



LUCIANA TEIXEIRA DE SIQUEIRA RODRIGUES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS SOBRE *Clostridium botulinum*
INOCULADO EM MORTADELAS**

LAVRAS – MG

2014

LUCIANA TEIXEIRA DE SIQUEIRA RODRIGUES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE
Clostridium botulinum INOCULADO EM MORTADELAS**

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

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Coorientador

Dr. Eduardo Mendes Ramos

LAVRAS - MG

2014

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

Rodrigues, Luciana Teixeira de Siqueira.

Atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre *Clostridium
botulinum* inoculado em mortadela / Luciana Teixeira de Siqueira
Rodrigues. – Lavras: UFLA, 2014.

98 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Produto cárneo. 2. Bactéria. 3. Agentes antibacterianos. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

LUCIANA TEIXEIRA DE SIQUEIRA RODRIGUES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE
Clostridium botulinum INOCULADO EM MORTADELAS**

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

APROVADA em 30 de abril de 2014.

Dr. Eduardo Mendes Ramos UFLA

Dra. Sandra Maria Oliveira Morais Veiga UNIFAL

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS – MG
2014**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por iluminar meu caminho, me protegendo e me dando forças e por todas as graças recebidas.

Aos meus amados pais, João Lafaiete e Maria do Carmo, pelo amor incondicional, por não medir esforços para me ajudar, por estarem sempre presentes, me incentivando e pelas orações.

Ao meu irmão, Lafaiete, pelo amor, incentivo e apoio.

Ao meu esposo, Izaias, pelo amor, incentivo, paciência e compreensão nos momentos em que mais precisou de mim.

À professora Roberta Hilsdorf Piccoli, pela orientação, carinho, amizade, paciência, confiança e receptividade, ao permitir que eu fizesse parte de seu grupo, pelos conhecimentos compartilhados. A você, minha eterna gratidão e admiração!

Ao professor Eduardo Mendes Ramos, pela coorientação, amizade, carinho, prontidão em me atender, pela confiança e receptividade em seu laboratório. Sua colaboração foi essencial!

À professora Sandra Maria, pela receptividade, disponibilidade e contribuição na banca.

Ao Victor Tebaldi, pela amizade e contribuição para a dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela amizade, apoio e incentivo, pelo agradável convívio durante esses anos, em especial, Nayane, Letícia, Aline, Hélio, Danilo, Maíra, Sílvia, Victor, Thales, Heloísa, Luara, Glécia, Kelly, Bruna, Tenille e Mariana.

À técnica Eliane, pela amizade, carinho e disponibilidade em todos os momentos.

Às estagiárias Kelly e Bruna, pela amizade, carinho, incentivo e valiosa contribuição nas análises.

À minha amiga Nayane, pela amizade, companheirismo, auxílio em todas as etapas, por estar sempre presente me incentivando e por também ser responsável pela concretização desse sonho.

Às amigas Dayana e Letícia, pela amizade, carinho e incentivo e por estarem presentes em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Carnes, pela amizade, apoio, auxílio e receptividade, em especial, professora Alcinéia, Ítalo, Élide, Carol, Douglas, Gisele e Monalisa.

Ao Ítalo, pela amizade, disponibilidade e valiosa contribuição nas análises físico-químicas.

Às funcionárias do Departamento de Ciências dos Alimentos, pela amizade e disponibilidade, em especial Lucilene, Tina e Heloísa.

Aos colegas do Departamento de Ciências dos Alimentos, pela amizade e harmônica convivência.

À amiga Belami Cássia da Silva, pelo carinho, incentivo e ensinamentos transmitidos.

A todos os amigos e familiares, pelo incentivo, carinho e orações.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos.

A Fapemig e à Capes, pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste sonho.

RESUMO

Objetivou-se, com este trabalho, verificar a atividade antibacteriana, *in vitro* e *in situ*, de diferentes óleos essenciais e suas combinações sobre *C. botulinum* do tipo D e seus efeitos sobre características físicas químicas da mortadela. Para determinar a concentração mínima bactericida (CMB), tanto dos óleos essenciais isolados como da combinação, foi utilizada a técnica de diluições em caldo, com posterior plaqueamento em meio ágar base de isolamento de *C. botulinum*. As mortadelas foram elaboradas com as combinações de óleos essenciais que apresentaram menores concentrações mínimas bactericidas e diferentes níveis de nitrito de sódio. As amostras para análises microbiológicas foram armazenadas, a 25 °C, por 20 dias, sendo inoculadas com 10⁵ UFC/g de *C. botulinum* e as amostras para análises físico-químicas foram armazenadas, a 4 °C, por 20 dias, sem inóculo. Observou-se que o óleo essencial de canela foi o mais efetivo sobre *C. botulinum*, seguido de orégano, tomilho e cravo-botão, com CMB de 0,5%, 1,5%, 2% e 7%, respectivamente. Entretanto, os óleos de cardamomo, sálvia, basilicão, limão-siciliano, alecrim, gengibre e noz-moscada não apresentaram CMB em nenhuma das concentrações testadas sobre *C. botulinum* do tipo D. Para as combinações, todas as concentrações utilizadas apresentaram efeito bactericida. Na mortadela, os tratamentos contendo combinações de óleos essenciais e diferentes níveis de nitrito não foram eficientes para inibir completamente as células vegetativas de *C. botulinum*, favorecendo o crescimento e a esporulação, exceto o tratamento 4, que inibiu completamente a esporulação. Em relação às características físico-químicas do produto, os tratamentos não diferiram entre si, quanto à oxidação lipídica, aw, pH e cor, apresentando efeito somente do tempo de armazenamento. Porém, a análise de nitrito de sódio apresentou diferença ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos, ocorrendo maior redução de nitrito residual na mortadela contendo apenas 75 ppm de nitrito de sódio, sem adição do óleo essencial.

Palavras-chave: *Clostridium botulinum*. Óleos essenciais. Concentração Mínima Bacteriana. Mortadela.

ABSTRACT

The objective of this work to investigate the antibacterial activity in vitro and in situ of different essential oils and their combinations on *C. botulinum* type D, and its effects on physic-chemical characteristics of mortadella. To determine the minimum bactericidal concentration (MBC), both from isolated essential oils and combining was used dilution technique in broth with subsequent plating on agar base isolation of *C. botulinum*. The mortadellas were prepared with combinations of essential oils that presented lower minimum bactericidal concentrations and different levels of sodium nitrite. Samples for microbiological analysis were stored at 25 °C for 20 days, inoculated with 10⁵ CFU/g of *C. botulinum* and samples for physic-chemical analysis were stored at 4 °C for 20 days without inoculum. It was observed that the cinnamon essential oil was the most effective against *C. botulinum*, followed by oregano, thyme and clove bud with MBC of 0,5%, 1,5%, 2% and 7%, respectively. However, the oils cardamom, sage, basilicon, sicilian lemon, rosemary, ginger and nutmeg, showed no MBC in any of the tested concentrations on *C. botulinum* type D. For the combinations, all concentrations showed bactericidal effect. In the mortadella treatments with combinations of essential oils and different levels of nitrite have not been completely effective in inhibiting the vegetative cells of *C. botulinum*, favoring the growth and sporulation, except the treatment 4 that completely inhibits the sporulation. In relation to the physic-chemical characteristics of the product, the treatments did not differ among themselves as to lipid oxidation, aw, pH and color, presenting only effect of storage time. However, the analysis of sodium nitrite was different (p≤0,05) among treatments resulted in higher reduction in residual nitrite in the mortadella containing only 75 ppm of sodium nitrite, no added of essential oil.

Keywords: *Clostridium botulinum*. Essential oils. Minimum Bacterial Concentration. Mortadella.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama esquemático que ilustra o mecanismo de ação da neurotoxina botulínica (BoNT)	21
Figura 2	Ação dos óleos essenciais na célula bacteriana	30
Figura 3	Crescimento de <i>Clostridium botulinum</i> tipo D em mortadelas adicionadas de nitrito de sódio e diferentes combinações de óleos essenciais.....	64
Figura 4	Esporulação de <i>Clostridium botulinum</i> tipo D em mortadelas adicionadas de nitrito de sódio e diferentes combinações de óleos essenciais.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Planejamento experimental para avaliação da combinação de três óleos essenciais, considerando a proporção referente à concentração mínima bactericida (CMB) de cada óleo analisado	45
Tabela 2	Formulação padrão para a elaboração da mortadela	47
Tabela 3	Concentração mínima bactericida (%) dos óleos essenciais sobre células vegetativas de <i>C. botulinum</i> do tipo D.....	53
Tabela 4	Concentração mínima bactericida das combinações de óleos essenciais de orégano, canela, tomilho e cravo-botão, utilizados nas análises de sinergismo sobre <i>C. botulinum</i>	57
Tabela 5	Proporções de diferentes combinações de óleos essenciais e concentrações de NO ₂ adicionadas em mortadelas, com base na CMB de cada óleo essencial, calculadas seguindo o ensaio 7 do planejamento experimental (67% óleo A; 17% óleo B e 17% óleo C), conforme Tabela 1	60
Tabela 6	Valores de pH durante o armazenamento (4 °C) de mortadelas com diferentes concentrações de nitrito e combinações de óleos essenciais.....	61
Tabela 7	Valores médios de NO ₂ residual em mortadelas contendo diferentes concentrações de nitrito e combinação de óleos essenciais.....	62
Tabela 8	Índice de TBARs durante o armazenamento (4°C) de mortadelas com diferentes concentrações de nitrito e combinações de óleos essenciais.....	71
Tabela 9	Valores médios da cor durante o armazenamento (4°C) de mortadelas com diferentes concentrações de nitrito e combinações de óleos essenciais.....	74

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Doenças transmitidas por alimentos	14
2.1.1	<i>Clostridium botulinum</i>	16
2.1.2	Botulismo	17
2.1.3	Toxina botulínica	19
2.1.4	Botulismo alimentar no Brasil	21
2.2	Produtos cárneos	23
2.2.1	Nitrito de sódio	24
2.3	Óleos essenciais	26
2.3.1	Mecanismos de ação dos óleos essenciais	29
2.3.2	Orégano e tomilho	30
2.3.3	Canela	31
2.3.4	Alecrim e Sálvia	32
2.3.5	Pimenta chinesa	34
2.3.6	Cardamomo	34
2.3.7	Manjerição ou basilicão	36
2.3.8	Cravo-da-índia (botão)	36
2.3.9	Gengibre	37
2.3.10	Limão-siciliano	38
2.3.11	Noz-moscada	38
2.4	Óleos essenciais como antioxidantes	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	Local e condução do experimento	42
3.2	Óleos essenciais e MIC	42
3.3	Microrganismo, manutenção e padronização do inóculo	43
3.4	Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais sobre <i>Clostridium botulinum</i>	44
3.5	Estudo do sinergismo entre os óleos essenciais	44
3.6	Elaboração da mortadela	46
3.7	Quantificação de <i>Clostridium botulinum</i> em mortadela	48
3.7.1	Contagem total de <i>C. botulinum</i>	48
3.7.2	Contagem de endósporos	48
3.8	Análises físico-químicas das mortadelas	49
3.8.1	Determinação do pH	49
3.8.2	Atividade de água (Aw)	49
3.8.3	Análise de cor objetiva	49
3.8.4	Análise da oxidação lipídica	50
3.8.5	Análise de concentração de nitrito	51

3.9	Análise Estatística.....	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1	Concentração mínima bactericida.....	53
4.2	Sinergismo entre os óleos essenciais	56
4.3	Efeito conservante sobre <i>C. botulinum</i> inoculado em mortadela ..	59
4.3.1	Análises físico-químicas	60
4.3.2	Contagem total de <i>C. botulinum</i> em mortadelas.....	63
4.3.3	Contagem de endósporos	68
4.4	Análises tecnológicas	71
4.4.1	Oxidação lipídica	71
4.4.2	Análise de cor.....	73
5	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

O botulismo alimentar é uma doença não contagiosa, causada pela ingestão de alimento contaminado pela exotoxina produzida por *Clostridium botulinum* e se caracteriza, clinicamente, por manifestações neurológicas, inicialmente inespecíficas, como cefaleia, tontura, visão turva, disfagia, paralisia flácida descendente, insuficiência respiratória e tetraplégia, podendo ter evolução grave com alta letalidade e com necessidade de hospitalização prolongada.

Recentemente, casos de botulismo envolvendo produtos de origem animal foram notificados ao Ministério da Saúde. Alguns tiveram grande destaque na imprensa nacional, como um surto em 2011, no estado de Santa Catarina, envolvendo seis pessoas com um óbito e, em 2012, no estado do Paraná, envolvendo quatro pessoas com dois óbitos, sendo a mortadela o principal alimento suspeito.

Clostridium botulinum é uma bactéria anaeróbia obrigatória e formadora de endósporos, os quais, por serem amplamente distribuídos no solo, na água e nos vegetais, podem facilmente estar presente nos alimentos processados. Sua germinação, crescimento e produção de exotoxina necessitam de algumas condições que podem ser encontradas em alimentos, como anaerobiose, pH acima de 4,6 e atividade de água maior que 0,94.

Entre os alimentos comumente associados à doença estão os produtos cárneos cozidos, como a mortadela, sendo esta de grande aceitação mundial. No Brasil, seu consumo se popularizou, especialmente por ser um produto elaborado a partir de carnes de vários cortes e por ser considerada fonte de proteína de origem animal de baixo custo.

Nitrito de sódio é amplamente utilizado em produtos cárneos, inclusive em mortadela, conferindo sabor e cor ao produto, além de apresentar ação

antioxidante e antimicrobiana, devido à sua capacidade de inibir a germinação dos endósporos de várias espécies de *Clostridium*, não ocorrendo, assim, a produção de toxinas. Porém, o emprego desse sal em níveis elevados pode trazer sérios riscos à saúde dos consumidores, pois derivados do nitrito podem reagir com aminas presentes no alimento, originando nitrosaminas e nitrosamidas, substâncias consideradas carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas.

Assim, buscam-se conservantes alternativos, visando reduzir a utilização de sais de nitrito na mortadela. Os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados como aromatizantes e são promissores como antioxidantes e conservantes, sendo uma alternativa para a obtenção de produtos microbiologicamente seguros. Porém, pouco se sabe sobre a eficiência destes antimicrobianos naturais sobre *Clostridium botulinum*.

