kovats Índice	Quantidade (%)
Óleo essencial de alho				
	Dissulfeto de dialil	1073	1076	17.51
4.156				
5.403	1,3-Dithiane	918	1027	4.86
10.625	2-propenil-dissulfeto	1081	1281	19.81
13.016	Trissulfeto de metil-alilo	1140	1133	9.66
19.962	Trissulfeto de dialila	1303	1289	23.89
23.405	Dissulfeto de metil propila	1383	946	4.14
Óleo essencial de cravo				
23.189	m-Eugenol	1354	1350	89.87
26.000	(E)-Cariofileno	1420	1417	8.56
27.471	α -Humuleno	1456	1452	1.57
Óleo essencial de pimenta rosa				
6.453	α -Pinoeno	933	932	10.96
7.791	β -Pinoeno	979	974	0.41
8.046	Mirceno	988	988	2.42
8.696	α -Felandreno	1007	1002	16.15
8.808	Δ-3- Careno	1010	1008	35.61
9.330	ρ -Cimeno	1024	1020	4.96
9.519	Limoneno	1029	1024	19.85
9.583	Sabineno	1031*	969	2.56
11.683	Terpinoleno	1086	1086	0.65

25.993	(E)-Cariofileno	1420	1417	1.06
28.516	Germacreno D	1481	1484	0.89
44.727	Heptadecanoato de metila	1924	1921	1.14
50.201	9-octadecenoato de metila	2097	2087	2.37
Óleo essencial de pimenta preta				
6.454	α -Pinenos	933	932	13.72
7.596	Sabineno	972	969	10.45
7.793	β -Pinenos	979	974	13.64
8.800	Δ -3-Careno	1010	1008	5.45
9.332	ρ -Cimeno	1024	1020	0.39
9.517	Limoneno	1029	1024	9.49
22.385	α -Terpineno	1335*	1018	1.12
24.144	β -Cubebeno	1376	1387	2.55
26.013	(E)-β-Cariofileno	1420	1417	40.07
27.471	Linalol	1456*	1095	0.48
32.548	Óxido de cariofileno	1582	1582	1.12

RI_{cal} – Índice de Retenção calculado; Composto não identificado por GC-MS; *Não confirmado pelo índice de Kovats.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais utilizados nesse trabalho já é conhecida e atribuída principalmente aos seus componentes majoritários. Por exemplo, os compostos sulfurados trissulfeto de dialila e o dissulfeto de dialil, presentes no óleo essencial de alho, atuam principalmente na membrana celular microbiana, modificando sua estrutura e rompendo-a (Tang et al., 2021; Wang et al., 2019). Já no óleo essencial de cravo, o eugenol, composto majoritário identificado, constitui um composto fenólico conhecido por sua forte ação antimicrobiana e antioxidante, atuando na membrana citoplasmática das células, alterando sua permeabilidade e levando-a a ruptura, podendo ainda se ligar a proteínas, impedindo a ação de enzimas específicas (Devi et al., 2010). O δ -3-careno e o limoneno, presentes na pimenta rosa, são hidrocarbonetos monoterpênicos que atuam principalmente na membrana celular devido à sua elevada hidrofobicidade, acumulando-se na bicamada fosfolipídica e ocasionando perda da integridade da membrana, fazendo com que as células não consigam manter sua homeostase intracelular, sendo então incapazes de realizar as reações de transformação desejadas (Sikkema et al., 1994). E, por

fim, o (E)- β -cariofileno, composto majoritário indetificado na pimenta preta, um hidrocarboneto sesquiterpênico com ações semelhantes a dos hidrocarbonetos monoterpênicos citados acima.

A combinação selecionada para utilização como conservante na mortadela na forma de emulsão foi o ensaio de número 1 do DCCR, que apresentou ação antimicrobiana contra os dois microrganismos estudados, estando nas menores concentrações dos OEs: 0.29% do óleo de alho; 0.10% do óleo de cravo; 0.29% do óleo de pimenta rosa e 0.29% do óleo de pimenta preta.

Embora a combinação escolhida tenha apresentado atividade antimicrobiana *in vitro*, é sabido que, quando em um alimento, os óleos apresentam essa atividade reduzida (Speranza et al., 2010). Dessa forma, em busca de um aumento na atividade antimicrobiana da mistura, elaborou-se uma nanoemulsão a partir dessa combinação.

A nanoemulsão elaborada teve seu tamanho verificado por Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo (MEV-FEG), assim como seu possível mecanismo de ação e danos aos endósporos dos microrganismos estudados (Figura 1).

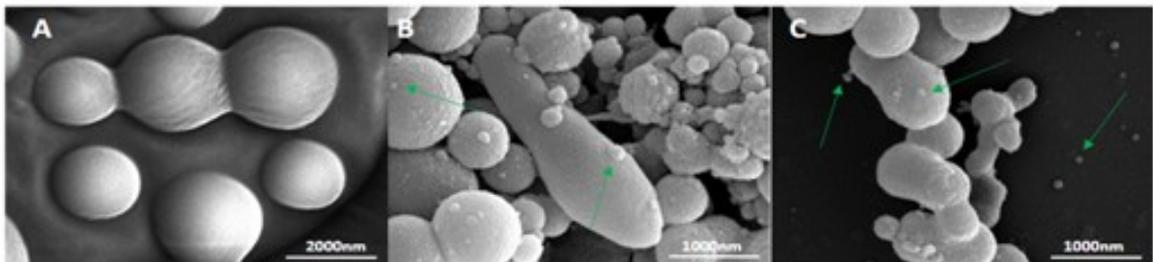


Figura 1 (A) Partículas da nanoemulsão elaborada com óleos essenciais; (B) Endósporos de *C. botulinum* após 4 horas de exposição aos óleos essenciais nanoemulsionados; (C) Endósporos de *C. sporogenes* após 4 horas de exposição aos óleos essenciais nanoemulsionados. Setas verdes indicam a presença de partículas da nanoemulsão.

Ao analisarmos as micrografias, foi possível perceber a presença das partículas da nanoemulsão na superfície celular dos microrganismos avaliados, tanto nos endósporos (células arredondadas) quanto nas células vegetativas (células em formato bastonete).

Os mecanismos de ação dos óleos essenciais ainda não estão totalmente elucidados e variam de óleo para óleo, uma vez que a constituição química deles é variável e responsável por determinar suas propriedades antimicrobianas. Alguns mecanismos propostos referem-se principalmente à hidrofobicidade dos óleos, que os permite atuar sobre a parede e membrana celular, danificando-as, alterando sua permeabilidade e levando a irregularidades nas superfícies bacterianas. Ainda, devido aos danos à integridade celular, podem inibir a respiração celular e, conseqüentemente síntese de ATP, e o transporte de íons críticos que levarão a célula à morte (Oulkheir et al., 2017; Djihane et al., 2016; Jiang et al., 2011).

A utilização dos óleos essenciais na forma nanoemulsionada aumenta a biodisponibilidade destes compostos ativos nos alimentos, melhorando sua estabilidade físico-química e atividade biológica. Sua atividade antimicrobiana é aumentada basicamente por meio de quatro mecanismos de interação com a membrana celular microbiana: transporte passivo através da membrana celular; fusão com bicamada fosfolipídica; partição na fase aquosa e interação eletrostática com a membrana celular (Donsi & Ferrari, 2016).

3.2. Estabilidade da nanoemulsão de óleos essenciais

As nanoemulsões são sistemas coloidais termodinamicamente instáveis que podem se decompor com o passar do tempo devido a diversos mecanismos desestabilizantes, como floculação, separação gravitacional e coalescência (de Oca-Ávalos et al., 2017). Apesar de serem mais estáveis do que as emulsões tradicionais devido ao tamanho pequeno de suas gotículas e, conseqüentemente, maior área superficial, possuindo elevada estabilidade à agregação de partículas e separação gravitacional, as nanoemulsões têm sua estabilidade influenciada principalmente por parâmetros de formulação e processamento, como tipo de surfactante e método de preparo, além de fatores ambientais, como pH, força iônica, temperatura e tempo de

armazenamento (Kumar & Mandal, 2018; Qian et al., 2012). Com isso, avaliou-se visualmente a estabilidade da nanoemulsão de óleos essenciais elaborada sobre diferentes condições durante armazenamento (Figura 2).