Com isso, objetivou-se avaliar a atividade antibacteriana, *in vitro* e *in situ*, de diferentes óleos essenciais e suas combinações sobre *Clostridium botulinum* do tipo D e seus efeitos sobre as características físico-químicas de mortadela.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doenças transmitidas por alimentos

Nos últimos anos, tem havido um aumento dramático, em todo o mundo, no número de casos de doenças transmitidas por alimentos. As doenças infecciosas de origem alimentar, designadas também por toxinfecções alimentares, são um problema grave em saúde pública, constituindo uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, particularmente para grupos populacionais de risco, como idosos, crianças, grávidas e imunocomprometidos. As consequências dessas doenças podem ser ampliadas em âmbito mundial, entre outros fatores, pelo aumento da mobilidade das populações e pela globalização do comércio alimentar (CORREIA, 2010).

Ao contrário do que habitualmente se considera, as toxinfecções alimentares podem ser causa de doenças crônicas e agudas, com manifestações diversas, como neurológicas, cardíacas, renais, articulares, fetais, endócrinas e imunológicas, sendo as mais comuns as gastrintestinais. Os casos mais graves podem deixar sequelas, conduzir à falência de vários órgãos e levar à morte (CORREIA, 2010).

De acordo com Forsythe (2010), a maioria dos surtos provocados por doenças transmitidas por alimentos (DTA) tem sido relacionada à ingestão de alimentos com boa aparência, sabor e odor normais, sem qualquer alteração organoléptica visível. Isso ocorre porque a dose infectante de patógenos alimentares, geralmente, é menor que a quantidade de microrganismos necessária para degradar os alimentos. Problemas como esses dificultam a rastreabilidade dos alimentos causadores de surtos, tendo em vista que, na maior parte dos casos, os consumidores afetados dificilmente conseguem identificar os

alimentos fonte da DTA. Alimentos com características sensoriais alteradas dificilmente causam surtos alimentares, pois, normalmente, são rejeitados devido à sensação repulsiva que causam aos consumidores. Nessas condições, a contaminação microbiana é elevada, podendo ultrapassar a 10^8 UFC/g de alimento.

Apesar de todos os esforços para a prevenção de DTA, essas doenças continuam a ser uma preocupação importante da saúde pública em todo o mundo (SCALLAN et al., 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde indicam que os surtos de doenças transmitidas por alimentos, no Brasil, no período de 1999 a 2008, foram 6.602, envolvendo 117.330 pessoas doentes e 64 óbitos. Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde, estes números estariam muito aquém do quadro real. Os dados disponíveis indicam que o agente etiológico foi ignorado em 51% dos surtos e, em 34,3% deles, o alimento é desconhecido (SIQUEIRA, 2009).

O Brasil ainda está enfrentando problemas no controle de doenças transmitidas por alimentos em todo o seu território, com uma população de mais de 195 milhões de habitantes. Entre 2000 e 2013, o Ministério da Saúde registrou 8.857 surtos de intoxicação alimentar, 163.425 pessoas infectadas e 112 mortes, devido às DTA, no Brasil. Estes foram os números relatados oficialmente, mas acredita-se que o número real de casos de intoxicação alimentar seja muito maior (BRASIL, 2014).

De acordo com o Centro de Controle de Prevenção de Doenças (CDC), dos Estados Unidos, estima-se que 48 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos sejam notificados naquele país, a cada ano (1 em cada 6 americanos), resultando em 128.000 internações e 3.000 mortes (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

Segundo Maki (2009), o custo total de todos os surtos para a sociedade é enorme e apenas um pequeno número deles é notificado e recebe a atenção dos órgãos públicos e da mídia.

Atualmente, existem cerca de 250 agentes de doenças transmitidas por alimentos, que podem ser identificados quando um ou mais indivíduos apresentam sintomas similares após a ingestão de alimentos contaminados com microrganismos ou suas toxinas (LINSCOTT, 2011). No caso de patógenos alimentares altamente virulentas, tais como *Clostridium botulinum* e *Escherichia coli* O157: H7, presume-se que apenas um caso pode ser considerado como um surto (OLIVEIRA et al., 2010).

A incidência de botulismo é considerada baixa, porém, quando a doença não é tratada imediatamente e adequadamente, a taxa de mortalidade é alta. Alguns casos de botulismo podem passar sem diagnóstico porque os sintomas são transitórios ou leves ou são mal diagnosticados, podendo ser considerado síndrome de Guillain-Barré (ABRAHAM et al., 2012).

2.1.1 *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum é uma bactéria anaeróbica estrita, gram-positiva, que se apresenta na forma de bacilo, habitante normal do solo e que pode esporular em condições adversas. Existem oito tipos de *C. botulinum*, classificados de A até G, sendo produtores de toxinas (WOBESER, 1997).

A bactéria pode se desenvolver em vários tipos de substratos, desde que haja ambiente favorável, associado a condições de anaerobiose que permitam sua multiplicação, tais como cadáveres, alimentos, poças e lagoas com água estagnada (TAKEDA et al., 2006). Aparece também como habitante normal do trato intestinal de equinos, bovinos e aves, onde se multiplica e é excretada em grandes quantidades nas fezes, por mais de oito semanas após a infecção inicial,

conhecida também como primo-infecção (EDUARDO, 2002; FREAN et al., 2004).

Por ser esporulado, apresenta elevada resistência ao calor, não sendo eliminado em processos de cozimento. Assim, em alimentos que sofreram tratamento térmico insuficiente para a sua destruição, como os embutidos ou os enlatados, que têm pH superior a 4,5 e baixo potencial de oxidação, os endósporos germinarão. Esse fato é de grande importância para a indústria de alimentos, uma vez que seu controle não é fácil. Após a germinação dos endósporos, as células vegetativas se multiplicam, produzindo a toxina botulínica no alimento, causando o botulismo alimentar nos indivíduos que o consumirem (BHUNIA, 2008; ABRAHAM et al., 2012)

2.1.2 Botulismo

É uma doença grave, causada pela ingestão da toxina botulínica, produzida por *Clostridium botulinum*. Deve ser considerada emergência médica e de saúde pública e caracteriza-se por manifestações neurológicas seletivas, de evolução dramática e elevada mortalidade, entre 30% a 65% (FREAN et al., 2004). Cinco tipos de enfermidades são reconhecidos: o botulismo alimentar, o botulismo infantil, o botulismo de feridas, o botulismo acidental e o botulismo “indeterminado” (BHUNIA, 2008).

Botulismo alimentar é adquirido mais comumente pela ingestão de alimentos contaminados, tais como embutidos, enlatados cárneos, peixes e conservas caseiras, que foram armazenados em condições que permitam a germinação dos esporos presentes nos alimentos e a multiplicação das células vegetativas de *Clostridium botulinum*, presentes nos alimentos, tendo como consequência a produção da toxina botulínica (FREAN et al., 2004).

O tempo para o aparecimento dos sintomas após a ingestão da toxina é, comumente, entre 12 a 36 horas. Após esse período, surge o quadro de disfunção autonômica e sintomas anticolinérgicos, que podem, inclusive, em formas mais graves, conduzir à falência respiratória. O diagnóstico é essencialmente clínico e epidemiológico, confirmado pelo isolamento da toxina em secreções biológicas do doente (soro, fezes ou suco gástrico), ou isolamento do microrganismo nos alimentos ingeridos (CARDOSO et al., 2004).

O botulismo infantil, também conhecido como botulismo de lactentes (associado à síndrome de morte súbita do recém-nascido), ocorre em crianças muito jovens, devido à absorção da toxina produzida *in vivo*, no intestino da criança. A ausência da proteção da microbiota permite a adesão e a germinação de esporos ingeridos, levando à produção de toxina na luz intestinal. A doença está normalmente associada ao consumo de mel contaminado, razão pela qual este alimento não deve ser fornecido para crianças menores de dois anos (ARNON et al., 1981).

Botulismo de feridas é a forma mais rara porque não envolve alimentos (ABRAHAM et al., 2012). Acontece quando a bactéria *C. botulinum* coloniza uma ferida e produz toxinas que atingem outras partes do corpo através da corrente sanguínea (BHUNIA, 2008).

Botulismo acidental é quando ocorre tratamento com toxinas botulínicas em pacientes com distonia e outros movimentos desordenados. A toxina permanece no sistema sanguíneo e pode bloquear a liberação do neurotransmissor no músculo adjacente ou no sistema nervoso autônomo. As neurotoxinas botulínicas (BoNT) podem ser utilizadas em tratamentos estéticos, para a remoção de ruga ou para melhorar a pele, sendo consideradas um possível fator de risco para o botulismo acidental (BHUNIA, 2008).

Botulismo “indeterminado” consiste nos casos apresentados por adultos que não podem ser identificados por uma fonte de alimento ou ferida. Sugere-se

que alguns casos de botulismo atribuídos a esta categoria possam estar relacionados com o uso de antibióticos para tratar de outras doenças, os quais podem alterar o equilíbrio da microbiota natural no intestino, favorecendo a colonização de *C. botulinum* e a produção de toxinas (ABRAHAM et al., 2012).

2.1.3 Toxina botulínica

As neurotoxinas botulínicas (BoNT) são proteínas de alto peso molecular (~150 kDa) sintetizadas na forma inativa (cadeia única) e são ativadas por uma protease, para formar uma molécula de cadeia dupla, ambas ligadas por meio de ponte dissulfeto: uma cadeia leve (50 kDa) subunidade A, responsável pela ação tóxica, e uma cadeia pesada (100 kDa) subunidade B, responsável pela translocação seletiva da cadeia leve ao citosol da célula nervosa (ZANGH et al., 2009).

Nos neurônios, a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular (Figura 1) é realizada pela fusão de dois componentes: o complexo proteico da membrana da vesícula e o complexo proteico da membrana do terminal sináptico. O primeiro *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor*, ou SNARE, tem uma proteína essencial, a sinaptobrevina (VAMP), associada à membrana da vesícula e o segundo t-SNARE é composto pela sintaxina e a *synaptosomal-associated protein of 25 kDa*, ou SNAP-25, cuja função é direcionar a vesícula contendo a acetilcolina à membrana da junção neuromuscular, para que ocorra sua fusão e liberação da acetilcolina (LIN; SCHELLER, 2000).

Em pacientes com botulismo, após a absorção da toxina no estômago e no intestino, esta chega ao sangue e é transportada para as sinapses colinérgicas periféricas, principalmente na junção neuromuscular. A subunidade B da BoNT se liga a um receptor específico no neurônio, que é um ácido siálico que contém

a glicoproteína, ou glicolípido, sendo encontrado apenas nos neurônios. A subunidade B forma um canal no neurônio e permite que a subunidade A de cadeia leve seja internalizada. A subunidade tem uma atividade endopeptidase de zinco que cliva as proteínas SNARE. A subunidade A, na presença do sorotipo A, C e E, cliva SNAP-25; já aquelas sintetizadas pelos sorotipos B, D, F e G clivam sinaptobrevina (VAMP) e o sorotipo C cliva a syntaxina. Como resultado, o complexo SNARE não promove a fusão da vesícula com a membrana pré-sináptica e a exocitose não ocorre. A falta de liberação de acetilcolina impede a transmissão do impulso nervoso (BHUNIA, 2008).

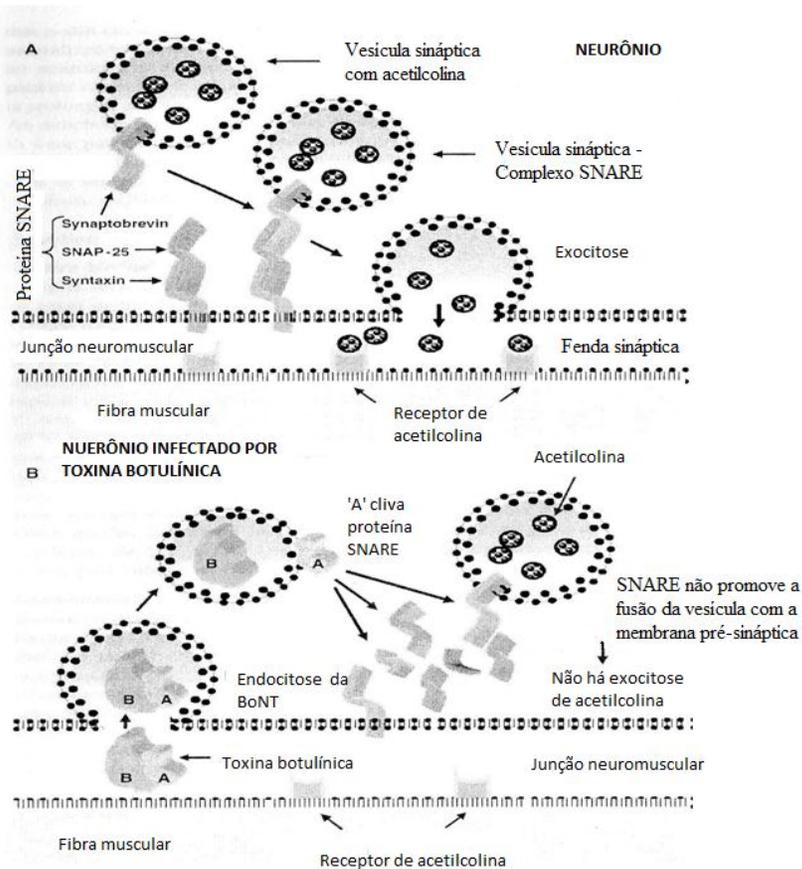


Figura 1 Diagrama esquemático que ilustra o mecanismo de ação da neurotoxina botulínica (BoNT)

Fonte: ARNON et al., 2001; BHUNIA, 2008

O dano causado na membrana pré-sináptica pela toxina é permanente. A recuperação depende da formação de novas terminações neuromusculares e, por este motivo, a recuperação clínica é prolongada, podendo variar de 1 a 12 meses (BRASIL, 2005).

Oito grupos distintos de toxinas botulínicas designadas pelas letras A, B, C1, C2, D, E, F e G são conhecidos atualmente. Embora sejam antigenicamente distintas, as toxinas botulínicas, com exceção de C2, têm origem, estrutura e ação farmacológica comuns (SIMPSOM, 1981). As BoNT do tipo A são amplamente utilizadas como um agente terapêutico para o tratamento de distúrbios do movimento, em cirurgia de estética e, recentemente, ganhou a atenção também como arma biológica (SHUKLA; SHARMA, 2005; SCHOLTES et al., 2008; FRANCO; LANDGRAF, 2005; POLO, 2008). Pacientes tratados com BoNT podem desenvolver anticorpos neutralizantes contra o sítios ativos da toxina, podendo levar à falha da terapia secundária (DRESSLER, 1997).

2.1.4 Botulismo alimentar no Brasil

No Brasil, o primeiro caso de botulismo notificado à Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde ocorreu em 1999 e, até 2004, houve 41 casos suspeitos notificados, tendo sido confirmado um surto de botulismo por ferimento e 18 surtos de botulismo alimentar. Dentre os 19 surtos confirmados, a taxa de letalidade foi de 31,6%. Dos casos de botulismo alimentar, 77,8% foram causados por alimentos de origem suína, 11,1% por palmito em conserva e em 11,1% dos surtos o alimento não foi identificado.

Apesar de representar emergência em saúde pública, até 1999 não havia legislação e vigilância da doença no estado de São Paulo e, somente em outubro de 2001, tornou-se uma doença de notificação compulsória no Brasil (EDUARDO et al., 2002).

De acordo com o Ministério da Saúde, foram registrados apenas 39 surtos em todo o Brasil, no período de 1999 a 2008. O último surto da doença no estado de São Paulo havia sido registrado em 2009 e, assim, quando a doença passou a ter notificação, foram contabilizados 22 casos em todo o estado, incluindo 5 mortes (COORDENAÇÃO DE INFORMAÇÃO ESTRATÉGICA EM VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2012).

Em Santa Catarina, foi confirmado um surto de botulismo na primeira quinzena de março de 2011, envolvendo sete pessoas que consumiram mortadela com toucinho da marca Pena Branca (fabricada em 17 de fevereiro de 2011, com validade até 18 de abril de 2011). Desses casos, seis foram confirmados, tendo um deles vindo a óbito. O evento foi amplamente noticiado à população brasileira (BRASIL, 2011).

Em agosto de 2012, quatro pessoas da mesma família foram hospitalizadas, em estado grave, em Santa Fé do Sul, SP, diagnosticadas com botulismo. Entretanto, a toxina não foi detectada nos alimentos suspeitos, conserva de milho e mortadela (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014).

Segundo Coordenação de Informação Estratégica em Vigilância em Saúde (2012), autoridades sanitárias locais relataram a dificuldade em adquirir o soro antibotulínico na região de São José do Rio Preto, onde os municípios de Nova Canaã Paulista e Santa Fé do Sul estão inseridos. Por ser uma doença rara, o soro não está amplamente disponível.

Outro caso de botulismo foi detectado em dezembro de 2012, no estado de São Paulo, na cidade de Araraquara. Uma mulher foi hospitalizada,

inicialmente sem diagnóstico, sendo encaminhada para a unidade de tratamento intensivo. Após seis dias e vários exames realizados, foi detectado botulismo. Segundo familiares, os primeiros sintomas foram parecidos com o de uma virose, porém, logo apresentou fala mole e paralisia da visão. A paciente faleceu em fevereiro de 2013, após dois meses de internação, por complicações de uma pneumonia (IGNÁCIO, 2014).

2.2 Produtos cárneos

Entre os gêneros alimentícios, os embutidos cárneos, além de aspectos sensoriais apreciáveis, são relativamente de baixo custo, quando comparados com cortes tradicionais de carne fresca (FEINER, 2006).

Apesar de ser bastante popular, antigamente, a mortadela tinha o conceito de produto barato e consumido por pessoas de baixa renda. Contudo, com o passar dos anos, ganhou muita credibilidade e adeptos em todas as classes sociais do Brasil, tornando-se um produto requintado. Conhecida pela cor rosa, sabor delicado de massa fina e aroma suave, utilizada como ingrediente de lanches, a mortadela apresenta procura maior entre os itens alimentícios. Embora não exista nenhum levantamento oficial com índices de produção de vendas nacionais, segundo estimativas de análises do setor de alimentos, a produção apresenta uma média que ultrapassa 100 mil toneladas anuais, no país (HANNA INSTRUMENTS, 2012).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Mortadela (MAPA), este é um produto cárneo industrializado, obtido da emulsão das carnes de uma ou mais espécies de animais de açougue, adicionado ou não de toucinho, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial de diferentes formas, submetido ao tratamento térmico adequado, defumado ou não (BRASIL, 2000).

O limite máximo estabelecido para a quantidade de carne mecanicamente separada (CMS) é de 60%, para mortadelas (sem denominação), 40% para mortadelas de ave e 20% para mortadelas tipo bologna. O valor estabelecido para o teor de cálcio em base seca, para mortadelas, é de 0,9%; para mortadelas tipo bologna é de 0,3% e de 0,6% para mortadelas de ave (BRASIL, 2000). O teor de cálcio nas mortadelas tem estreita relação com a quantidade de carne mecanicamente separada (CMS), adicionada em sua composição. Em relação à temperatura de armazenamento, a Vigilância Sanitária prevê uma faixa de 3 °C a 8 °C (BRASIL, 1999).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o teor de umidade máximo é de 65% (BRASIL, 2000). O pH de mortadelas deve estar na faixa da neutralidade, 7,0 (BRASIL, 1989). A mortadela tem características intrínsecas, como alta atividade de água e elevada quantidade de nutrientes, que constituem um meio propício para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos (DUARTE, 2011). Por serem alimentos embalados a vácuo, apresentam condições necessárias para o desenvolvimento de endósporos bacterianos, como *C. botulinum* (RIBEIRO; SARAVALLI, 2004).

Produtos de carne curada contêm nitrito, que é um ingrediente chave no processo de cura (CAMMACK et al., 1999; MARCO; NAVARRO; FLORES, 2006).

2.2.1 Nitrito de sódio

Aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado aos alimentos intencionalmente, sem o propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais do alimento. Nitrito de sódio é um aditivo alimentar considerado conservante e agente de cura. O

processo de cura consiste no tratamento das carnes com sal, nitrito, açúcar, temperos e outros ingredientes. Pode ser adicionado diretamente ou ser obtido por meio da redução do nitrato, promovida pela ação de bactérias redutoras. A adição de nitrato é, atualmente, empregada somente em processos de cura longa (JUDGE et al., 1989).

Nitrito de sódio é utilizado em produtos de carne curada, prevenindo a germinação dos esporos e inibindo o crescimento de células vegetativas e a consequente formação de neurotoxina por *Clostridium botulinum*. Além disso, atrasa o desenvolvimento do ranço oxidativo, desenvolve o sabor característico de carnes curadas e reage com mioglobina, estabilizando a cor da carne vermelha (POURAZRANG; MOAZZAMI; FAZLY, 2002).

Embora tenha sido mostrado em estudo que cerca de 40 mg/kg de nitrito sejam suficientes para conferir cor, aroma e sabor de produtos curados (MULLER, 1991), valores inferiores a 150 mg/kg têm sido relatados como insuficientes para prevenir o crescimento e produção de toxina do *C. botulinum*. Por esse motivo, as autoridades sanitárias de diversos países, entre eles o Brasil, permitem valores residuais máximos de 150 mg de nitrito/kg em produtos curados (BRASIL, 1998).

A cor de um produto curado está associada à conformação química e à concentração dos pigmentos heme, mais especificamente da mioglobina, composta por uma cadeia polipeptídica denominada globina, acoplada a um grupo prostético, denominado heme, composto por um átomo de ferro e um anel porfirínico nítrico proveniente da redução do nitrito (CLYDESDALE; FRANCIS, 1976). A cor é uma das características de qualidade mais importantes para o consumidor, ao adquirir um produto cárneo (AKSU; KAYA, 2005).

O nitrito, contudo, é convertido em ácido nitroso, o qual é um dos principais precursores do principal agente nitrosante em alimentos, o anidrido nitroso, o qual reage com aminas e aminoácidos da carne para produzir

nitrosaminas (SHAHIDI; PEGG; SEN, 1994), compostos potencialmente carcinogênicos, teratogênicos, mutagênicos e compostos N-nitrosos (POURAZRANG; MOAZZAMI; FAZLY, 2002).

A concentração de compostos N-nitrosos, em alimentos, é dependente de fatores como método de cozimento, temperatura e tempo de fritura e de defumação, concentração de nitrito residual ou adicionado, concentração de precursores das nitrosaminas, condições e métodos de pré-processamento, conteúdo de umidade, presença de catalisadores e inibidores da nitrosação (MILLER et al., 1989).

O inibidor mais efetivo da nitrosação é o ácido ascórbico, o qual reage rapidamente com nitrito, formando ácido deidro ascórbico e óxido nítrico, o qual não é um agente nitrosante (JANSSEN, 1997). A formação de N-nitrosaminas em alimentos pode ser também controlada por meio do controle da adição de nitrito, visto que a velocidade de formação das N-nitrosaminas é diretamente proporcional ao quadrado da concentração desse íon (SHUKER, 1988).

Devido à formação dos compostos carcinogênicos a partir de sais de nitrato e nitrito, buscam-se substâncias alternativas que tenham tanto atividade antimicrobiana como antioxidante e, atualmente, vários estudos (OLIVEIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011; ANDRADE et al., 2012) mostram que os óleos essenciais são alternativas promissoras.

2.3 Óleos essenciais

Óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos, caracterizados pelo forte odor, sintetizados nas mais diversas partes das plantas, como flores, brotos, sementes, folhas, casca do galho, frutas e raízes (BURT, 2004). São armazenados em células excretoras, células epidérmicas e tricomas glandulares, sendo formados pelo metabolismo secundário (BAKKALI et al., 2008). Óleos

essenciais podem ser líquidos à temperatura ambiente, embora alguns sejam sólidos ou resinosos. Apresentam diferentes cores, que variam do amarelo ao verde-esmeralda, pálido, azul para vermelho-acastanhado-escuro (BALZ, 1999).

Os óleos essenciais são constituídos por uma complexa mistura de compostos, incluindo terpenos, álcoois, cetonas, fenóis, ácidos, aldeídos e ésteres (AYALA et al., 2007). Por serem sintetizados por plantas aromáticas e condimentares, vários óleos essenciais podem ser utilizados em qualquer alimento, sendo, geralmente, reconhecidos como seguros (U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2006). Têm sido amplamente utilizados nos produtos alimentícios, apresentando atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante, bem como aromatizante alimentar (VIUDA-MARTOS et al., 2009).

O termo "óleo essencial" foi utilizado pela primeira vez no século XVI, por Paracelso Von Hohenheim, como referência ao componente eficaz de uma droga (GUENTHER, 1950).

A primeira referência sobre as utilizações de óleos essenciais por razões terapêuticas foi encontrada no Papiro Ebers. Mais de 800 remédios de óleos essenciais foram listados neste documento e tratamentos mostraram que a mirra era o ingrediente favorito, muitas vezes misturada com mel e outras ervas, devido à sua capacidade em inibir o crescimento bacteriano. O primeiro experimento mostrando a atividade bactericida dos óleos essenciais foi realizado em 1881, por Croix La (BOYLE, 1955). No entanto, desde aqueles tempos, sua utilização na medicina diminuiu gradualmente, entretanto, sua utilização como flavorizante e aromatizante aumentou (GUENTHER, 1948).

O crescente desenvolvimento comercial e industrial na área dos óleos essenciais acompanha alterações globais e flutuações da sua origem, ocorrendo, atualmente, a maior produção em países como o Brasil (29%), a Índia (26%), os Estados Unidos (17%) e a China (9%). Os principais mercados de óleos

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

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

A maior parte da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais se dá devido aos terpenoides oxigenados (por exemplo, alcoóis e terpenos fenólicos), contudo, alguns hidrocarbonetos também apresentam efeitos antimicrobianos (BURT, 2004; DELAQUIS et al., 2002).

Interações entre esses componentes podem provocar efeitos antagônicos, aditivos ou sinérgicos. Alguns estudos têm demonstrado que todos os óleos essenciais, geralmente, têm atividade antibacteriana maior do que as misturas de seus principais componentes, sugerindo que os componentes minoritários são fundamentais para a atividade sinérgica, embora também sejam observados efeitos antagônicos e aditivos (DAVIDSON; PARISH, 1989; MOUREY; CANILLAC, 2002).

Alguns produtos à base de óleos essenciais já estão disponíveis no mercado, como o Proallium® e o Garlicon® (DOMCA, 2014). O Proallium® é composto por organossulfurados que estão presentes no alho e na cebola, que pertencem à família Alliaceae. Apresenta propriedades antimicrobianas e é utilizado como aromatizante em molhos, recheios de massas, carnes e alimentos prontos para o consumo. Sua utilização permite redução ou eliminação de conservantes tradicionais, como sorbatos e benzoatos (DOMCA, 2014). Garlicon® é outro produto inovador que foi desenvolvido também à base de moléculas obtidas das plantas da família Alliaceae, como alho e cebola, sendo utilizado na alimentação de animais, especialmente as aves, evitando, assim, a transmissão dos microrganismos aos alimentos derivados destes animais. É considerado efetivo para os problemas de salmonelose e outros patógenos encontrados nas áreas rurais; quando adicionado ao alimento, melhora o sistema digestório, mantendo o equilíbrio da microbiota intestinal. Sua principal função é aumentar a capacidade defensiva do animal contra *Salmonella*, doenças respiratórias e digestivas causadas por *E. coli*, *Campylobacter*, *Clostridium* e *Listeria monocytogenes* (DOMCA, 2014).

2.3.1 Mecanismos de ação dos óleos essenciais

O efeito antimicrobiano está relacionado, principalmente, à alteração da permeabilidade e da integridade da membrana celular bacteriana (LAMBERT et al., 2001).