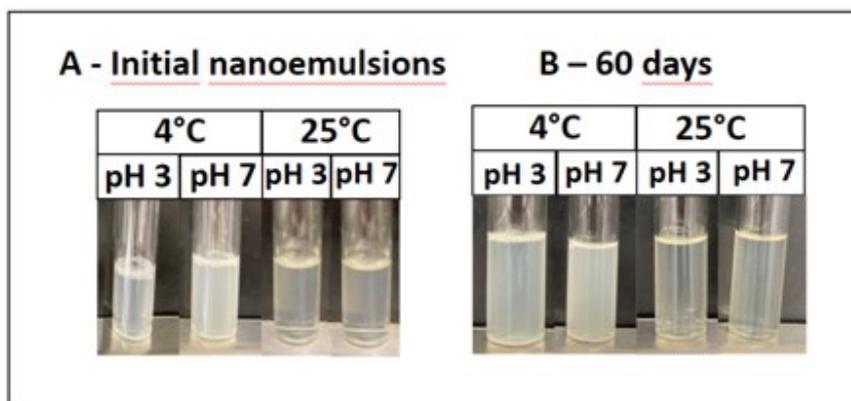


Figura 2 Fotos de nanoemulsões armazenadas em repouso. Nanoemulsões iniciais (A) e nanoemulsões após 60 dias (B).

Pela análise visual das nanoemulsões elaboradas foi possível verificar que com o decorrer do período de armazenamento as nanoemulsões se tornaram mais turvas e amareladas, com uma maior viscosidade, especialmente as armazenadas a 4°C, sendo o tratamento com o pH 7 o que apresentou maior turvação. Ao analisarmos os efeitos do pH e da temperatura, foi possível concluir que, nas condições avaliadas, a temperatura de armazenamento demonstrou maior efeito na estabilidade das nanoemulsões do que o pH, visto que visualmente as diferenças na turvação e viscosidade foram maiores com as diferentes temperaturas do que com os diferentes valores de pH.

A temperatura e o tempo de armazenamento podem afetar a viscosidade da emulsão. Li et al. (2016) avaliaram as alterações que nanoemulsões de D-limoneno sofreram durante armazenamento a 4°C, 25°C e 50°C e encontraram um aumento maior na viscosidade durante os 49 dias iniciais a 4°C e 25°C, sendo esta primeira temperatura (4°C) a que apresentou maior

alteração, resultados semelhantes ao encontrado. Essa alteração na viscosidade devido a temperatura e tempo de armazenamento ocorre uma vez que a cristalização em fase oleosa pode levar a uma indução na coalescência parcial de suas gotículas. Ainda, podem ocorrer mudanças conformacionais do biopolímero das moléculas do surfactante.

3.3. Análises microbiológicas na matriz alimentar

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais emulsificados e nanoemulsificados foi comparada sobre endósporos e células vegetativas de *Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes* inoculados em mortadela durante o armazenamento a 14°C por 20 dias. A contagem de endósporos foi influenciada significativamente pelos tratamentos, pelo período de análise e pela interação entre estes ($P < 0.05$) (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 Efeito dos tratamentos e do período de análise (média \pm desvio padrão) na contagem de endósporos de *Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes*.

Tempo (dias)	Log (UFC/g)
0	2.94c \pm 0.30
5	3.01c \pm 1.09
10	1.32b \pm 1.39
15	0.19a \pm 0.64
20	0.00a \pm 0.00
Tratamentos	Log (UFC/g)
C _{CB}	1.69ab \pm 1.49
C _{CS}	1.71ab \pm 1.51
T1 _{CB}	1.17a \pm 1.54
T1 _{CS}	0.96a \pm 1.55
T2 _{CB}	2.09b \pm 1.52
T2 _{CS}	1.33ab \pm 1.75

As médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). C_{CB}: controle, sem adição de óleos essenciais e com 50 ppm de nitrito de sódio (*C. botulinum*); C_{CS}: sem adição de óleos essenciais e com 50 ppm de nitrito de sódio (*C. sporogenes*); T1_{CB}: emulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio (*C. botulinum*); T1_{CS}: emulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo, 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio (*C. sporogenes*); T2_{CB}: nanoemulsão consistindo de 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio (*C. botulinum*); T2_{CS}: nanoemulsão consistindo de 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio (*C. sporogenes*).

O período de armazenamento do produto influenciou significativamente na contagem de endósporos, sendo observada uma redução de 2.94 log UFC/g após 20 dias de análise (Tabela 5).

Ao compararmos os efeitos dos tratamentos (Tabela 5), foi possível observar que os tratamentos contendo os óleos essenciais emulsionados (T1_{CB} e T1_{CS}) foram os que apresentaram maior efeito sobre os endósporos de ambos os microrganismos testados, com uma contagem média (\pm desvio padrão) de 1.17 ± 1.54 (T1_{CB}) e 0.96 ± 1.55 (T1_{CS}), confirmando os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais utilizados.

Tabela 6 Efeito da interação entre os tratamentos e tempos de análise (média \pm desvio padrão) na contagem de endósporos de *Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes*.

Tempo (dias)	<i>Clostridium botulinum</i>		
	Tratamentos		
	C _{CB} (Log UFC/g)	T1 _{CB} (Log UFC/g)	T2 _{CB} (Log UFC/g)
0	2.75aB \pm 0.21	2.85aB \pm 0.52	3.16aC \pm 0.27
5	3.10aB \pm 0.77	3.00aB \pm 0.69	3.49aC \pm 0.82
10	2.61bB \pm 0.22	0.00aA \pm 0.00	2.68bBC \pm 0.18
15	0.00aA \pm 0.00	0.00aA \pm 0.00	1.12aAB \pm 1.58
20	0.00aA \pm 0.00	0.00aA \pm 0.00	0.00aA \pm 0.00
Tempo (dias)	<i>Clostridium sporogenes</i>		
	Tratamentos		
	C _{CS} (Log UFC/g)	T1 _{CS} (Log UFC/g)	T2 _{CS} (Log UFC/g)
0	2.69aB \pm 0.24	3.00aB \pm 0.26	3.17aB \pm 0.20
5	3.22aB \pm 0.45	1.78aAB \pm 2.51	3.49aB \pm 0.88
10	2.66bB \pm 0.40	0.00aA \pm 0.00	0.00aA \pm 0.00
15	0.00aA \pm 0.00	0.00aA \pm 0.00	0.00aA \pm 0.00
20	0.00aA \pm 0.00	0.00aA \pm 0.00	0.00aA \pm 0.00

As médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). As médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). C_{CB}: controle, sem adição de óleos essenciais e com 50 ppm de nitrito de sódio (*C. botulinum*); C_{CS}: sem adição de óleos essenciais e com 50 ppm de nitrito de sódio (*C. sporogenes*); T1_{CB}: emulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio (*C. botulinum*); T1_{CS}: emulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo, 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio (*C. sporogenes*); T2_{CB}: nanoemulsão consistindo de 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio (*C. botulinum*); T2_{CS}: nanoemulsão consistindo de 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio (*C. sporogenes*).

Ao observarmos os efeitos da interação entre os tratamentos e o período de armazenamento do produto nos endósporos de *C. sporogenes* (Tabela 6), foi possível verificar que os tratamentos

contendo os óleos essenciais emulsionados (T1_{CS}) e nanoemulsionados (T2_{CS}) apresentaram uma melhor ação esporicida comparados ao tratamento controle, que continha apenas o nitrito de sódio, sendo o tratamento T1_{CS} o que apresentou maior redução na contagem de endósporos (3.00 log UFC/g) após 10 dias de análise. Para ambos os tratamentos (T1_{CS} e T2_{CS}), após 10 dias de análises, não foram observadas contagem de endósporos. Em se tratando da bactéria *C. botulinum*, o tratamento contendo os óleos essenciais emulsionados (T1_{CB}) foi o que apresentou maior efeito na redução do número de endósporos (2.85 log UFC/g) após 10 dias de análise, não sendo observada contagem após esse período (Tabela 6).

A contagem de células vegetativas foi influenciada ($P < 0.05$) apenas pelo período de análise (Tabela 7). Os tratamentos não afetaram significativamente na contagem de células vegetativas de ambos os microrganismos, assim como a interação destes com o período de armazenamento (Tabela 8).

Tabela 7 Efeito dos tratamentos e do período de análise (média \pm desvio padrão) na contagem de células vegetativas de *Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes*.

Tempo (dias)	Log (UFC/g)
0	0.36a \pm 0.47
5	0.61ab \pm 1.05
10	1.43ab \pm 1.21
15	1.90b \pm 1.44
20	0.96ab \pm 1.44
T4	0.76a \pm 1.37

As médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Os valores médios (\pm desvio padrão) encontrados referentes às contagens de células vegetativas dos microrganismos estudados foram (Log UFC/g): C_{CB} (1.75 \pm 1.20); C_{CS} (1.93 \pm 1.09); T1_{CB} (1.12 \pm 1.38); T1_{CS} (1.15 \pm 1.46); T2_{CB} (0.61 \pm 1.05) e T2_{CS} (0.76 \pm 1.37). Com isso, é possível observar que os tratamentos contendo as nanoemulsões de óleos essenciais (T2_{CB} e T2_{CS}) apresentaram, em média, as menores contagens microbianas, diferenciando-se principalmente dos tratamentos controle (C_{CB} e C_{CS}), que apresentaram as maiores contagens.