Os mecanismos de ação dos óleos essenciais são vários (Figura 2). Uma característica importante dos óleos essenciais e seus componentes é a sua hidrofobicidade, a qual lhes permite partição dos lipídeos da membrana celular bacteriana e mitocôndrias, perturbando as estruturas e deixando-as mais permeáveis (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994), podendo ocorrer o

extravasamento de íons e outros conteúdos intracelulares (LAMBERT et al., 2001).

Estudos mostram que os compostos fenólicos agem na membrana citoplasmática, interrompendo a força próton motriz (FPM), o fluxo de elétrons e o transporte ativo, promovendo a coagulação do conteúdo intracelular (DAVIDSON, 1997).

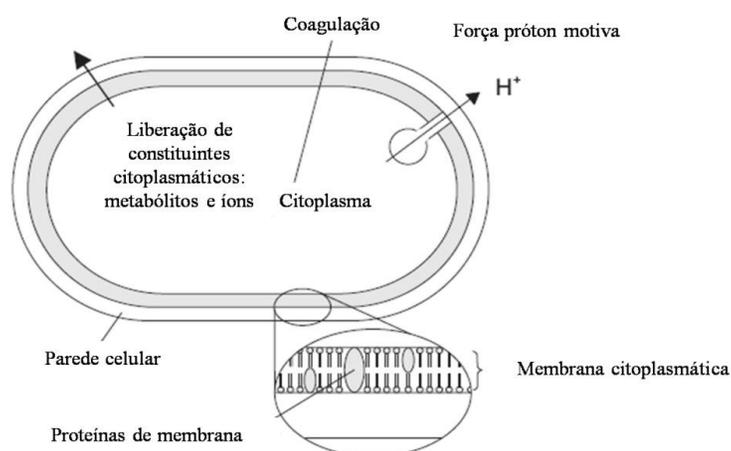


Figura 2 Ação dos óleos essenciais na célula bacteriana
Adaptado de Burt (2004)

Sabe-se que, na maioria das vezes, bactérias gram-negativas são menos sensíveis aos óleos essenciais que bactérias gram-positivas, pois sua membrana externa é rica em polissacarídeos, o que inibe a penetração das substâncias antimicrobianas (BURT, 2004).

2.3.2 Orégano e tomilho

Orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) são ervas da família Labiatae e têm sido muito utilizados como agentes aromatizantes, em vários produtos alimentares (BURT, 2004).

Orégano é uma das especiarias mais utilizadas na cozinha mediterrânea, sendo obtido por secagem das folhas e flores de *Origanum vulgare*. É bem conhecido pelo seu efeito antioxidante e pela atividade antibacteriana, principalmente sobre bactérias gram-positivas (BOTSOGLOU et al., 2003).

Tanto os óleos essenciais de orégano como o de tomilho têm consideráveis propriedades antibacterianas, devido, principalmente, aos seus compostos majoritários, carvacrol e timol, respectivamente. A utilização é considerada segura (LAMBERT et al., 2001), muitas vezes limitada pelo forte odor e sabor conferidos aos alimentos (SKANDAMIS; NYCHAS, 2001).

Ismail (1988) testou os efeitos dos óleos essenciais de cravo, tomilho, pimenta-preta, pimenta, orégano, cebola e canela na germinação, no crescimento pós-germinativo, no crescimento e na produção de toxina de *Clostridium botulinum* (seis linhagens dos tipos A, B e E) em meio microbiológico. Aparentemente, os óleos não apresentaram efeito significativo no crescimento pós-germinativo de esporos germinados, nem na produção de toxina. Os óleos de pimenta-preta, cravo, canela e orégano foram os mais fortes inibidores do crescimento vegetativo. O estudo revelou também o efeito da combinação do óleo de orégano e nitrato de sódio (NaNO_2) no crescimento e na produção de toxina pelo *Clostridium botulinum* em sistemas modelo de carne. Em carne de porco empacotada a vácuo, 400 ppm de óleo de orégano combinado com 50-100 ppm de nitrato de sódio (NaNO_2) inibiram significativamente o crescimento e a produção de toxina.

2.3.3 Canela

Cinnamomum é um gênero botânico pertencente à família Lauraceae e muitas espécies são utilizadas como temperos. Plantas de *Cinnamomum* também

contêm taninos condensados, ou seja, dimérico, trimérico, poliméricos e oligoméricos superiores (MORIMOTO; NONAKA; NISHIOKA, 1986; GU et al., 2004).

Duas espécies principais são *Cinnamomum zeylanicum* Nees (canela) e *Cinnamomum cassia blume* (cássia), que são originadas das especiarias mais antigas conhecidas pelo homem (VERNIN, 1994; BISSET, 2001). *Cinnamomum zeylanicum* é também conhecido como *Cinnamomum verum* e *Cinnamomum cassia*, conhecido também como *Cinnamomum aromaticum*. Sua casca, folhas e brotos são usados como temperos ou condimentos. Canela e cássia são ricas em óleos essenciais, principalmente cinamaldeído e eugenol, que têm atividade antimicrobiana (LEE; LEE; AHN, 1999; OOIL, 2006).

Ooil et al. (2006) verificaram que o óleo essencial de *C. cassia*, bem como o cinamaldeído, foram igualmente efetivos na inibição do crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *S. tyhymurium*.

Oliveira et al. (2012) testaram os óleos essenciais de canela-cássia e cinamaldeído, que foram mais efetivos contra *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) do que *L. monocytogenes*.

2.3.4 Alecrim e Sálvia

Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e sálvia (*Salvia officinalis*) pertencem à família Lamiaceae. São duas especiarias amplamente utilizadas como aromatizantes em produtos alimentícios, na medicina popular, na fabricação de cosméticos e de fitofármacos (BRUNETON, 1999). Muitos estudos têm sido focados nas diversas atividades biológicas dos metabólitos secundários dessas duas especiarias (BUCHBAUER; JIROVETZ, 1994; LEE; LEE; AHN, 1999),

verificando-se que elas têm a melhor atividade antioxidante dentre a vasta gama de ervas e especiarias testadas (YANISHLIEVA et al., 2006).

Os óleos essenciais de alecrim são constituídos de 16%-20% de borneol, 27%-30% de cineol, 10% de cânfora, 2%-7% de acetato de bornil e baixas porcentagens de α -pineno, canfeno, terpineol e verbenone. O borneol é responsável pela pungência, o odor canforado e o gosto amargo; o cineoleno, pelo frescor, semelhante ao do eucalipto; o α -pineno é responsável pela queimadura, semelhante à do pinho; a cânfora contribui com frescor penetrante, semelhante ao da menta e o acetato de bornil, pelo frescor doce, suave, semelhante ao do pinho (FARREL, 1995).

Lima, Cardoso e Morais (2012) realizaram análises do óleo essencial de sálvia e encontraram doze compostos, sendo os majoritários o 1,8 cineol (15,42%), cis-tujona, (26,69%) e a cânfora (30,46%).

Além disso, o alecrim é a única especiaria comercialmente disponível para uso como antioxidante na Europa e nos Estados Unidos, sendo comercializado na forma solúvel, em óleo, em pó e também em formulações com água. No entanto, dados relativos a esta atividade de óleos essenciais de alecrim e sálvia não são abundantes e os métodos para a determinação são diferentes (LEE; LEE; AHN, 1999; BARATTA et al., 1998). Ao contrário, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de alecrim e sálvia é bem documentada (DAFERERA et al., 2000, BARATTA; DORMAN; DEANS, 1998; YESIL, 2007).

Estas investigações, muitas vezes, não são executadas com precisão definida da composição química do óleo essencial em questão. Além disso, novos exames de atividade antimicrobiana em espectro mais amplo de microrganismos, incluindo algumas novas cepas multirresistentes de bactérias e fungos, poderiam ajudar a indústria farmacêutica na síntese ou na semissíntese de novos antibióticos (COWAN, 1999).

2.3.5 Pimenta chinesa

Litsea cubeba é uma planta com óleo aromático, pertencente a arbustos e folhas de Neolitsea ou pequenas árvores Lauraceae. Há 200 variedades de plantas de Neolitsea no mundo que são, principalmente, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia. Especificamente na China, as plantas de Neolitsea distribuem-se, principalmente, na bacia do rio Yangtze, sendo encontrada também em outras províncias (GUANGDONG, 2004).

Litsea cubeba é conhecida também por may-chang, ou pimenta-chinesa e seu óleo essencial tem alta concentração de citral, similar ao da verbena e ao do lemongrass. Por isso compete em popularidade com o lemongrass. Todas as flores, folhas e cascas de *L.cubeba* contêm óleo aromático e o óleo essencial extraído é amplamente utilizado em cosméticos, sabonetes, outros produtos químicos e na produção de alimentos, mostrando grande aplicação e perspectivas no valor de mercado (JIM; SHA, 2004).

Jim e Sha (2004) afirmam que o extrato de *L. cubeba* pode ser fonte de antioxidantes naturais de fácil acesso. O isolamento de compostos bioativos nos extratos ajudaria a determinar a potência individual dos compostos.

2.3.6 Cardamomo

Cardamomo (*Elettaria cardamomum*), pertencente à família Zingiberaceae, é cultivado comercialmente na Índia, no Sri Lanka, na Guatemala e na Tanzânia. As folhas são lanceoladas, verdes, glabras em ambas as superfícies, com ápice acuminado. Os frutos são trioculares, ovoides, oblongos ou marrom-esverdeados; as cápsulas contêm de 15-20 sementes marrom-avermelhadas. As sementes de cardamomo apresentam-se ligeiramente

pungentes e de sabor altamente aromático, sendo utilizadas como tempero em produtos cárneos, como mortadela (BAYTOP, 1984).

A composição química do óleo essencial de cardamomo varia consideravelmente com a variedade, a região e a idade da planta. O conteúdo de óleo volátil nas sementes é fortemente dependente de condições de armazenamento, mas pode chegar a 8% (KORIKONTIMATH; MULGE; ZACHARIAH, 1999). O aroma de cardamomo é produzido por uma combinação dos principais componentes, 1,8-cineol e α -acetato de terpineol (LAWRENCE, 2009). O óleo é utilizado em alimentos, na indústria farmacêutica e de perfumaria, e como aromatizante. Na medicina, é empregado como aromatizante, antisséptico, estimulante, carminativo, expectorante, antiespasmódico e diurético (BAYTOP, 1984; KORIKONTIMATH; MULGE; ZACHARIAH, 1999). Em algumas partes do mundo, especialmente no Oriente próximo à Arábia Saudita, o cardamomo é usado, principalmente, na preparação de "gahwa", em uma mistura com café forte. Foram relatados também componentes voláteis de sabor em óleos essenciais de sementes de cardamomo (BAYTOP, 1984).

A semente de cardamomo é amplamente utilizada como especiaria nos alimentos em todo o mundo, desde os tempos antigos, sendo conhecida também como afrodisíaco, na Índia e empregada para fazer bochechos e sabão. Além disso, mastigar a semente de cardamomo, como o tabaco, é hábito comum entre muitas pessoas em vários países árabes, como a Arábia Saudita. Assim, afirmou-se que sementes de cardamomo não têm toxicidade oral humana, o que levou a estudos sobre os seus agentes antimicrobianos, especialmente considerando o controle de microrganismos que causam problemas de cabelo, de pele e de dentes, como cárie dentária, além de acne e caspa. Em seleção preliminar com extratos aquosos de sementes de cardamomo e extrato de n-hexano, verificou-se um pouco mais de atividade antimicrobiana, inclusive contra *Streptococcus*

mutans, *Propionibacterium acnes*, *Pityrosporum ouale* e *Trichophyton mentagrophytes* (ABO-KHATWA; KUBO, 1987).

2.3.7 Manjeriço ou basilicão

Manjeriço (*Ocimumbasilicum* L.) tem metil e chavicol como os principais compostos majoritários. É popularmente utilizado na culinária mundial e tem sido empregado, há muitos anos, como ingrediente para conferir sabor nos alimentos também como produto de higiene bucal e fragrâncias (GUENTHER, 1952).

Manjeriço e seus óleos essenciais são utilizados, frequentemente, como flavorizantes em produtos à base de tomates, cuja alta acidez os torna propensos à deterioração por microrganismos ácido-tolerantes (DZIEZAK, 1989; FIERHELLEN, 1991).

Lachowicz et al. (1998) determinaram o tempo necessário para *Lactobacillus curvatus* e *Saccharomyces cerevisiae* iniciarem seu crescimento em presença de diferentes combinações de linalol e metil chavicol, os principais componentes do óleo essencial de manjeriço. As combinações com altas concentrações de metil, chavicol aumentaram o tempo necessário para o início do crescimento, porém, não houve sinergismo entre os compostos.

2.3.8 Cravo-da-índia (botão)

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) pertence à família das mirtáceas (*Myrtaceae*), possuindo sinonímia científica de *Eugenia caryophyllus*, *Aryophyllus aromaticus* e *Eugenia aromática*. Tem 90% de eugenol. Embora ainda subestimado pelas suas propriedades terapêuticas, hoje, tem sido utilizado,

popularmente, no tratamento de muitas doenças (LASZLO AROMATERAPIA, 2010).

Segundo Chaieb et al. (2007), o óleo essencial de *S. aromaticum* tem potente ação antioxidante, devido à eliminação de radicais, à ação quelante com íons de metais (Fe+3) e à participação em reações fotoquímicas, com aplicabilidade estratégica na indústria, por exemplo.

Dentre outros óleos essenciais com propriedades antimicrobianas, destaca-se o óleo de cravo, que é conhecido por seu poder anestésico, analgésico local e anti-inflamatório (HEMAISWARYA; DOBLE, 2009).

2.3.9 Gengibre

O gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*), da família Zingiberaceae, é uma planta herbácea perene, cujo rizoma é amplamente utilizado na culinária, na indústria e na medicina (DAHLGREN et al., 1985).

O uso do gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) é bem conhecido na culinária como tempero e, há muito tempo, os chineses já o utilizavam na medicina. O rizoma apresenta de 1%-3% de óleos essenciais (os sesquiterpenos), de 2,5% a 5% de princípios picantes (o gingerol e shogaol) e 60% de amido. Os gingeróis são identificados como os maiores constituintes dos rizomas de gengibre frescos e têm sido atribuídos a eles vários efeitos farmacológicos, como analgésico, antipirético, atividade anti-hepatotóxica, antinauseante e anti-inflamatória (SURH et al., 2002; SABULAL et al., 2006).