Tabela 8 Efeito da interação entre os tratamentos e do período de análise (média \pm desvio padrão) na contagem de células vegetativas de *Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes*.

Tempo (dias)	<i>Clostridium botulinum</i>		
	Tratamentos		
	C _{CB} (Log UFC/g)	T1 _{CB} (Log UFC/g)	T2 _{CB} (Log UFC/g)
0	1.27aA \pm 0.25	0.02aA \pm 0.00	0.24aA \pm 0.28
5	1.00aA \pm 0.57	0.17aA \pm 0.02	0.00aA \pm 0.00
10	1.51aA \pm 0.15	2.82aA \pm 0.41	0.17aA \pm 0.24
15	3.24aA \pm 0.61	1.20aA \pm 1.69	1.29aA \pm 1.62
20	1.74aA \pm 2.45	1.39aA \pm 1.97	1.35aA \pm 1.91
Tempo (dias)	<i>Clostridium sporogenes</i>		
	Tratamentos		
	C _{CS} (Log UFC/g)	T1 _{CS} (Log UFC/g)	T2 _{CS} (Log UFC/g)
0	0.32aA \pm 0.23	0.00aA \pm 0.00	0.36aA \pm 0.23
5	0.36aA \pm 0.25	2.01aA \pm 2.38	0.13aA \pm 0.18
10	1.24aA \pm 0.58	1.25aA \pm 1.77	1.61aA \pm 2.28
15	2.75aA \pm 0.63	1.18aA \pm 1.67	1.73aA \pm 2.44
20	0.00aA \pm 0.00	1.30aA \pm 1.83	0.00aA \pm 0.00

As médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). As médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). C_{CB}: controle, sem adição de óleos essenciais e com 50 ppm de nitrito de sódio (*C. botulinum*); C_{CS}: sem adição de óleos essenciais e com 50 ppm de nitrito de sódio (*C. sporogenes*); T1_{CB}: emulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio (*C. botulinum*); T1_{CS}: emulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo, 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio (*C. sporogenes*); T2_{CB}: nanoemulsão consistindo de 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio (*C. botulinum*); T2_{CS}: nanoemulsão consistindo de 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio (*C. sporogenes*).

Ao final do período de análise (vigésimo dia), foi possível observar uma redução total do número de células vegetativas de *C. sporogenes* com o tratamento controle (C_{CS}) e com o tratamento contendo a nanoemulsão de óleos essenciais (T2_{CS}), demonstrando uma maior sensibilidade deste microrganismo se comparado ao *C. botulinum* ao nitrito de sódio e aos compostos bioativos nanoemulsionados avaliados no produto cárneo (Tabela 8).

Os resultados obtidos confirmam os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais sobre as células vegetativas dos microrganismos testados, tanto na forma de emulsão quanto na forma de nanoemulsão, indicando que a utilização destes em substituição ao nitrito de sódio constitui uma

alternativa viável para a indústria de carnes, uma vez que foram encontrados resultados semelhantes para todos os tratamentos.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos de origem alimentar tem sido extensivamente estudada há vários anos (Moleyar & Narasimham, 1992; Shan et al., 2007; Gutierrez et al., 2009; Wang et al., 2020), principalmente por se tratar de um conservante natural com potencial para substituir conservantes sintéticos tradicionalmente utilizados, se encaixando perfeitamente no estilo de vida mais saudável que muitos tem procurado. Porém, a maioria dos estudos tem sido realizado com células vegetativas, sendo poucos os trabalhos que relatam a ação dos óleos essenciais sobre endósporos bacterianos, especialmente por sua maior resistência. Ismaiel & Pierson (1990) avaliaram os efeitos antimicrobianos de diferentes concentrações de óleos essenciais de cravo, tomilho, pimenta preta, orégano, alho, cebola e canela sobre a germinação e crescimento vegetativo de *Clostridium botulinum* em meio líquido, sendo que todos os óleos essenciais testados impediram a germinação dos endósporos a 0.2%. Chaibi et al. (1997) estudaram a atividade antimicrobiana de nove óleos essenciais sobre células vegetativas e esporos de *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus*. Os óleos essenciais testados inibiram a germinação dos endósporos de *C. botulinum*, mas não seu crescimento. Aleixo et al. (2022) estudaram os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais de orégano e cravo, juntamente com o composto majoritário carvacrol, sobre endósporos de *Clostridium botulinum* inoculados em mortadela, encontrando uma redução na população do microrganismo testado.

Apesar dos OEs serem amplamente empregados nos alimentos principalmente pela sua segurança, a utilização destes na forma de nanoemulsão pode aumentar sua biodisponibilidade, melhorando sua solubilidade e estabilidade, protegendo-os de interações com constituintes alimentares, ao mesmo tempo em que reduz a estimulação sensorial dos alimentos (Odriozola-Serrano et al., 2014; Donsì & Ferrari, 2016). Porém, a maior parte dos estudos que demonstram

uma maior atividade antimicrobiana dos óleos nanoemulsionados quando comparados aos emulsionados dizem respeito a ensaios *in vitro* (Cecchini et al., 2021; Shahbazi et al., 2019; Roy & Guha, 2018). Quando aplicados no alimento, essa característica pode variar (Pinelli et al., 2021; Mendes et al., 2018; Moraes-Lovison et al., 2017), uma vez que se trata de uma matriz complexa, além de que os próprios nutrientes no meio podem acabar promovendo o reparo celular, diminuindo então a eficácia desses agentes antimicrobianos (Gill et al., 2002). Fato semelhante foi observado no presente trabalho, em que os óleos emulsionados e nanoemulsionados apresentaram ação similar, tanto contra células vegetativas quanto contra os endósporos bacterianos estudados. Ainda, algumas propriedades físico-químicas da nanoemulsão podem acabar influenciando em sua ação antimicrobiana, como o tamanho da partícula, suas propriedades elétricas e concentração dos compostos antimicrobianos, bem como o tipo de emulsificante escolhido e/ou outros aditivos e o método de preparo (Özogul et al., 2021), fazendo com que sejam necessários estudos posteriores mais aprofundados sobre essas características. Logo, a adição de uma mesma concentração de OEs livres e nanoencapsulados a uma mesma matriz alimentar pode proporcionar efeitos antimicrobianos semelhantes e satisfatórios, porém, com a vantagem na possível redução dos efeitos sensoriais indesejados quando adicionados na forma de nanoemulsão.

Apesar da combinação de óleos essenciais avaliada, tanto na forma emulsionada quanto na forma nanoemulsionada, não ter evitado a germinação dos endósporos de ambos os microrganismos durante o processamento do produto cárneo (cozimento), ela apresentou efeito esporicida durante o período de armazenamento, uma vez que a partir do décimo dia de análise não foi observada a presença de esporos na matriz alimentar ($T1_{CB}$, $T1_{CS}$ e $T2_{CS}$). Ainda, a combinação de OEs evitou a germinação dos endósporos de ambos os microrganismos, uma vez que a contagem de células vegetativas permaneceu constante durante todo o experimento,

reforçando os efeitos bacteriostáticos da combinação selecionada. Os OEs exercem seus efeitos esporicidas principalmente pelo bloqueio da germinação dos endósporos, do seu crescimento e de sua multiplicação, sendo essa ação impactada principalmente pelas características intrínsecas da matriz alimentar, como pH e constituintes, como gorduras e proteínas (Mukurumbira et al., 2022). Os OEs utilizados apresentaram seus efeitos antimicrobianos de forma muito semelhante sobre as bactérias *C. botulinum* e *C. sporogenes* no estudo. Este fato pode ser explicado pela íntima relação dessas bactérias, que compartilham de propriedades metabólicas muito semelhantes, além de semelhanças genéticas (Weigand et al., 2015; Brown et al., 2012).

Uma vez que são poucos os trabalhos que trazem os efeitos das nanoemulsões de OEs sobre endósporos, especialmente em se tratando de *Clostridium*, o presente trabalho se mostra de extrema importância para a indústria alimentícia, já que foi possível verificar que os OEs combinados, tanto na forma de emulsão quanto na de nanoemulsão, tiveram ação esporicida sobre os endósporos de *C. botulinum* e *C. sporogenes* e bacteriostática, indicando que podem ser alternativas seguras e eficazes para substituírem parcialmente o nitrito de sódio tradicionalmente utilizado como conservante nesse tipo de produto cárneo. Ainda, a adição de óleos essenciais combinados como conservante natural em produtos do tipo “*Clean Label*” pode apontar como um grande diferencial para a indústria de alimentos, agregando valor a um produto inovador e com qualidade.

3.4. Análises tecnológicas

Foi observada diferença significativa ($P < 0.05$) apenas entre os tratamentos, tanto para a a_w quanto para o pH (Tabela 9). Os valores médios (\pm desvio padrão) encontrados para o pH e a_w para os tempos de estocagem estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 Efeito dos tratamentos e do período de análise (média \pm desvio padrão) na a_w e pH do produto cárneo elaborado.

Tratamentos	a_w	pH
C	0.96ab \pm 0.01	6.40ab \pm 0.07
T1	0.97b \pm 0.01	6.42b \pm 0.10
T2	0.96a \pm 0.01	6.24a \pm 0.03
Tempos (dias)	a_w	pH
1	0.96a \pm 0.02	6.28a \pm 0.08
3	0.97a \pm 0.00	6.40a \pm 0.16
6	0.96a \pm 0.00	6.39a \pm 0.15
9	0.97a \pm 0.00	6.34a \pm 0.20
12	0.97a \pm 0.00	6.35a \pm 0.15

As médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

C: sem adição de óleos essenciais e com 50 ppm de nitrito de sódio (controle); T1: emulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio; T2: nanoemulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio.

Apesar dos tratamentos avaliados terem apresentados valores muito próximos tanto de a_w quanto de pH, o tratamento contendo a nanoemulsão dos OEs (T2) foi o que apresentou menor valor para ambos os parâmetros (a_w : 0.96 ± 0.01 e pH: 6.24 ± 0.16). Esses dados refletem os efeitos antimicrobianos satisfatórios das nanoemulsões incorporadas de OEs, uma vez que valores de pH maiores podem estar relacionados com o crescimento microbiano e consequentemente produção de metabólitos (Liu et al., 2020), explicando assim o porquê desse tratamento ter se diferenciado estatisticamente dos demais. Os valores de pH e a_w encontrados para todos os tratamentos estão de acordo com os encontrados na literatura e em mortadelas comerciais (Pinelli et al., 2021; Fiorda & de Siqueira, 2009; Rödel et al., 1990).

A cor é um parâmetro essencial para escolha e compra de produtos cárneos, especialmente em se tratando de carnes curadas cuja coloração rósea característica é desejada. Quanto a análise de cor objetiva, observou-se efeito ($P < 0.05$) dos tratamentos e da interação destes com o período de armazenamento para os parâmetros luminosidade (L^*), índice de amarelo (b^*), índice de vermelho (a^*), índice de saturação (C^*) e ângulo de tonalidade (h^*) (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10 Valores médios (\pm desvio padrão) da luminosidade (L^*), índice de amarelo (b^*), índice de vermelho (a^*), índice de saturação (C^*) e ângulo de tonalidade (h^*) obtidos para os tratamentos e tempos de estocagem das mortadelas a 4°C.

Tratamentos	Luminosidade (L^*)	Índice de amarelo (b^*)	Índice de vermelho (a^*)	Índice de saturação (C^*)	Ângulo de tonalidade (h^*)
C	63.54b \pm 1.72	5.78a \pm 0.20	2.76b \pm 0.10	6.44a \pm 0.20	63.80a \pm 0.99
T1	58.92a \pm 0.98	5.05a \pm 0.24	2.35ab \pm 0.22	5.58a \pm 0.14	64.96a \pm 3.00
T2	62.82b \pm 1.89	9.46b \pm 0.24	2.20a \pm 0.53	9.72b \pm 0.33	77.04b \pm 2.80
Tempo (dias)	Luminosidade (L^*)	Índice de amarelo (b^*)	Índice de vermelho (a^*)	Índice de saturação (C^*)	Ângulo de tonalidade (h^*)
1	61.04a \pm 1.92	6.70a \pm 2.19	2.07a \pm 0.79	7.13a \pm 1.87	70.54a \pm 11.62
3	61.74a \pm 4.04	6.60a \pm 2.29	2.60a \pm 0.34	7.15a \pm 2.10	66.75a \pm 8.04
6	62.89a \pm 3.60	6.80a \pm 2.18	2.40a \pm 0.36	7.25a \pm 2.05	69.28a \pm 6.23
9	61.97a \pm 2.56	7.04a \pm 2.26	2.55a \pm 0.39	7.51a \pm 2.18	69.07a \pm 5.20
12	61.16a \pm 2.79	6.67a \pm 2.29	2.56a \pm 0.26	7.20a \pm 2.12	67.35a \pm 7.06

As médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). C: sem adição de óleos essenciais e com 50 ppm de nitrito de sódio (controle); T1: emulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta e 50 ppm de nitrito de sódio; T2: nanoemulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta e 50 ppm de nitrito de sódio.

Tabela 11 Efeitos da interação entre os tratamentos e o tempo de armazenamento (média \pm desvio padrão) na luminosidade (L^*), índice de amarelo (b^*), índice de vermelho (a^*), índice de saturação (C^*) e ângulo de tonalidade (h^*) das mortadelas estocadas a 4°C.

Tempo (dias)	Índice de vermelho (a^*)			Índice de amarelo (b^*)		
	Tratamentos			Tratamentos		
	C	T1	T2	C	T1	T2
1	2.67bA \pm 1.03	2.25abA \pm 0.18	1.29aA \pm 0.04	5.98aA \pm 2.31	5.02aA \pm 0.03	9.11bA \pm 0.78
3	2.63aA \pm 0.42	2.69aA \pm 0.08	2.47aB \pm 0.58	5.71aA \pm 1.40	4.74aA \pm 0.04	9.36bA \pm 0.82
6	2.82aA \pm 0.17	2.16aA \pm 0.09	2.22aAB \pm 0.24	5.72aA \pm 0.59	5.15aA \pm 0.38	9.54bA \pm 0.68
9	2.86aA \pm 0.03	2.20aA \pm 0.01	2.60aB \pm 0.54	5.96aA \pm 0.75	5.39aA \pm 0.20	9.76bA \pm 1.53
12	2.83aA \pm 0.16	2.46aA \pm 0.28	2.41aAB \pm 0.13	5.53aA \pm 0.98	4.96aA \pm 0.52	9.54bA \pm 0.46
Tempo (dias)	Luminosidade (L^*)			Índice de saturação (C^*)		
	Tratamentos			Tratamentos		
	C	T1	T2	C	T1	T2
1	60.57aA \pm 1.53	60.10aA \pm 3.13	62.46aA \pm 0.13	6.69aA \pm 1.65	5.50aA \pm 0.10	9.20bA \pm 0.77
3	63.84bA \pm 1.25	57.65aA \pm 4.60	63.73bA \pm 2.93	6.32aA \pm 1.07	5.45aA \pm 0.08	9.68bA \pm 0.94
6	64.62bA \pm 0.85	58.44aA \pm 1.41	65.60bA \pm 1.29	6.38aA \pm 0.61	5.59aA \pm 0.32	9.80bA \pm 0.71
9	64.84aA \pm 0.60	59.70aA \pm 1.59	61.38aA \pm 1.55	6.62aA \pm 0.66	5.82aA \pm 0.18	10.10bA \pm 1.61
12	63.84aA \pm 1.50	58.73aA \pm 2.91	60.93aA \pm 1.42	6.22aA \pm 0.94	5.54aA \pm 0.34	9.84bA \pm 0.47
Tempo (dias)	Ângulo de tonalidade (h^*)					
	Tratamentos					
	C	T1	T2			
1	63.85aA \pm 16.76	65.87aA \pm 1.63	81.90bA \pm 0.95			

3	65.49abA±8.93	60.40aA±0.60	75.35bA±2.06
6	63.71aA±0.99	67.23aA±2.38	76.92aA±0.47
9	64.22aA±3.05	67.83aA±0.81	75.18aA±0.77
12	62.73aA±2.79	63.49aA±4.94	75.85aA±0.11

As médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). As médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). C: sem adição de óleos essenciais e com 50 ppm de nitrito de sódio (controle); T1: emulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio; T2: nanoemulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio.

Durante o armazenamento das mortadelas, foram encontrados valores médios de L^* muito próximos para todos os tratamentos e para todo o período de armazenamento, sugerindo que as mortadelas mantiveram a mesma claridade durante todo o período experimental (12 dias). O tratamento contendo a emulsão dos OEs (T1) se mostrou com uma claridade um pouco menor do que os demais (C e T2), principalmente entre o 3º e 6º dia de análise. Esse tratamento também apresentou o maior valor de pH ($6.42b \pm 0.10$). Valores maiores de L^* podem ser explicados por meio de uma correlação negativa entre esse índice e o pH: valores mais altos de pH correspondem a uma carne menos brilhante, como observado no presente estudo (Mancini et al., 2015).