A atividade antimicrobiana do gengibre vem sendo amplamente pesquisada. Estudos demonstram que óleos e extratos do *Zingiber officinale* apresentam ação inibitória em bactérias gram-positivas e gram-negativas (ALZOREKY; NAKAHARA, 2003).

2.3.10 Limão-siciliano

O limão-siciliano (*Citrus limon*) tem como composto majoritário o limoneno e é utilizado industrialmente como flavorizante em alimentos, devido ao óleo essencial presente em sua casca. A industrialização de citros produz grandes quantidades de resíduos, como cascas e sementes, em parte utilizadas em rações animais ou fertilizantes (KOBORI; JORGE, 2003).

O Brasil é o maior produtor mundial de óleos essenciais de citros. Grande parte do resíduo sólido das sementes de citros é uma fonte inexplorada de óleo que pode alcançar 55% de rendimento. Estes óleos podem ser aproveitados pela indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (KOBORI; JORGE, 2003; OJEDA, 1998).

2.3.11 Noz-moscada

Noz-moscada é a semente de *Myristica fragrans* (Myristicaceae), árvore perene, de médio porte, nativa das ilhas da Indonésia. No Brasil, é cultivada, principalmente, no sul da Bahia. Em termos de composição química, a noz-moscada é constituída por cerca de 30%-55% de óleos e 45%-60% de matéria sólida, incluindo celulose. Estes óleos são de dois tipos: óleo essencial, 5%-15% e óleo fixo, 24%-40%. O óleo essencial de noz-moscada tem sido amplamente estudado ao longo das últimas décadas (SOMANI et al., 2008), e confere o seu aroma típico. A miristina é responsável pelo odor característico e, assim, ela é empregada na indústria em substituição à própria noz-moscada, evitando-se, assim, a presença de partículas nos alimentos e nas bebidas, destacando-se o uso na produção de bebidas não alcoólicas, doces, salgados, xaropes e também creme dental (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2004; YUN et al., 2003).

O uso do óleo essencial de noz-moscada na produção de alimentos em nível industrial e doméstico tem o objetivo de melhorar as características sensoriais, pois, além do aroma, fornece sabor ligeiramente picante aos alimentos. Tem caráter conservador com propriedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, anticancerígeno e inseticidas (NGUEFACK et al., 2004), sendo também utilizado em medicamentos e em cosméticos (YUAN et al., 2006).

Além da miristicina (metil iso-eugenol), a elemicina (metoxy eugenol), também está presente. A esses dois compostos se atribuem as principais ações farmacológicas e os efeitos psicoativos conhecidos do óleo essencial de noz-moscada (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2004).

Stecchini et al. (1993) testaram os efeitos inibitórios de óleos essenciais de coentro, cravo, noz-moscada e pimenta sobre *Aeromonas hydrophila*, linhagens ISM 84331 (isolada clinicamente) e DIP 28 (isolada de peixe fresco). Os óleos essenciais de cravo, coentro e noz-moscada, em concentrações, respectivamente, de 500, 1.250 e 10.000 µL/mL, foram efetivos na inibição do crescimento de *Aeromonas hydrophila*.

2.4 Óleos essenciais como antioxidantes

Na medicina tradicional, as plantas medicinais são raramente utilizadas como antioxidantes. Suas características terapêuticas poderiam ser apresentadas, em parte, devido à sua capacidade de remoção dos radicais livres que podem estar envolvidos em muitas doenças (SPENCER et al., 1988), como câncer, enfisema, cirrose, arteriosclerose e artrites, as quais têm sido correlacionadas com o estresse oxidativo. Os organismos, em geral, são protegidos contra os danos causados pelos radicais livres, por enzimas, como superóxido dismutase e

catalase, ou compostos, como ácido ascórbico, tocoferol e glutatona. Quando os mecanismos da proteção antioxidante se tornam ineficientes por fator como idade, a deterioração das funções fisiológicas pode ocorrer, resultando em doenças e aceleração do envelhecimento. Entretanto, suplementos alimentares antioxidantes podem ser utilizados para ajudar o corpo humano a reduzir os danos oxidativos (YANG et al., 2000).

Os óleos, as gorduras e os alimentos que os contêm estão sujeitos, durante o processamento e a estocagem, a reações químicas que podem alterar, de modo indesejável, as características do produto final. Hidrólises e oxidações podem ser responsáveis por esse processo, sobretudo a oxidação dos lipídeos. Antioxidantes são, geralmente, utilizados em óleos e comidas gordurosas para retardar sua auto-oxidação (WEND; WAND, 2004). Alguns antioxidantes sintéticos, como butil-hidroxianisol (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT), bastante utilizados em alimentos, revelaram-se tóxicos em altas doses (JAYAPRAKASHA; SINGH; SAKARIAH, 2001). Dessa forma, a pesquisa por antioxidantes naturais tem aumentado bastante nos últimos anos (LOLIGER, 1991; BRACCO; LOLIGER; VIRET, 1981).

Muitos compostos isolados de óleos essenciais foram recentemente qualificados como antioxidantes naturais efetivos, sendo sugeridos como substitutos de antioxidantes sintéticos (RUBERTO; BARATTA, 2000; BOZIN et al., 2006).

Assim, muitas plantas aromáticas são, hoje, consideradas fontes importantes de compostos com elevada atividade antioxidante (BRUNETON, 1999). O uso de antioxidantes a partir de fontes naturais tem se tornado mais popular como um meio de aumentar a vida útil dos produtos alimentares, melhorando a estabilidade das gorduras e de óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), retardando o processo de envelhecimento (HARMAN,

1982) e no tratamento de doenças humanas, tais como aterosclerose e câncer (WATTENBERG, 1978).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local e condução do experimento

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos. A produção das mortadelas e as análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Carnes (Lab Carnes) e Derivados, no Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), da Universidade Federal de Lavras.

O experimento foi conduzido em três etapas. Inicialmente, foi analisado o efeito antibacteriano *in vitro* de onze óleos essenciais sobre *Clostridium botulinum* tipo D. Em seguida, foram analisadas as combinações entre os óleos essenciais que apresentaram menor concentração mínima bactericida sobre as células vegetativas estudadas. Logo depois, foram adicionadas diferentes concentrações de combinações de óleos essenciais e diferentes concentrações de nitrito em mortadela inoculada com *C. botulinum*, em que foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas, durante o período de estocagem de vinte dias.

3.2 Óleos essenciais e MIC

Foram utilizados os óleos essenciais de *Myristica fragans* (noz-moscada), *Zingiber officinale* (gengibre), *Citrus limon* (limão-siciliano), *Origanum vulgare* (orégano), *Syzygium aromaticum* (cravo-botão), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Syzygium officinalis* (sálvia), *Ocimum basilicum* (manjeriço/basilicão), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Thymus vulgaris* (tomilho-branco).

Os óleos foram adquiridos na empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda.

3.3 Microrganismo, manutenção e padronização do inóculo

A cepa utilizada no experimento foi o *Clostridium botulinum* do tipo D, gentilmente cedida pelo Laboratório Nacional Agropecuário Lanagro (Pedro Leopoldo MG). As culturas estoque foram armazenadas em meio de congelamento (glicerol: 15 mL, peptona bacteriológica: 0,5 g, extrato de levedura: 0,3 g, NaCl: 0,5 g, água destilada: 100 mL), tendo sido congeladas durante o período de execução do experimento.

Para reativação do inóculo, 1 mL da cultura congelada foi adicionado a tubos de rosca contendo 10 mL de caldo *Clostridium* e 5 µL de solução filtrada de sulfato de sódio (4%) e citrato férrico (7%), estéril, foram incubados em condições de anaerobiose a 37 °C/48 horas.

Após esse período, 200 µL de inóculo foram transferidos para Erlenmeyer contendo 200 mL de caldo *Clostridium* com solução férrica, sendo incubado a 37 °C. A padronização do inóculo foi realizada por meio da elaboração de curva de crescimento e o desenvolvimento do micro-organismo foi monitorado por espectrofotometria, a 620 nm e contagem direta em placas em meio ágar base de isolamento de *C.botulinum* (caseína: 16 g, extrato de levedura: 2 g, dextrose: 0,8 g, púrpura de bromocresol: 0,008 g, fosfato de sódio dibásico: 2 g, cloreto de sódio: 0,8 g, sulfato de magnésio: 0,004 g, ágar: 8 g e 400 mL de água destilada). As placas foram incubadas, a 37 °C, por 48 horas, em condições anaeróbicas. O inóculo foi padronizado em 10^7 UFC/mL de célula vegetativa.

3.4 Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais sobre *Clostridium botulinum*

Foi utilizada a técnica de diluição em caldo (NCCLS, 2003), com séries de 15 tubos de ensaio, adicionados de 5 mL de caldo *Clostridium* contendo 0,5% de Tween 80. Os tubos foram autoclavados, a 121 °C, por 15 minutos. Depois, foi adicionada solução férrica estéril no caldo *Clostridium*. Os óleos essenciais foram diluídos diretamente neste caldo, nas concentrações de 0,25%, 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2%, 3%, 4 %,5%, 6%, 7%, 8 %, 9% e 10%. Cada tubo foi adicionado de 50 µL do inóculo padronizado. O tubo de número 14 foi considerado o controle negativo (caldo *Clostridium* + cloranfenicol 1.000 mg/L + inóculo) e o tubo de número 15, o controle positivo (caldo *Clostridium* + inóculo). O conteúdo foi homogeneizado e os tubos incubados, a 37 °C, por 48 horas. Após o período de incubação, foi realizado o plaqueamento em meio ágar base de isolamento de *C.botulinum*, empregando-se a técnica de plaqueamento em superfície. As placas foram incubadas, a 37 °C, por 48 horas, em atmosfera anaeróbica gerada com auxílio de jarras de anaerobiose e geradores de atmosfera anaeróbica Probac do Brasil®. A concentração mínima bactericida dos óleos essenciais foi considerada como a concentração do tubo de menor diluição em que se verificou a ausência de crescimento nas placas. O experimento foi realizado em triplicata com três repetições.

3.5 Estudo do sinergismo entre os óleos essenciais

Após a determinação da concentração mínima bactericida, foram selecionados os óleos essenciais que apresentaram a menor concentração mínima bactericida, sendo eles orégano, canela, tomilho e cravo-botão, para a realização de quatro combinações com três óleos em cada. Na Tabela 1

mostram-se as diferentes proporções de óleos essenciais utilizadas em cada combinação.

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

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

100 refere-se à CMB de cada óleo a ser estudado e os demais números representam as proporções dos óleos que foram utilizados baseando-se na CMB

O efeito bactericida da combinação entre os óleos essenciais foi estabelecido utilizando-se a metodologia em tubos, com série de 11 tubos de ensaio, adicionados de 5 mL de caldo *Clostridium* contendo 0,5 % de Tween 80. Os tubos foram autoclavados, a 121 °C, por 15 minutos. Depois, foi adicionada solução férrica estéril no caldo *Clostridium*. Os óleos essenciais foram diluídos diretamente neste caldo, nas concentrações demonstradas no planejamento experimental (Tabela 1) calculadas de acordo com o valor da CMB de cada óleo essencial. O tubo de número 11 foi considerado o controle positivo (caldo *Clostridium* + inóculo). Cada tubo foi adicionado de 50 µL do

inóculo padronizado. O conteúdo foi homogeneizado e os tubos incubados, a 37 °C, por 48 horas. Após o período de incubação, foram realizadas diluições seriadas em tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (m/v) e 100 µL das diluições foram transferidas para as placas contendo meio ágar base de isolamento de *C. botulinum*, empregando-se a técnica de plaqueamento em superfície. As placas foram incubadas, a 37 °C, por 48 horas, em atmosfera anaeróbica gerada com auxílio de jarras de anaerobiose e geradores de atmosfera anaeróbica Probac do Brasil®. As análises foram realizadas em triplicata e em três repetições.

3.6 Elaboração da mortadela

A formulação da mortadela foi preparada com as mesmas concentrações de ingredientes (Tabela 2) para todos os tratamentos, variando apenas as concentrações de nitrito de sódio e óleos essenciais. Para o nitrito de sódio, dois níveis foram testados: 150 ppm, quantidade residual limite permitida pela legislação brasileira e 75 ppm, quantidade relatada por Dutra et al. (2011), em que não há alterações na cor e nas características tecnológicas das mortadelas, quando comparadas às do controle (150 ppm de adição). A quantidade de cada mistura de óleos essenciais foi baseada nos ensaios microbiológicos *in vitro*. Foram conduzidas três repetições por tempo em triplicata.

Tabela 2 Formulação padrão para a elaboração da mortadela

Ingredientes	Quantidade (%)
Carne bovina	58,5
Toucinho	14
Fécula de mandioca	5
Água/gelo	20
Sal	1,9
Ácido ascórbico	0,05
Polifosfato	0,5
Nitrito de sódio	(150 ou 75ppm + óleo)

A carne bovina previamente moída foi adicionada ao *cutter*, para emulsificação, sendo os ingredientes adicionados na seguinte ordem: sal, fosfato, nitrito, ácido ascórbico, água/gelo, fécula de mandioca, óleos essenciais e, por fim, o toucinho. A massa foi embutida em tripa de poliamida marca Calibre 67 mm, empresa Shur, formando gomos de, aproximadamente, 500 g e submetida à cocção, realizada por imersão em banho-maria, conforme a seguinte programação: 30 minutos, a 55 °C; 30 minutos, a 65 °C; 30 minutos, a 75 °C e 30 minutos, a 80 °C, quando a temperatura interna alcançou 72-73 °C. Todo o processo de cozimento foi monitorado com o uso de termômetro. Após o cozimento, as mortadelas foram mantidas em banho de gelo, por 20 minutos, sendo armazenadas, a 4 °C, para análises físicas, químicas e microbiológicas.

As amostras destinadas às análises microbiológicas foram separadas em porções de 25 g, sendo trituradas e inoculadas com 10^5 UFC/g de *C. botulinum* do tipo D, homogeneizadas em Stomacher Metroterm®, seladas a vácuo, incubadas em estufa tipo BOD, a 25 °C. As amostras destinadas às análises físico-químicas foram separadas em porções de 150 g, seladas a vácuo, mas sem

adição do inóculo, e armazenadas sob refrigeração, a 4 °C. As análises foram realizadas nos tempos de 0,10 e 20 dias.

3.7 Quantificação de *Clostridium botulinum* em mortadela

As análises microbiológicas da mortadela foram divididas em duas etapas: contagem total e endósporos de *Clostridium botulinum* do tipo D. As análises do tempo 0 foram realizadas após 12 horas de inoculação, devido à montagem do experimento.

3.7.1 Contagem total de *C. botulinum*

As amostras foram abertas de forma asséptica, homogeneizadas em 225 mL de água peptonada a 0,1% (m/v), em homogeneizador do tipo *Stomacher* (490 golpes/ 3 min). Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas em tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (m/v) e 100 µL das diluições adequadas foram transferidos para as placas contendo o meio ágar base de isolamento de *C.botulinum*, empregando-se a técnica de plaqueamento em superfície. As placas foram incubadas, a 37 °C, por 48 horas, em condições anaeróbicas e as análises foram realizadas em triplicata com três repetições.

3.7.2 Contagem de endósporos

Após homogeneização em água peptonada 0,1% (m/v), as amostras foram submetidas ao choque térmico, 75 °C, por 15 minutos, e banho de gelo, por 15 minutos, para a inativação das células viáveis. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas em 9 mL de água peptonada 0,1% (m/v) e alíquotas de 100 µL foram transferidas para as placas contendo o meio ágar base de isolamento de *C. botulinum*, empregando-se a técnica de plaqueamento em

superfície. As placas foram incubadas, a 37 °C, por 48 horas, em condições anaeróbicas e as análises foram realizadas em triplicata, com três repetições.

3.8 Análises físico-químicas das mortadelas

Foram realizadas as seguintes análises físico-químicas: pH, atividade de água, cor objetiva, oxidação lipídica e nitrito residual.

3.8.1 Determinação do pH

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

3.8.2 Atividade de água (Aw)

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

3.8.3 Análise de cor objetiva

A avaliação objetiva da cor das mortadelas foi realizada utilizando-se um colorímetro espectrofotométrico CM 700 (Konica Minolta, Osaka, Japão), seguindo as recomendações sugeridas por Ramos et al. (2009). Para o cálculo dos índices de cor, foi estabelecido o ângulo do observador de 10°, iluminante D₆₅ e o sistema de cor CIELAB.

Os parâmetros luminosidade (L^*), índice de vermelho (a^*) e índice de amarelo (b^*) foram obtidos considerando-se o valor médio de três leituras realizadas em diferentes pontos nas fatias de mortadela. A saturação (C^*) e o ângulo de tonalidade (h^*) foram calculados da seguinte forma, $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0,5}$; e $h^* = \arctg (b^*/a^*)$ (RAMOS; GOMIDE, 2007).

3.8.4 Análise da oxidação lipídica

A oxidação lipídica foi estimada pela mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), seguindo a metodologia de Raharjo, Sofos e Schimidt (1992), com algumas modificações. Três porções de 10 g de amostra foram coletadas, trituradas, adicionadas de 40 mL de ácido tricloroacético a 5% (TCA 5%) e 1 mL de antioxidante BHT 0,15% (em etanol), sendo homogeneizadas, por 1 minuto, em Politron. A seguir, procedeu-se à filtração e o volume foi ajustado para 50 mL, em balão volumétrico, com TCA 5%. Alíquotas de 2 mL foram retiradas e adicionadas de 2 mL do reagente de TBA 0,08 M, homogeneizadas e submetidas a banho-maria fervente, por 5 minutos. Após resfriar, a amostra foi conduzida à leitura da absorbância a 531 nm.

Os valores foram expressos em miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra (mg de MA/kg), por meio do cálculo: valor da absorbância lida x 8,93 (fator de conversão obtido a partir de curva analítica com 1,1,3,3-tetraetoxipropano – TEP).

3.8.5 Análise de concentração de nitrito

A concentração de nitrito residual na mortadela foi determinada segundo a metodologia oficial n°973.31 da AOAC (1996). Dez gramas de amostra foram pesados e homogeneizados em 40 mL de água destilada, a 80 °C e transferidos para um erlenmeyer de 500 mL, com lavagens sucessivas, utilizando-se água destilada a 80 °C, até o volume aproximado de 300 ml. Em seguida, o erlenmeyer foi submetido a banho-maria, a 80 °C, por 2 horas, sendo agitado ocasionalmente. Após esse período, os erlenmeyer foram retirados e resfriados à temperatura ambiente. Posteriormente, o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 500 mL. Seu volume foi completado com água destilada e a solução foi filtrada.

Após essa etapa, 45 mL do filtrado foram transferidos para tubo Falcon de 50 mL, sendo adicionados 2,5 mL de sulfanilamida homogeneizados e, após 5 minutos, 2,5 mL de reagente NED (N-1-naftiletlenodiamino) foram adicionados. A solução foi agitada e mantida em repouso, por 15 minutos, para o desenvolvimento da cor e, em seguida, foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro, a 540 nm.

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

3.9 Análise Estatística

As análises microbiológicas e físico-químicas das mortadelas foram dispostas em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4x3, sendo 4 tratamentos (diferentes combinações de óleos essenciais e nitrito) e 3 tempos de armazenamento com três repetições. Os resultados foram

submetidos à análise de variância (ANOVA), adotando-se o nível de 5% de significância, sendo a comparação entre as médias estabelecida pelo teste de Tukey $p (\leq 0,05)$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Concentração mínima bactericida

Não houve ação bactericida em nenhuma das concentrações testadas dos óleos essenciais de cardamomo, sálvia, basilicão, limão-siciliano, gengibre e noz-moscada sobre *C. botulinum* (Tabela 3).

O óleo essencial de alecrim apresentou efeito bactericida na concentração de 10%, a maior testada e o óleo de cravo botão na concentração de 7%. Já os óleos essenciais de orégano, canela e tomilho apresentaram melhor efeito antibacteriano sobre *C. botulinum*, tendo o óleo de canela sido o que apresentou melhor atividade antimicrobiana, com concentração mínima bactericida (CMB) de 0,5%, seguido dos óleos essenciais de orégano, com CMB de 1,5% e tomilho, 2%.

Tabela 3 Concentração mínima bactericida (%) dos óleos essenciais sobre células vegetativas de *C. botulinum* do tipo D

Óleos testados	0,25	0,5	1,0	1,5	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cardamomo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Orégano	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sálvia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Canela	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Basilicão	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Limão-siciliano	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alecrim	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Gengibre	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tomilho	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Noz-moscada	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cravo-botão	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

(-) Não houve crescimento; (+) houve crescimento

Ismail (1988) testou os efeitos dos óleos essenciais de cravo, tomilho, pimenta-preta, pimenta, orégano, cebola e canela na germinação, no crescimento pós-germinativo, no crescimento e na produção de toxina de *Clostridium botulinum* (seis linhagens dos tipos A, B e E) em meio de cultura. O óleo de alho foi o mais potente inibidor da germinação. Aparentemente, os óleos não apresentaram efeito significativo no crescimento pós-germinativo de esporos germinados, nem na produção de toxina. Os óleos de pimenta-preta, cravo, canela e orégano foram os que mais inibiram o crescimento vegetativo.

Ooi et al. (2006) verificaram que o óleo essencial de *C. cassia* e o cinamaldeído foram igualmente efetivos na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella typhimurium*. Este estudo confirma a eficácia do óleo essencial de canela como antimicrobiano, demonstrando ser eficiente para bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Segundo Davidson (1997), a atividade do óleo essencial de alecrim está relacionada à presença de borneol e outros constituintes fenólicos, carvacrol, ρ -cimeno e timol, que são, provavelmente, responsáveis pela atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano e tomilho.

Dias (2011) observou, em seu trabalho, que os óleos essenciais de alecrim, gengibre, limão-siciliano e sálvia não apresentaram atividade antibacteriana em nenhuma das concentrações testadas sobre *C. perfringens* tipo A. Aleixo (2013) também testou várias concentrações de óleo de alecrim para endósporos de *C. botulinum*, não tendo sido eficiente em nenhuma concentração testada para inibição da germinação e crescimento da célula vegetativa. Este estudo está de acordo com os resultados daqueles trabalhos, exceto o óleo de alecrim, que apresentou efeito bactericida, a 10%, sobre *Clostridium botulinum*. Entretanto, essa alta concentração não é viável para a indústria de alimento,

sendo necessário conciliar com testes sensoriais e físico-químicos para melhor conclusão. Portanto, os resultados demonstram que os óleos essenciais testados de alecrim, gengibre, limão-siciliano e sálvia não apresentaram efeito antimicrobiano sobre bactérias do gênero *Clostridium*, como *C. perfringens* e células vegetativas e endósporos de *C. botulinum*.

Martins (2013) observou efeito bactericida de óleo essencial de orégano, gengibre, capim-limão e cardamomo, na concentração de 3,1%, para endósporos de *C. perfringens*. Neste estudo sobre *C. botulinum*, os óleos de gengibre, capim-limão e cardamomo não apresentaram efeito antimicrobiano; já o orégano apresentou melhor efeito bactericida, comparado com o estudo anterior com CMB de 1,5%.

Os óleos de limão-siciliano, basilicão e tomilho-branco apresentaram concentração mínima inibitória (MIC) de 6,3% para *Clostridium perfringens* (MARTINS, 2013); para *C. botulinum*, tomilho apresentou CMB de 2% e os óleos de limão-siciliano e basilicão não apresentaram efeito antimicrobiano.

A diferença da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser explicada pelas diferenças na composição química dos mesmos. Considerando o número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, é muito provável que a sua atividade antimicrobiana não seja atribuível a um mecanismo específico, mas que existem vários alvos na célula (BURT, 2004).

O efeito antimicrobiano está relacionado, principalmente, à alteração da permeabilidade e da integridade da membrana celular bacteriana (LAMBERT et al., 2001), interrompendo a força próton motriz, o fluxo de elétrons e o transporte ativo, ocorrendo também coagulação do conteúdo das células e inativação das enzimas extracelulares (DENYER; HUGO, 1991).

Outra característica importante dos óleos essenciais é a sua hidrofobicidade, o que permite a partição dos lipídeos da membrana

citoplasmática bacteriana, perturbando sua estrutura e sua função e podendo ocorrer o vazamento de íons e do conteúdo celular (LAMBERT et al., 2001).

Pouco se sabe sobre a eficácia de óleos essenciais sobre *C. botulinum*, por isso é importante realizar novas pesquisas com diferentes óleos e concentrações sobre bactérias dessa espécie.

4.2 Sinergismo entre os óleos essenciais

Dentre os óleos essenciais testados, orégano, canela, tomilho e cravo-botão foram selecionados por apresentarem menores concentrações mínimas bactericidas. Estes foram testados em quatro combinações contendo três óleos essenciais cada, seguindo o planejamento experimental proposto na Tabela 1. A ação antimicrobiana é demonstrada na Tabela 4.

Tabela 4 Concentração mínima bactericida das combinações de óleos essenciais de orégano, canela, tomilho e cravo-botão, utilizados nas análises de sinergismo sobre *C. botulinum*

Ensaio	Óregano (%)	Canela (%)	Tomilho (%)	Resultados
1	1,5	-	-	-
2	-	0,5	-	-
3	-	-	2	-
4	0,75	0,25	-	-
5	0,75	-	1	-
6	-	0,25	1	-
7	1,01	0,09	0,34	-
8	0,26	0,34	0,34	-
9	0,26	0,09	1,34	-
10	0,50	0,17	0,66	-

Ensaio	Óregano (%)	Tomilho (%)	Cravo-botão (%)	Resultados
1	1,5	-	-	-
2	-	2	-	-
3	-	-	7	-
4	0,75	1	-	-
5	0,75	-	3,5	-
6	-	1,34	3,5	-
7	1,01	0,34	1,19	-
8	0,26	1,34	1,19	-
9	0,26	0,34	4,69	-
10	0,50	0,66	2,31	-

Ensaio	Óregano (%)	Canela (%)	Cravo-botão (%)	Resultados
1	1,5	-	-	-
2	-	0,5	-	-
3	-	-	7	-
4	0,75	0,25	-	-
5	0,75	-	3,5	-
6	-	0,25	3,5	-
7	1,01	0,34	1,19	-
8	0,26	0,34	1,19	-
9	0,26	0,09	4,69	-
10	0,50	0,17	2,31	-

Tabela 4, conclusão

Ensaio	Canela (%)	Tomilho (%)	Cravo-botão (%)	Resultados
1	0,5	-	-	-
2	-	2	-	-
3	-	-	7	-
4	0,25	1	-	-
5	0,25	-	3,5	-
6	-	1	3,5	-
7	0,34	0,34	1,19	-
8	0,09	1,34	1,19	-
9	0,09	0,34	4,69	-
10	0,17	0,66	2,31	-

(-) ausência de crescimento em todas as combinações testadas

Todas as combinações testadas apresentaram efeito bactericida sobre o *C. botulinum*. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Aleixo (2013) que testou, em diferentes combinações, os óleos essenciais de orégano, cravo-da-índia e o composto majoritário carvacrol sobre esporos de *C. botulinum* do tipo D e também observou ação esporicida.

Dias (2011) demonstrou, em seu trabalho, o efeito inibitório das combinações dos óleos essenciais de orégano, tomilho e cravo-da-índia sobre *C. perfringens* do tipo A. As concentrações de óleos essenciais que proporcionaram maior halo de inibição foram aquelas contendo as maiores proporções de óleo essencial de orégano.

Martins (2013), ao analisar as combinações entre os óleos essenciais de canela, orégano, gengibre e cardamomo contra o *Clostridium perfringens* tipo A, constatou maior eficiência na redução da população do microrganismo pelo gengibre, seguido dos óleos essenciais de canela e orégano, e menor eficiência do cardamomo.