Segundo Brewer et al. (2001), o parâmetro que traz mais informações a cerca da intensidade visual da cor rósea característica de produtos cárneos curados é a luminosidade, sendo de extrema influência na qualidade desse tipo de produto. O teor de água, o tipo e a concentração de pigmentos, a adição de aditivos, a quantidade intramuscular de gordura, o pH e a absorção do teor de umidade das substâncias solúveis da matriz são fatores que afetam a luminosidade de produtos cárneos (Abbasi et al., 2020; do Amaral et al., 2013). Logo, o fato do tratamento contendo a nanoemulsão dos óleos ter apresentado luminosidade semelhante ao tratamento controle é de extrema relevância para a indústria de carnes processadas.

Quanto ao índice de amarelo (b^*), o tratamento contendo a nanoemulsão dos OEs (T2) foi o que apresentou maior valor, diferenciando-se estatisticamente dos demais tratamentos, sugerindo que a mortadela neste caso se apresentou mais amarelada. Resultados semelhantes foram encontrados por Pinelli et al. (2021), em que os autores também encontraram valores mais altos de b^* para os tratamentos contendo nanoemulsões de OEs combinados.

As características dos alimentos apresentam forte influência nos valores do índice de amarelo (b^*). Porém, alterações no pH, atividade de água, oxidação e o tipo de óleo essencial utilizado também podem afetar esse parâmetro (Cofrades et al., 2004).

O índice de vermelho (a^*) constitui um dos parâmetros de maior importância ao se analisar a cor de produtos cárneos, já que a vermelhidão desses produtos é fundamental para compra destes. Dentre os tratamentos avaliados, observou-se que o tratamento controle apresentou o maior valor de a^* , seguido dos tratamentos T1 e T2. A maior intensidade de vermelho para esse tratamento pode ser explicada pela forte ação antioxidante do nitrito de sódio adicionado, que, mesmo estando em baixas concentrações, contribui para uma estabilização da cor, retardando a descoloração do produto (Monteschio et al., 2021). Segundo Jafari & Emam-Djomeh (2007), concentrações de nitrito de 50 ppm já são suficientes para fornecer a cor característica de produtos curados e o sabor.

O tratamento contendo a nanoemulsão dos OEs (T2) apresentou o maior valor de b^* e menor valor de a^* , sugerindo um desbotamento da cor curada no produto cárneo. Esse desbotamento pode ser explicado por possíveis interações entre os constituintes químicos presentes na fração aromática dos OEs e o nitrito adicionado, fazendo com que o NO_2 se torne indisponível para combinar com a mioglobina, evitando assim a formação da cor rósea característica (de Oliveira et al., 2012).

Os parâmetros h^* e C^* permitem determinar a intensidade da cor e sua saturação, respectivamente, além de serem úteis para estimativa do real escurecimento da carne (Andrade et al., 2010). Em relação ao C^* , o tratamento contendo a nanoemulsão de OEs (T2) apresentou o maior valor, se diferenciando dos demais e indicando uma maior saturação da cor. Esse tratamento também possui o maior valor de b^* , sugerindo então uma mortadela com uma coloração amarelada mais intensa se comparada aos demais tratamentos. Quanto ao h^* , valores mais baixos em produtos cárneos cozidos sugerem uma cor vermelha mais distinta (Szymański et al., 2020). Ao compararmos os tratamentos, percebemos que o tratamento controle (C) apresentou um valor mais baixo de h^* e mais alto de a^* , indicando uma maior tonalidade vermelha. Já o tratamento contendo a nanoemulsão de OEs (T2), por apresentar o maior valor de h^* , menor valor de a^* e maior valor de b^* , sugere uma mortadela com uma tonalidade menos avermelhada e mais amarelada.

A diferença global da cor (ΔE^*) foi utilizada para comparar a cor de todos os tratamentos em relação ao controle no momento zero de análise (dia 1), não sendo encontrada diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0.05$). Os valores médios (\pm desvio padrão) de ΔE^* encontrados foram: C (3.18 ± 2.15); T1 (2.80 ± 0.93) e T2 (4.82 ± 2.17). De acordo com Ramos & Gomide (2007), diferenças globais menores que 3,0 não podem ser detectadas pelo olho humano. Logo, apenas o tratamento contendo a nanoemulsão (T2) apresentou uma diferença em sua cor perceptível ao olho humano (Figura 3).

Quanto à análise de ΔE^* com o período de armazenamento, foram encontrados valores muito semelhantes (média \pm desvio padrão): dia 1 (2.12 ± 2.07); dia 3 (4.24 ± 2.28); dia 6 (4.47 ± 2.34); dia 9 (3.68 ± 1.67) e dia 12 (3.49 ± 1.10). Com isso, é possível concluir que a estabilidade da cor dos produtos se manteve em um nível muito semelhante durante todo o experimento (Figura 3).

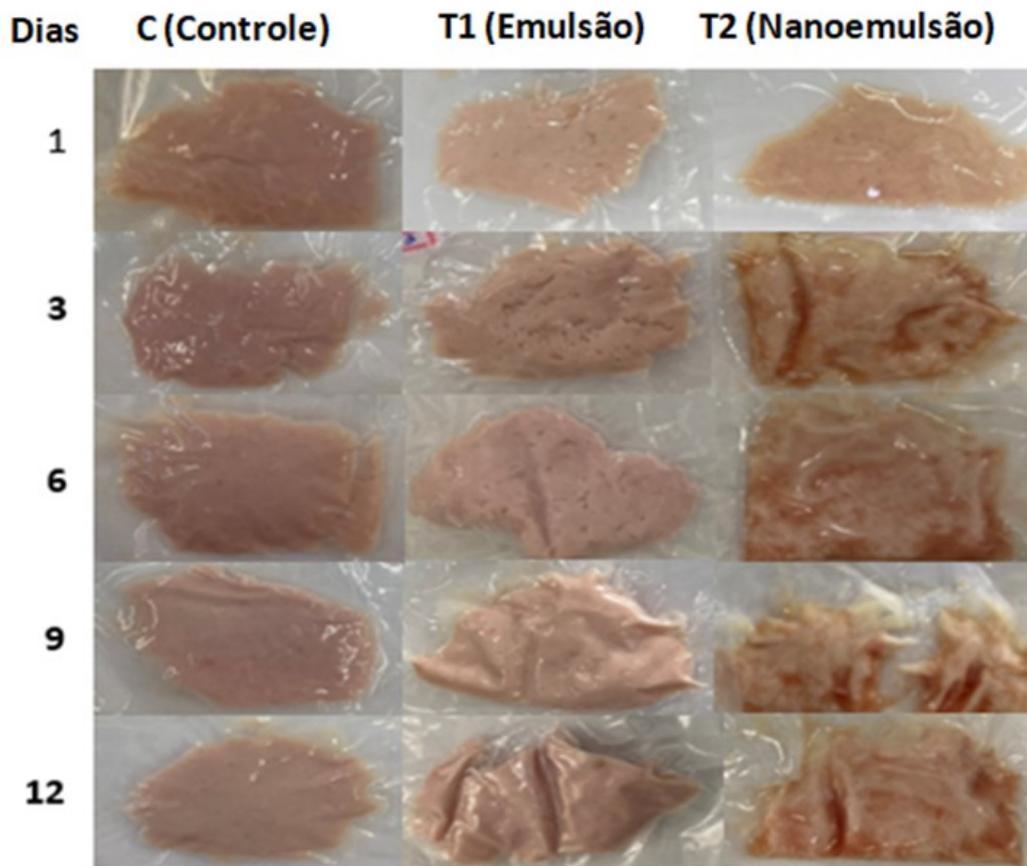


Figura 3 Fotos das mortadelas armazenadas a 4°C por 12 dias. C: sem adição de óleos essenciais e com 50 ppm de nitrito de sódio (controle); T1: emulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio; T2: nanoemulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio.

3.5. Análises sensoriais

Conforme demonstrado na Figura 4, observa-se que os avaliadores apontaram descritores sensoriais diferentes entre amostras avaliadas, sendo os atributos sensoriais de aparência, aroma, sabor e textura relevantes para a descrição das mesmas. A amostra C (controle) foi caracterizada com os maiores percentuais por aparência menos pálida, rosada, homogênea, com presença de olhaduras, aparência característica de mortadela e agradável. Esse descritivo está de acordo com os resultados obtidos pela análise de cor, na qual a mortadela controle se apresentou com os maiores valores de a^* e L^* , sendo a amostra mais vermelha e com maior claridade. Em relação ao

aroma, apresentou-se como agradável e característico de mortadela, e quanto ao sabor, como suave/leve, agradável e também característico de mortadela. E os descritores de textura foram dura, firme e agradável.