Segundo Fu et al. (2007), dois óleos essenciais ou mais, quando são combinados, há interação entre as diversas substâncias químicas, podendo ocorrer sinergismo, adição ou efeitos antagônicos. Várias combinações de óleos e conservantes foram testadas e alcançaram a mesma atividade antibacteriana que os compostos isolados, porém, em concentrações mais baixas, o que pode sugerir menores efeitos nas alterações organolépticas nos alimentos. Segundo Lis-Balchin e Deans (1997), na mistura de um óleo essencial com elevada atividade inibitória e outro de atividade moderada pode ocorrer efeito inibidor significativo, ao passo que combinações entre óleos essenciais de atividades inibidoras elevadas podem não apresentar qualquer aumento da ação antibacteriana.

O modo de ação que provoca a inibição de microrganismos por óleos essenciais e seus constituintes químicos envolve diferentes mecanismos, dependendo dos componentes majoritários do óleo essencial. Entretanto, além de se conhecer a ação dos componentes majoritários isoladamente, deve-se considerar a ação sinérgica das moléculas que os compõem, pois é possível que a atividade atribuída aos componentes majoritários seja modulada pelos minoritários presentes no óleo, que atuam na penetração, na distribuição celular e na fixação deles nas paredes e membranas (LIOLIOS et al., 2009).

4.3 Efeito conservante sobre *C. botulinum* inoculado em mortadela

Dentre as combinações testadas, todas apresentaram efeito inibitório sobre *C. botulinum*. Com isso, foram escolhidos os óleos essenciais de orégano, canela e tomilho, por terem apresentado menores CMB, Tabela 3.

Os tratamentos utilizados foram referentes ao ensaio 7 (67%, óleo A; 17%, óleo B e 17%, óleo C), seguindo o planejamento experimental (Tabela 1). Entretanto, devido à utilização de 75 ppm de nitrito de sódio e buscando o

possível sinergismo entre conservante e a mistura de óleos essenciais, foram utilizados 25% dos valores das CMB (tratamento 3), que foram calculados considerando o óleo de orégano (A), canela (B) e tomilho (C), e 50% dos valores da CMB (tratamento 4), calculados considerando canela (A), orégano (B) e tomilho (C).

Na Tabela 5 apresentam-se os resultados da combinação dos óleos essenciais e a quantidade de nitrito de sódio que foi adicionada na mortadela contendo células vegetativas de *C. botulinum*.

Tabela 5 Proporções de diferentes combinações de óleos essenciais e concentrações de NO₂ adicionadas em mortadelas, com base na CMB de cada óleo essencial, calculadas seguindo o ensaio 7 do planejamento experimental (67% óleo A; 17% óleo B e 17% óleo C), conforme Tabela 1

Tratamentos	Nitrito (ppm)	Orégano (%)	Canela (%)	Tomilho (%)	Total de óleos essenciais (%)
Trat 1	150	-	-	-	-
Trat 2	75	-	-	-	-
Trat 3	75	0,25	0,02	0,09	0,36
Trat 4	75	0,13	0,17	0,17	0,47

4.3.1 Análises físico-químicas

Dentre as análises físico-químicas realizadas neste estudo, Aw, pH e nitrito de sódio residual interferem no crescimento bacteriano e, por isso, foram apresentadas primeiramente.

Para a atividade de água (Aw), não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre os tratamentos e os tempos de estocagem das mortadelas, de 0, 10 e 20 dias. Também não houve efeitos isolados, sendo observado um valor médio de 0,97 de atividade de água.

Martins (2013) também observou A_w acima de 0,97, em 17 mortadelas com diferentes tratamentos (variação de nitrito, nisina e óleos essenciais), estocadas, por trinta dias, em câmara fria, a 4 °C. Dias (2011) estudou cinco amostras de mortadela e relatou que os tratamentos não foram afetados significativamente ($P \geq 0,05$) pela quantidade de nitrito de sódio e óleos essenciais adicionadas as mortadelas, observando, em todos os tratamentos, A_w superior a 0,97.

A atividade de água (A_w) é um dos fatores intrínsecos dos alimentos e é uma medida qualitativa que possibilita avaliar a disponibilidade de água livre que é suscetível a diversas reações (SCOTT, 1957). A quantidade de água livre que não se encontra comprometida com as moléculas constituintes do produto está disponível para as reações físicas, químicas e biológicas, tornando-se o principal responsável pela deterioração dos alimentos (WELTI; VERGARA, 1997).

Para o pH foi observado apenas efeito significativo ($p \leq 0,05$) entre os tempos de armazenamento (Tabela 6).

Tabela 6 Valores de pH durante o armazenamento (4 °C) de mortadelas com diferentes concentrações de nitrito e combinações de óleos essenciais

Dia	pH
0	6,71 a
10	6,55 b
20	6,83 c

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Segundo as Normas Sanitárias do Instituto Adolf Lutz (2005), o pH de mortadelas deve ser levemente ácido, confirmando os resultados obtidos neste

trabalho, em que foi encontrada média de pH de 6,70, entre os tempos observados.

Silva (2000) afirma que a concentração hidrogeniônica que determina o pH dos alimentos é um fator de importância fundamental na limitação dos tipos de microrganismos capazes de se desenvolver em um alimento, exercendo influência sobre o crescimento, a sobrevivência ou a destruição desses microrganismos.

Para nitrito de sódio (NO₂) residual, não houve interação significativa entre tratamento e tempo de armazenamento das mortadelas. Foram observados apenas efeitos significativos ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 7).

Tabela 7 Valores médios de NO₂ residual em mortadelas contendo diferentes concentrações de nitrito e combinação de óleos essenciais

Tratamentos	NO ₂ residual
Trat 1	68,13 a
Trat 2	26,50 b
Trat 3	50,70 a
Trat 4	53,21 a

Trat 1: 150 ppm de NO₂; Trat 2: 75 ppm de NO₂; Trat 3; 75 ppm de NO₂ e óleos essenciais de orégano (0,25%), canela (0,02%) e tomilho (0,09%); Trat 4: 75 ppm de NO₂ e óleos essenciais de canela (0,17%), orégano (0,13%) e tomilho (0,17%). Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Foi observada, neste estudo, redução de NO₂ em todas as mortadelas testadas, em relação à quantidade adicionada.

Segundo Cassens (1997), após adicionar nitrito ao sistema cárneo, aproximadamente 1% a 10% são oxidados a nitrato, de 5% a 10% reagem com a mioglobina, de 5% a 15% com os grupos sulfidrilas das proteínas, de 1% a 5% com gordura, de 20% a 30% com proteína e cerca de 1% a 5% transformam-se em gás e se desprendem do produto. Como consequência, essas reações

complexas do nitrito podem contribuir para a variação na quantidade residual de nitrito em produtos cárneos, portanto, apenas 10% a 20% do nitrito adicionado podem ser detectados após o processamento de produtos curados e este nível reduz gradualmente com o armazenamento.

Segundo Mac Donald, Gray e Gibbins (1980), o comportamento de queda do teor de nitrito residual ao longo da estocagem de produtos cárneos curados se deve à reatividade do nitrito com proteínas heme e não heme, peptídeos, aminoácidos e metais.

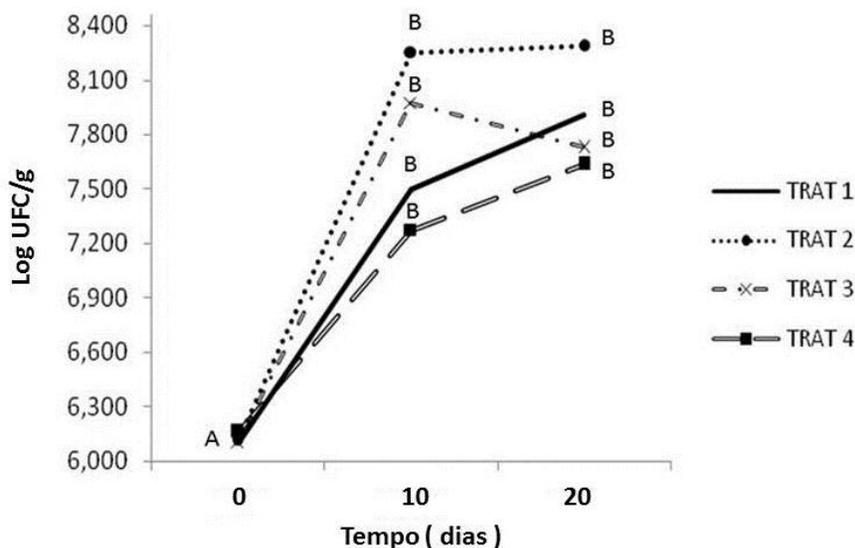
Neste estudo não ocorreu redução do nitrito gradualmente, pois, possivelmente, o nitrito foi consumido em grande parte nas primeiras horas de preparação e estocagem, não apresentando redução significativa nos tempos de armazenamento.

Para que haja um controle eficaz sobre várias bactérias, dentre elas o *C. botulinum*, alguns autores consideram necessários, aproximadamente, 10 ppm de nitrito residual no produto final e afirmam que valores de adição inferiores a 150 ppm são insuficientes para se alcançar este nível residual e, portanto, não previnem o desenvolvimento deste microrganismo (CASSENS, 1997).

Embora tenha sido demonstrado em estudo que 40 mg/kg de nitrito sejam suficientes para conferir cor, aroma e sabor de produtos curados (MÜLLER, 1991), valores inferiores a 150 mg/kg têm sido relatados como insuficientes para prevenir o crescimento e a produção de toxina pelo *Clostridium* ssp (BRASIL, 1998).

4.3.2 Contagem total de *C. botulinum* em mortadelas

As contagens totais de *C. botulinum* em mortadelas adicionadas de nitrito e óleos essenciais, armazenadas a 25 °C, por 20 dias, são apresentadas na Figura 3.



Trat1: 150 ppm de NO₂; Trat 2: 75 ppm de NO₂; Trat 3; 75 ppm de NO₂ e óleos essenciais de orégano (0,25%), canela (0,02%) e tomilho (0,09%); Trat 4: 75 ppm de NO₂ e óleos essenciais de canela (0,17%), orégano (0,13%) e tomilho (0,17%). Letras (A, B) maiúsculas diferem entre si em relação ao tempo

Figura 3 Crescimento de *Clostridium botulinum* tipo D em mortadelas adicionadas de nitrito de sódio e diferentes combinações de óleos essenciais

Não houve diferença significativa entre tratamentos, porém, o tempo de estocagem influenciou significativamente o crescimento de *C. botulinum* nas mortadelas, que aumentou significativamente ($P \leq 0,05$) em todos os tratamentos no décimo dia de estocagem.

O tratamento 4 tem, em sua composição, maior quantidade de óleos essenciais e apresentou variação de 0,654 ciclos logarítmicos, comparado com o tratamento 2 (75 ppm de nitrito), no vigésimo dia de estocagem. Dentre os tratamentos analisados, este foi o que promoveu o menor crescimento de *C. botulinum* durante os dias de armazenamento.

Ismaiel e Pierson (2006) testaram os efeitos inibitórios dos óleos essenciais de cravo, tomilho, pimenta-preta, orégano, alho, cebola e canela sobre *C. botulinum* 33A, 40B e 1623E. A concentração de 200 ppm dos óleos essenciais testados foi suficiente para inibir todos as cepas estudadas; já na concentração de 10 ppm, a atividade inibitória da maioria dos óleos essenciais foi diminuída. Para inibição de *C. botulinum*, os óleos essenciais foram divididos em três categorias: (1) muito ativos: orégano, canela, cravo; (2) ativos: pimenta e tomilho e (3) menos ativos: alho, cebola e pimenta-preta. Porém, na germinação dos endósporos, a eficácia dos óleos essenciais testados foi diferente, 150 e 200 ppm de todos os óleos impediram a germinação. Os óleos essenciais de cebola e alho apresentaram melhor efeito esporicida; 10 ppm foram suficientes para inibir endósporos de *C. botulinum* 33A, que apresentou ser mais sensível que *C. botulinum* (40B e 1623E).

Cui, Gabriel e Nakano (2010) estudaram o efeito inibitório de diferentes combinações de extratos de plantas com 10 ppm de nitrito de sódio (NO₂) em um modelo alimentar cárneo inoculado com 10⁴ UFC/mL de *C. botulinum* 62A, armazenado, por 7 dias, a 25 °C. A concentração de 10 ppm de NO₂ e extratos vegetais resultou na inativação e na inibição do crescimento da bactéria testada. A combinação de NO₂ e extrato de sálvia (0,02%) promoveu redução inicial de 1 ciclo de log, no primeiro dia de armazenamento, não apresentando diferença significativa até o sétimo dia de estocagem. Já as combinações de NO₂ e cravo (0,05%) e NO₂ e extratos de noz-moscada (0,05%) diminuiram gradativamente as contagens de *C. botulinum*. A combinação de NO₂ e extrato de noz-moscada (0,05%) apresentou maior taxa de inibição, diminuindo a população por 4 ciclos logarítmicos, no quarto dia de armazenamento, tendo sido constatado efeito sinérgico entre o NO₂ e os extratos vegetais.

Ismaiel e Pierson (1990) testaram a atividade antimicrobiana de óleo essencial de orégano sobre endósporos de *C. botulinum* em carne suína picada,

seladas a vácuo. A combinação contendo 400 ppm de óleo essencial de orégano e 50-100 ppm de nitrito de sódio influenciou significativamente o número de esporos e reduziu o crescimento de *C. botulinum*. No entanto, esse efeito não foi evidente quando se utilizou o óleo essencial de orégano sozinho.

Dias (2011) testou a adição de 150 e 75 ppm de nitrito de sódio (TRAT 1 e 2) em mortadelas armazenadas a 25 °C e observou crescimento de *C. perfringens* no primeiro dia de armazenamento. Porém, no mesmo período de tempo, nos tratamentos contendo diferentes combinações de óleos essenciais e 75 ppm de nitrito (TRAT 3, 4 e 5), houve redução do número de *C. perfringens*. Observou-se que, entre os tratamentos contendo também óleos essenciais, aquele com orégano, tomilho e cravo-da-índia (TRAT 5) promoveu a maior redução de *C. perfringens* no produto. Resultados diferentes foram encontrados neste estudo, no qual os tratamentos não apresentaram efeito bactericida, exceto o tratamento 3, que apresentou crescimento até o décimo dia e, após esse período, ocorreu uma leve redução.