Desta forma, nota-se que estes descritores sensoriais levaram os avaliadores a aceitar/comprar a amostra C (controle), em que a média das notas ficaram entre “7 - gostei moderadamente” a “8 - gostei muito” para os atributos de aparência, aroma, sabor, textura e impressão global, e quanto a intenção de compra obteve média entre “4 - provavelmente compraria” a “5 - certamente compraria”.

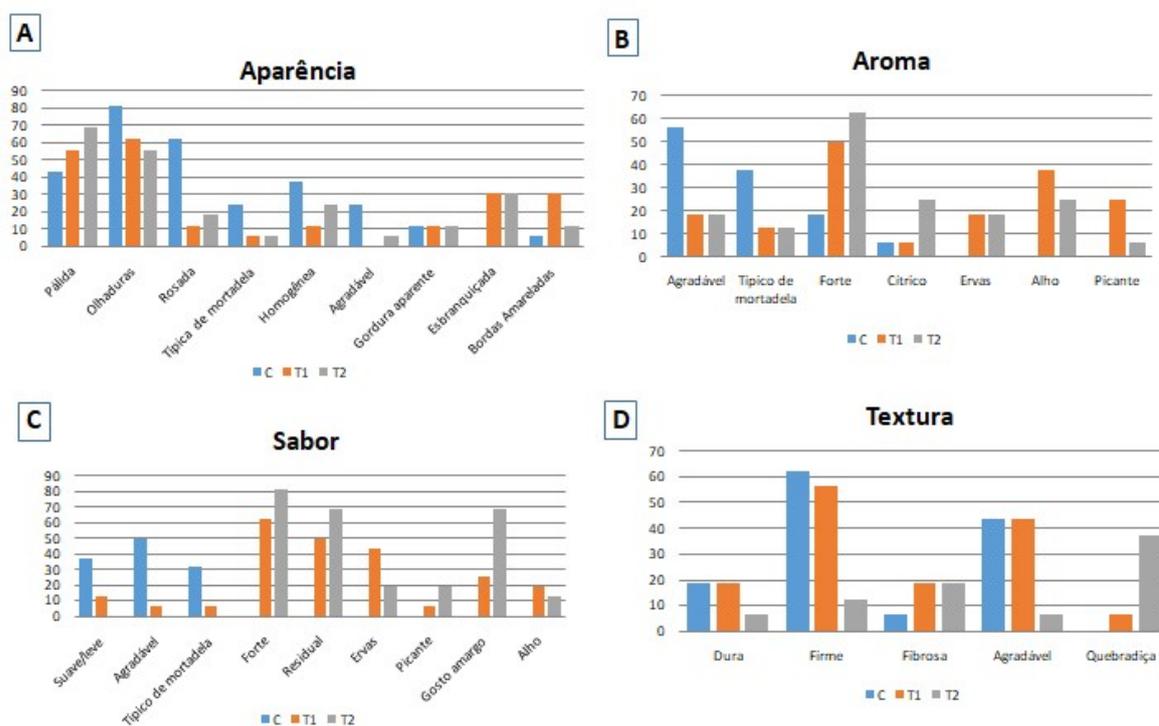


Figura 4 Descrição dos principais atributos sensoriais atribuídos às mortadelas pelos avaliadores do grupo de foco. A: descritivos sensoriais relativos à aparência das amostras; B: descritivos sensoriais relativos ao aroma das amostras; C: descritivos sensoriais relativos ao sabor das amostras; D: descritivos sensoriais relativos à textura das amostras.

C: sem adição de óleos essenciais e com 50 ppm de nitrito de sódio (controle); T1: emulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio; T2: nanoemulsão consistindo em 0.29% óleo de alho, 0.10% óleo de cravo; 0.29% óleo de pimenta rosa e 0.29% óleo de pimenta preta + 50 ppm de nitrito de sódio.

Em relação às amostras T1 (emulsão) e T2 (nanoemulsão), observa-se que a adição de óleo essencial impacta diretamente os descritores sensoriais, tornando as amostras mais pálidas, menos rosadas, esbranquiçadas e com bordas amareladas, confirmando novamente os resultados obtidos pela análise de cor, em que T2 se apresentou com maior coloração amarelada, descaracterizando a cor típica esperada neste tipo de produto cárneo para o consumidor. Ainda, as amostras foram descritas com aroma forte, lembrando a ervas e alho; sabor forte de condimentos, como alho, e com residual amargo, além de gosto amargo e textura quebradiça. No entanto, é possível notar que a amostra T1 teve menores percentuais de alguns destes atributos anteriormente citados, com a média das notas de aceitação para impressão global entre “4 - desgostei ligeiramente” a “5 - nem gostei/nem desgostei” e intenção de compra entre “2 - provavelmente não compraria” a “3 - talvez compraria/talvez não compraria”. Já a amostra T2 apresentou as menores notas médias de aceitação (entre “2 - desgostei muito” a “4 - desgostei ligeiramente”) em relação ao sabor, textura e impressão global.

As nanoemulsões de compostos bioativos, como os óleos essenciais, devido ao seu tamanho diminuto, apresentam uma elevada área superficial. Essa propriedade faz com que os efeitos da nanoemulsão sejam intensificados. Provavelmente, por essa razão foram percebidos pelos provadores sabor e aroma mais fortes na amostra T2 do que nas demais. Ainda, outro fator que poderia contribuir para a menor aceitação dessa amostra se comparada as outras seria o fato desta possuir um maior teor do agente tensoativo Tween 80, utilizado como surfactante para sua elaboração, deixando a amostra com um gosto residual amargo indesejável.

Apesar dos óleos essenciais impactarem no produto cárneo, este estudo indica a relevância e a necessidade de se aumentar as informações disponíveis sobre a saudabilidade no desenvolvimento de novos produtos com ingredientes naturais em substituição a utilização de conservantes artificiais como o nitrito de sódio tanto nas embalagens quanto nos pontos de venda,

uma vez que, quando os avaliadores foram questionados se consumiriam no mercado um produto do tipo mortadela com adição de conservantes naturais com óleos essenciais e se compraria este tipo de produto, 93.75% afirmaram positivamente, mas ressaltam a importância de os novos produtos apresentarem os atributos sensoriais de aparência, aroma, sabor e textura similares aos tradicionais.

É notório que a informação de saudabilidade é importante para elevar a confiança do consumidor no produto que está adquirindo, visto que, muitas das vezes os consumidores não têm pleno conhecimento dos malefícios e benefícios dos produtos comerciais tradicionais. No presente estudo, apesar de 75% dos avaliadores ter dito ter o conhecimento da aplicação de nitrito de sódio e suas vantagens tecnológicas, a maioria não sabia a relação com a saúde humana, mas 93.75% afirmaram que consumiria um produto com o apelo de saudabilidade.

4. CONCLUSÃO

As combinações de OEs avaliadas tanto *in vitro* quanto na mortadela demonstraram efeitos antimicrobianos contra endósporos e células vegetativas de ambos os microrganismos avaliados. As características tecnológicas das mortadelas sofreram alterações com os tratamentos, especialmente no que diz respeito à análise de cor, fazendo com que a adição de OEs tenha forte influência na aparência desse tipo de produto. Fato confirmado pela análise sensorial das mortadelas, em que a adição dos OEs emulsionados e nanoemulsionados afetou de forma negativa a aparência, o sabor e o aroma do produto cárneo. Apesar dos resultados antimicrobianos satisfatórios, ajustes nas concentrações dos óleos bem como na concentração do surfactante utilizado ainda devem ser feitos devido aos efeitos sensoriais indesejados obtidos com as formulações utilizadas.

4. AGRADECIMENTOS

A equipe agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), código de financiamento 001, pela bolsa de doutorado e à Fundação de Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Universidade Federal de Lavras (UFLA) pelo apoio financeiro.

6. CONFLITO DE INTERESSES

Os autores do artigo declaram que não há conflitos de interesse.

7. REFERÊNCIAS

- Abbasi, M. A., Ghazanfari, S., Sharifi, S. D., & Ahmadi Gavlighi, H. (2020). Effect of rosemary essential oil as nitrite substitute on quality of sausage produced using chicken fed by thymus essential oil and rapeseed oil. *Journal of Food Science and Technology*, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04786-8>.
- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry*. 4º Ed. USA.
- Aleixo, G. de C.; Silva, M. S.; Martins, H. H. de A.; Carvalho, R. M. B.; Ramos, E. M. .; Piccoli, R. H. (2022). Effect of essential oils and major compound on *Clostridium botulinum* endospores inoculated in meat product. *Research, Society and Development*, 11, e38811729854-e38811729854. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i7.29854>.
- Andrade, P. L., Bressan, M. C., Gama, L. T. D., Gonçalves, T. D. M., Ladeira, M. M., & Ramos, E. M. (2010). Qualidade da carne maturada de bovinos Red Norte e Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 1791-1800. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000800023>.

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS., 1998. *Official methods of analysis of AOAC International*. 16. ed. Virginia.
- Bakhtiary, F., Sayevand, H. R., Khaneghah, A. M., Haslberger, A. G., & Hosseini, H. (2018). Antibacterial efficacy of essential oils and sodium nitrite in vacuum processed beef fillet. *Applied food biotechnology*, 5, 1-10. <https://doi.org/10.22037/afb.v5i1.17118>.
- Barradas, T. N., & de Holanda e Silva, K. G. (2021). Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 1153-1171. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01142-2>.
- Bedale, W., Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2016). Dietary nitrate and nitrite: Benefits, risks, and evolving perceptions. *Meat Science*, 120, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.009>.
- Benjemaa, M., Neves, M. A., Falleh, H., Isoda, H., Ksouri, R., & Nakajima, M. (2018). Nanoencapsulation of *Thymus capitatus* essential oil: Formulation process, physical stability characterization and antibacterial efficiency monitoring. *Industrial Crops and Products*, 113, 414-421. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.062>.
- Bozzola, J. J.; Russell, L. D. Electron microscopy. Boston, Ed. Jones and Bartlett, 1999. 67 p.
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00089-9](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00089-9).
- Brown, J. L., Tran-Dinh, N., & Chapman, B. (2012). *Clostridium sporogenes* PA 3679 and its uses in the derivation of thermal processing schedules for low-acid shelf-stable foods and as a research model for proteolytic *Clostridium botulinum*. *Journal of Food Protection*, 75, 779-792. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-391>.

- Brunt, J., Plowman, J., Gaskin, D. J., Itchner, M., Carter, A. T., & Peck, M. W. (2014). Functional characterisation of germinant receptors in *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* presents novel insights into spore germination systems. *PLoS pathogens*, *10*, e1004382. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004382>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*, 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
- Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Izumi, S., & Hirata, T. (2004). Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour and Fragrance Journal*, *19*, 62-68. <https://doi.org/10.1002/ffj.1279>.
- Cecchini, M. E., Paoloni, C., Campra, N., Picco, N., Grosso, M. C., Perez, M. S., & Bellingeri, R. (2021). Nanoemulsion of *Minthostachys verticillata* essential oil. In-vitro evaluation of its antibacterial activity. *Heliyon*, *7*, e05896. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05896>.
- Chaibi, A., Ababouch, L. H., Belasri, K., Boucetta, S., & Busta, F. F. (1997). Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. *Food Microbiology*, *14*, 161-174. <https://doi.org/10.1006/fmic.1996.0075>.
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils present status and future perspectives. *Medicines*, *4*, 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>.
- Cofrades, S., Serrano, A., Ayo, J., Solas, M. T., Carballo, J., & Jiménez Colmenero, F. (2004). Restructured beef with different proportions of walnut as affected by meat particle

- size. *European Food Research and Technology*, 218, 230-236.
<https://doi.org/10.1007/s00217-003-0808-y>.
- de Abreu Martins, H. H., Turmo-Ibarz, A., Piccoli, R. H., Martín-Belloso, O., & Salvia-Trujillo, L. (2021). Influence of lipid nanoparticle physical state on β -carotene stability kinetics under different environmental conditions. *Food & Function*, 12, 840-851.
<https://doi.org/10.1039/D0FO01980A>.
- de Oca-Ávalos, J. M. M., Candal, R. J., & Herrera, M. L. (2017). Nanoemulsions: stability and physical properties. *Current Opinion in Food Science*, 16, 1-6.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.06.003>.
- de Oliveira, T. L. C., de Araújo, Soares, R., Ramos, E. M., das Graças Cardoso, M., 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. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 546-555. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.022>.
- Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., & Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 107-115.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.025>.
- Dias, N. A. A., Pinelli, J. J., Silva, M. S., Isidoro, S. R., de Abreu Martins, H. H., Gonçalves, M. C., & Piccoli, R. H. (2022). Viability of *Clostridium difficile* in mortadella with added essential oils and reduced sodium nitrite content. *Research, Society and Development*, 11(9), e22111931106-e22111931106. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i9.31106>.

- Djihane, B., Wafa, N., Elkhamssa, S., Maria, A. E., & Mihoub, Z. M. (2017). Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *25*, 780-787. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.11.001>.
- Do Amaral, M. T.; Viana, C. E.; Aranha, B. C.; Epping, N. C.; Prestes, O. D.; Augusti, P. R. Sistema CIELAB para avaliação da cor de produtos cárneos. In: Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 4, n.1, 2013.
- Domingo J. L., & Nadal, M. (2017). Carcinogenicity of consumption of red meat and processed meat: A review of scientific news since the IARC decision. *Food and Chemical Toxicology*, *105*, 256–261. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.028>.
- Donsì, F., & Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, *233*, 106-120. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.005>.
- Dutra, M. P., de Cássia Aleixo, G., Ramos, A. D. L. S., Silva, M. H. L., Pereira, M. T., Piccoli, R. H., & Ramos, E. M. (2016). Use of gamma radiation on control of *Clostridium botulinum* in mortadella formulated with different nitrite levels. *Radiation Physics and Chemistry*, *119*, 125-129. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2015.10.008>.
- Dutra, M. P., Ramos, E. M., Ramos, A. D. L. S., Fontes, P. R., Cardoso, G. P., & Leal, A. S. (2011). Gamma radiation and storage time on lipidic oxidation, color, heme pigments and residual nitrite of bologna-type sausages formulated with different nitrite additions. *Ciência Rural*, *41*, 2203-2209. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000143>.

- Fernández-López, J., & Viuda-Martos, M. (2018). Introduction to the special issue: application of essential oils in food systems. *Foods*, 7, 56. <https://doi.org/10.3390/foods7040056>.
- Fiorda, F. A., & de Siqueira, M. I. D. (2009). Avaliação do pH e Atividade de água em Produtos Cárneos. *Revista EVS - Revista de Ciências Ambientais e Saúde*, 36, 817-826. <http://dx.doi.org/10.18224/est.v36i4.1132>.
- Gill, A. O., Delaquis, P., Russo, P., & Holley, R. A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 83–92. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00712-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00712-7).
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26, 142-150. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.10.008>.
- Hastaoğlu, E., Vural, H., & Can, Ö. P. (2021). Effects of thymol and rosemary essential oils and red beet extract on low-nitrite and carmine-free beef Mortadella. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45, e15855. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15855>.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>.
- Ismail, A. A., & Pierson, M. D. (1990). Inhibition of germination, outgrowth, and vegetative growth of *Clostridium botulinum* 67B by spice oils. *Journal of Food Protection*, 53, 755-758. <https://doi-org/10.4315/0362-028X-53.9.755>.
- Jafari, M., & Emam-Djomeh, Z. (2007). Reducing nitrite content in hot dogs by hurdle technology. *Food Control*, 18, 1488-1493. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.11.007>.

- Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y. J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C. J., & Liu, X. L. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *32*, 63-68. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.03.011>.
- Kumar, N., & Mandal, A. (2018). Surfactant stabilized oil-in-water nanoemulsion: stability, interfacial tension, and rheology study for enhanced oil recovery application. *Energy & fuels*, *32*, 6452-6466. <https://doi-org/10.1021/acs.energyfuels.8b00043>.
- Lee, W. H., & Riemann, H. (1970). The genetic relatedness of proteolytic *Clostridium botulinum* strains. *Microbiology*, *64*, 85-90. <https://doi.org/10.1099/00221287-64-1-85>.
- Li, P. H., & Lu, W. C. (2016). Effects of storage conditions on the physical stability of D-limonene nanoemulsion. *Food Hydrocolloids*, *53*, 218-224. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.031>.
- Liu, Q., Zhang, M., Bhandari, B., Xu, J., & Yang, C. (2020). Effects of nanoemulsion-based active coatings with composite mixture of star anise essential oil, polylysine, and nisin on the quality and shelf life of ready-to-eat Yao meat products. *Food Control*, *107*, 106771. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106771>.
- Lonati, D., Schicchi, A., Crevani, M., Buscaglia, E., Scaravaggi, G., Maida, F., & Locatelli, C. A. (2020). Foodborne botulism: Clinical diagnosis and medical treatment. *Toxins*, *12*, 509. <https://doi.org/10.3390/toxins12080509>.
- Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., & Li, C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, *44*, 3057-3064. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.030>.
- Mancini, S., Preziuso, G., Dal Bosco, A., Roscini, V., Szendrő, Z., Fratini, F., & Paci, G. (2015). Effect of turmeric powder (*Curcuma longa* L.) and ascorbic acid on physical

- characteristics and oxidative status of fresh and stored rabbit burgers. *Meat Science*, *110*, 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.07.005>.
- Martins, H. H. D. A., Simões, L. A., Isidoro, S. R., Nascimento, S. D. S., Alcântara, J. P., Ramos, E. M., & Piccoli, R. H. (2021). Preservative of Essential Oil Blends: Control of *Clostridium perfringens* Type a in Mortadella. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *64*. e21200106. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021200106>.
- Mendes, J. F., Martins, H. H. A., Otoni, C. G., Santana, N. A., Silva, R. C. S., da Silva, A. G., Silva, M. V., Correia, M. T. S., Machado, G., Pinheiro, A. C. M., Piccoli, R. H., & Oliveira, J. E. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of *Eugenia brejoensis* essential oil nanoemulsions against *Pseudomonas fluorescens*. *LWT*, *93*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.015>.
- Moazeni, M., Davari, A., Shabanzadeh, S., Akhtari, J., Saeedi, M., Mortyeza-Semnani, K., & Nokhodchi, A. (2021). In vitro antifungal activity of *Thymus vulgaris* essential oil nanoemulsion. *Journal of Herbal Medicine*, *28*, 100452. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100452>.
- Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A., & McClements, D. J. (2016). Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chemistry*, *194*, 410-415. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.139>.
- Moleyar, V., & Narasimham, P. (1992). Antibacterial activity of essential oil components. *International Journal of Food Microbiology*, *16*, 337-342. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90035-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90035-2).
- Monteschio, J. D. O., de Vargas Junior, F. M., Alves da Silva, A. L., das Chagas, R. A., Fernandes, T., Leonardo, A. P., & Muir, J. P. (2021). Effect of copaíba essential oil

- (*Copaifera officinalis* L.) as a natural preservative on the oxidation and shelf life of sheep burgers. *Plos one*, *16*, e0248499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248499>.
- Moraes-Lovison, M., Marostegan, L. F., Peres, M. S., Menezes, I. F., Ghiraldi, M., Rodrigues, R. A., & Pinho, S. C. (2017). Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: Production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken pâté. *LWT*, *77*, 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.061>.
- Mukurumbira, A. R., Shellie, R. A., Keast, R., Palombo, E. A., & Jadhav, S. R. (2022). Encapsulation of essential oils and their application in antimicrobial active packaging. *Food Control*, *136*, 108883. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108883>.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2019). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*; 29th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Odriozola-Serrano, I., Oms-Oliu, G., & Martín-Belloso, O. (2014). Nanoemulsion-based delivery systems to improve functionality of lipophilic components. *Frontiers in Nutrition*, *1*, 24. <https://doi.org/10.3389/fnut.2014.00024>.
- Oulkheir, S., Aghrouch, M., El Mourabit, F., Dalha, F., Graich, H., Amouch, F., & Chadli, S. (2017). Antibacterial activity of essential oils extracts from cinnamon, thyme, clove and geranium against a gram negative and gram positive pathogenic bacteria. *Journal of Diseases and Medicinal Plants*, *3*, 1-5. <https://doi.org/10.11648/j.jdmp.s.2017030201.11>.
- Özogul, Y., Özogul, F., & Kulawik, P. (2021). The antimicrobial effect of grapefruit peel essential oil and its nanoemulsion on fish spoilage bacteria and food-borne pathogens. *LWT*, *136*, 110362. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110362>.

- Pavoni, L., Perinelli, D. R., Bonacucina, G., Cespi, M., & Palmieri, G. F. (2020). An overview of micro-and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. *Nanomaterials*, *10*, 135. <https://doi.org/10.3390/nano10010135>.
- Peck, M. W., & van Vliet, A. H. (2016). Impact of *Clostridium botulinum* genomic diversity on food safety. *Current Opinion in Food Science*, *10*, 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.09.006>.
- Pinelli, J. J., de Abreu Martins, H. H., Guimarães, A. S., Isidoro, S. R., Gonçalves, M. C., de Moraes, T. S. J., & Piccoli, R. H. (2021). Essential oil nanoemulsions for the control of *Clostridium sporogenes* in cooked meat product: An alternative?. *LWT*, *143*, 111123. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111123>.
- Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2012). Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. *Food chemistry*, *132*, 1221-1229. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.091>.
- Ramos, E. M., & Gomide, L. D. M. (2007). *Avaliação da qualidade de carnes. Fundamentos e Metodologias*. Ed. UFV, Viçosa.
- Ramos, E. M., Ramos, A. L. S., Scarpa, A. B. O., Chinait, T. M. N., Gomide, L. A. M., Fontes, & P. R. (2009). Otimização da avaliação objetiva da cor de presuntos e apresuntados. In: V Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia De Carnes, São Paulo.
- Rao, J., Chen, B., & McClements, D. J. (2019). Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: Mechanisms of action. *Annual Review of Food Science and Technology*, *10*, 365-387. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121727>.
- Rödel, W., Scheuer, R., & Wagner, H. (1990). Nuevo metodo para la determinacion de la actividad agua en produtos cárnicos. *Fleischwirtschaft*, *2*, 36-41.

- Roy, A., & Guha, P. (2018). Formulation and characterization of betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil based nanoemulsion and its in vitro antibacterial efficacy against selected food pathogens. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42, e13617. <https://doi.org/10.3390/molecules23092164>.
- Sebranek, J. G., & Bacus, J. N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science*, 77, 136-147. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.03.025>.
- Shahbazi, Y. (2019). Antioxidant, antibacterial, and antifungal properties of nanoemulsion of clove essential oil. *Nanomedicine Research Journal*, 4, 204-208. <https://doi.org/10.22034/nmrj.2019.04.001>.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.003>.
- Sikkema, J.; de Bont, J. A.; Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 8022–8028. <https://doi.org/10.3109/10242429409065221>.
- Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2011). Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curing and examining the risk/benefit of its use. *American Meat Science Association White Paper Series*, 3, 1-14.
- Speranza, B., and Corbo, M. R. (2010). “Essential oils for preserving perishable foods: possibilities and limitations,” in *Application of Alternative Food Preservation Technologies to Enhance Food Safety and Stability*, eds A. Bevilacqua, M. R. Corbo, and M. Sinigaglia (Sharjah: Bentham Publisher), 35–57.
- Szymański, P., Łaszkiwicz, B., Siekierko, U., & Kołożyn-Krajewska, D. (2020). Effects of the

- use of *Staphylococcus carnosus* in the curing process of meat with a reduced amount of sodium nitrite on colour, residue nitrite and nitrate, content of nitrosyl pigments, and microbiological and the sensory quality of cooked meat product. *Journal of Food Quality*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6141728>.
- Tang, Y., Li, F., Gu, D., Wang, W., Huang, J., & Jiao, X. (2021). Antimicrobial effect and the mechanism of diallyl trisulfide against *Campylobacter jejuni*. *Antibiotics*, 10, 246. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030246>.
- 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, 568–576. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.03.007>.
- Wang, X., Shen, Y., Thakur, K., Han, J., Zhang, J. G., Hu, F., & Wei, Z. J. (2020). Antibacterial activity and mechanism of ginger essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 25, 3955. <https://doi.org/10.3390/molecules25173955>.
- Wang, Y., Wei, K., Han, X., Zhao, D., Zheng, Y., Chao, J., & Zhang, C. S. (2019). The antifungal effect of garlic essential oil on *Phytophthora nicotianae* and the inhibitory component involved. *Biomolecules*, 9, 632. <https://doi.org/10.3390/biom9100632>.
- Weigand, M. R., Pena-Gonzalez, A., Shirey, T. B., Broeker, R. G., Ishaq, M. K., Konstantinidis, K. T., & Raphael, B. H. (2015). Implications of genome-based discrimination between *Clostridium botulinum* group I and *Clostridium sporogenes* strains for bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 5420-5429. <https://doi.org/10.1128/AEM.01159-15>.
- Wu, J. I. J., RIEMANN, H. & LEE, W. H. (1972). Thermal stability of the deoxyribonucleic acid hybrids between the proteolytic strains of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes*. *Canadian Journal of Microbiology* 18, 97-99.

- Yazgan, H. (2020). Investigation of antimicrobial properties of sage essential oil and its nanoemulsion as antimicrobial agent. *Lwt*, *130*, 109669. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109669>.
- Ziarati, P., Zahedi, M. T., Shirkhan, F., & Mostafidi, M. (2018). Potential health risks and concerns of high levels of nitrite and nitrate in food sources. *SciFed Pharmaceutics Journal*, *1*, 1-13.