Os resultados obtidos neste estudo diferem dos relatados na maioria dos trabalhos, possivelmente pelas baixas concentrações de óleos essenciais adicionados às mortadelas. Oliveira et al. (2011) observaram pequena redução de *C. perfringens* em seu trabalho com mortadelas elaboradas com 100 ppm de nitrito e 0,78% de óleo essencial de *Satureja montana* L. armazenadas a 25 °C. As reduções nas contagens foram mais pronunciadas nos tratamentos contendo 100 ppm de nitrito e maiores concentrações de óleo, com redução de 2,29 ciclos na concentração de 3,125% de óleo essencial, ao final do primeiro dia de estocagem das amostras.

O tratamento 1 (controle), contendo 150 ppm de nitrito de sódio, sem óleo essencial, não foi suficiente para inibir o crescimento de *C. botulinum* (Figura 3). Vários fatores podem ter favorecido o crescimento, dentre eles, a

temperatura de estocagem das mortadelas a 25 °C. Segundo Bhunia (2008), a temperatura ideal para cepas não proteolíticas é de 26 °C a 28 °C.

O valor médio de pH foi de 6,83, no vigésimo dia de armazenamento. Para que *C. botulinum* cresça mais rapidamente, Montville, Parris e Conwai (1985) afirmam que os valores ideais de pH estariam entre 6,5 a 7,0.

Alimentos de baixa acidez ($\text{pH} > 4,5$) são os mais sujeitos à multiplicação microbiana, tanto de espécies patogênicas quanto de espécies deteriorantes (FRANCO; LANDGRAF, 2005). O pH de um alimento não exerce apenas influência sobre a velocidade de multiplicação dos microrganismos, mas também interfere na qualidade dos alimentos, durante o armazenamento, o tratamento térmico e a dessecação, ou seja, é também responsável direto pela deterioração de produtos alimentícios (SILVA, 2000).

O valor médio de atividade de água (A_w) foi de 0,97, no vigésimo dia de armazenamento. A A_w requerida por este microrganismo é na faixa de 0,94 a 0,97 (JAFARI; EMAM-DJOMEH, 2007). Dessa forma, os resultados do presente estudo podem ter favorecido o crescimento de *C. botulinum*.

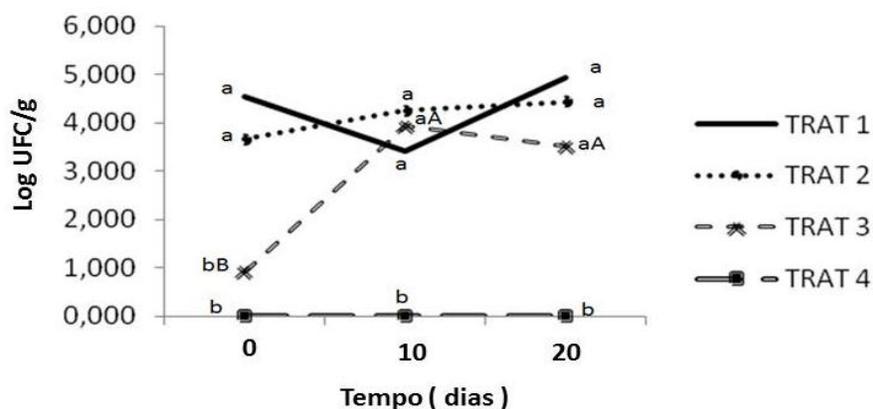
Outro fator importante é o elevado percentual de gordura encontrado em mortadelas fabricadas, que pode resultar na redução do efeito inibitório dos óleos essenciais testados (OLIVEIRA et al., 2011). Supõe-se que os elevados níveis de gordura e proteína dos alimentos possam proteger as bactérias da ação dos óleos essenciais de alguma forma, pois estes, dissolvidos na fase lipídica do alimento, são relativamente menos disponíveis para a ação sobre bactérias presentes na fase aquosa (MEJLHOLM; DALGAARD, 2002).

Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (2001) afirmam que o progresso de antimicrobianos, como o óleo essencial, para o local alvo na célula bacteriana, pode ser impedido pelo menor teor de água encontrado nos alimentos, em comparação com os meios de laboratório.

4.3.3 Contagem de endósporos

As combinações testadas neste estudo não foram suficientes para inibir completamente o crescimento das células vegetativas e induziram a esporulação de *C. botulinum* nas mortadelas (Figura 4).

No tempo 0, aproximadamente 12 horas após a inoculação das células vegetativas, observou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos contendo óleos essenciais e 75 ppm de NO_2 (Trat 3 e Trat 4), dos demais tratamentos, contendo 150 ppm (Trat 1) e 75 ppm (Trat 2), para os endósporos de *C. botulinum*.



Trat 1: 150ppm de NO_2 ; Trat 2: 75ppm de NO_2 ; Trat 3: 75ppm de NO_2 e óleos essenciais de orégano (0,25%), canela (0,02%) e tomilho (0,09%); Trat 4: 75ppm de NO_2 e óleos essenciais de canela (0,17%), orégano (0,13%) e tomilho (0,17%). Letras (a, b) minúsculas diferem entre si em relação aos tratamentos, e letras (A, B) maiúsculas diferem entre si, em relação ao tempo

Figura 4 Esporulação de *Clostridium botulinum* tipo D em mortadelas adicionadas de nitrito de sódio e diferentes combinações de óleos essenciais

O tratamento 4, contendo 75 ppm de NO₂ e óleos essenciais de canela (0,17%), orégano (0,13%) e tomilho (0,17%), inibiu totalmente a esporulação das células vegetativas em todos os dias de armazenamento. Já o tratamento 3 promoveu a esporulação das células de apenas 1 ciclo de log, no tempo 0, e apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) no décimo dia de estocagem, de 3 ciclos de log.

Nas mortadelas contendo apenas nitrito (150 e 75 ppm), a esporulação foi maior. Contudo, o número de esporos se manteve praticamente constante, mostrando que o aumento na contagem de células totais foi, praticamente, de células vegetativas que não esporularam.

Entre o décimo e o vigésimo dia de armazenamento, o Trat 1, o Trat 2 e o Trat 3 não apresentaram diferença significativa entre eles. Contudo, o Trat 3 apresentou redução de 1,40 ciclos logarítmicos, no vigésimo dia de armazenamento, comparado com o Trat 1 (150 ppm de NO₂), demonstrando, nesse período, que as combinações contendo óleos essenciais e nitrito foram mais eficientes que o tratamento contendo somente nitrito.

Oliveira et al. (2011) também observaram maior número de esporos ao final do período de estocagem em todos os tratamentos avaliados (diferentes concentrações de nitrito e óleo essencial). Segundo Mitchell (2001), a esporulação é iniciada, principalmente, em resposta à escassez de nutrientes, porém, outros fatores podem alterar a esporulação, como o pH, o oxigênio e a temperatura. Em geral, a esporulação é favorecida por condições que resultem em redução da taxa de crescimento.

Contudo, neste estudo, foi observada, durante os dias de estocagem, uma dinâmica entre células vegetativas e endósporos, em que nem os óleos essenciais ou o nitrito de sódio foram eficientes em inibir completamente o crescimento das células vegetativas ou a esporulação, sendo observada, nas primeiras horas de

estocagem, a esporulação de *C. botulinum*, ocorrendo germinação e crescimento até o décimo dia (Trat 1 e 2).

O tratamento contendo 150 ppm de nitrito (Trat 1) apresentou ligeira redução nos primeiros dias de armazenamento. Após o décimo dia, ocorreu, novamente, crescimento celular, possivelmente pela redução do nitrito residual. Resultados semelhantes foram encontrados por Andrade (2013), que analisou mortadelas contendo 150 ppm de nitrito inoculadas com 10^7 UFC/g de *C. botulinum* tipo D. Após 30 dias de armazenamento refrigerado (4 °C), foram observadas contagens de 10^5 UFC/g de *C. botulinum*, sendo esse fato atribuído à redução dos níveis de nitrito que ocorreu durante o armazenamento, mesmo sob refrigeração.

De acordo com Sofos et al. (1998), dosagens de 80 ppm de nitrito não foram efetivas na redução do crescimento de *C. botulinum*, havendo produção da toxina botulínica em emulsões com carne mecanicamente separada de frango. Neste estudo foram encontrados valores inferiores de nitrito residual, sendo 68,12 o maior valor encontrado entre as amostras (Tabela 8).

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

Nguefack, Tamgue e Dongmo (2012) afirmam que as concentrações mais baixas de óleos essenciais podem ser combinadas com outros compostos antimicrobianos ou outras tecnologias de conservação, para se obter efeito sinérgico sem comprometimento da atividade antimicrobiana.

4.4 Análises tecnológicas

4.4.1 Oxidação lipídica

Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos e os dias de armazenamento da mortadela, entretanto, foi observada diferença estatística, $p < 0,05$, entre tempo de estocagem inicial, tempo 0 até o décimo dia (Tabela 8).

Tabela 8 Índice de TBARs durante o armazenamento (4°C) de mortadelas com diferentes concentrações de nitrito e combinações de óleos essenciais

Dia	TBARs (mg MA/kg)
0	0,76 a
10	0,55 b
20	0,40 b

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

Observaram-se, neste trabalho, valores reduzidos de TBARS, de acordo com o aumento do período de estocagem das mortadelas.

Dias (2011) observou um aumento significativo da oxidação lipídica em todas as mortadelas adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais avaliados durante o tempo de armazenamento, em que os índices de TBARs foram superiores ao final de sua estocagem. O tratamento contendo 75 ppm de nitrito, tomilho (1%), cravo-da-índia (2%) e capim-limão (1%) apresentou maior oxidação lipídica, dentre todas as amostras. No tratamento com adição de 150 ppm de nitrito sem adição de óleo essencial foram observados índices inferiores de TBARs.

Aleixo (2013) testou diferentes tratamentos de óleos essenciais, composto majoritário e diferentes níveis de nitrito em mortadelas para o índice de TBARS e observou efeito significativo ($p \leq 0,05$) apenas para o tratamento com adição de nitrito, com maiores valores de TBARS nas amostras contendo óleos essenciais sem nitrito.

Oliveira et al. (2012) analisaram as variações no índice de TBARs em modelo alimentar do tipo mortadela contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *Satureja montana* L. (0%, 0,78%, 1,56% e 3,125%) e doses de nitrito (0, 100, 200 ppm), em função do tempo de estocagem. Estes autores afirmam que, em mortadelas fabricadas sem adição de nitrito e sem óleo essencial, foram observados índices de TBARs significativamente superiores aos encontrados para os demais tratamentos. Entretanto, neste mesmo estudo, foram observados índices de TBARs superiores, em maiores concentrações do óleo essencial (3,125%), ao final do período de estocagem (30 dias).

Os trabalhos de Dias (2011), Aleixo (2013) e Oliveira et al. (2012) confirmam a teoria de que o óleo essencial tem ação pró-oxidante, em vez de antioxidante, quando adicionado em altas concentrações (MUNTEANU; ZINGG; AZZI, 2004).

Resultados diferentes foram observados neste estudo, em que os tratamentos contendo óleo essencial e diferentes níveis de nitrito adicionados nas mortadelas não diferiram dos tratamentos controle contendo somente nitrito de sódio, apresentando ser eficaz no período de estocagem de 20 dias, possivelmente pela ação antioxidante do nitrito de sódio residual (50,70 e 53,21 ppm) encontrado nos tratamentos 3 e 4, respectivamente.

Al-Shuibi e Al-Abdullah (2002) analisaram mortadelas com diferentes combinações entre nitrito de sódio (40,80 e 120 ppm) e sorbato de sódio (0 e 2.600 ppm) e observaram menores valores para oxidação lipídica nas mortadelas que continham de 40 a 80 ppm de nitrito.

A ação antioxidante do nitrito se deve, provavelmente, à mesma reação responsável pelo desenvolvimento da cor. Os íons férricos (Fe^{3+}) da metamioglobina são catalisadores ativos da oxidação lipídica. Na reação dos pigmentos com o nitrito, o íon férrico é reduzido à forma ferrosa (Fe^{2+}), que não funciona como catalisador (TOWNSEND; OLSON, 1984). Essa contribuição do nitrito aumenta a estabilidade do produto durante a estocagem, reduz o sabor de requentado (alimentos pré-cozidos) e aumenta a vida útil (ARAÚJO, 2006).

4.4.2 Análise de cor

A luminosidade (L^*) caracteriza o grau de claridade da cor, variando do preto para o branco, indo de 0 (escuro) a 100 (claro). O parâmetro a^* representa a variação da intensidade da cor do verde ao vermelho; valores positivos de a^* ou $a+$ de 0 até +50 representam a cor vermelha da amostra, enquanto valores negativos de a^* ou $a-$ de 0 até -50 representam a coloração verde do produto. O índice de amarelo (b^*) representa tonalidades que vão do azul (valores negativos) ao amarelo (valores positivos). O índice de saturação (c^*) corresponde à intensidade ou à quantidade de uma tonalidade, indicando o nível de mistura com o branco, o preto ou o cinza (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Não houve interação significativa ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos e os tempos de armazenamento para os índices de luminosidade (L^*), vermelho (a^*), amarelo (b^*), tonalidade (h^*) e instauração (c^*). Porém, houve efeito isolado significativo ($p \leq 0,05$) para os dias de estocagem (Tabela 9).

O valor de L^* apresentou aumento significativo no vigésimo dia de estocagem das mortadelas contendo diferentes concentrações de óleos essenciais e nitrito, o que está de acordo com o observado por Aleixo (2013), que analisou mortadelas adicionadas de diferentes combinações de óleos, compostos

majoritários e concentração de nitrito, verificando um pequeno aumento significativo ($p \leq 0,05$) de L^* , no trigésimo dia de armazenamento, a 4 °C.

Tabela 9 Valores médios da cor durante o armazenamento (4°C) de mortadelas com diferentes concentrações de nitrito e combinações de óleos essenciais

Dia	L	a*	b*	h*	c*
0	54,65 a	12,11 a	13,46 a	47,94 a	18,17 a
10	54,64 a	10,20 b	15,35 b	56,31 b	18,49 a
20	59,60 b	8,84 b	11,43 a	51,84 a	14,48 b

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

Oliveira et al. (2012) também observaram um aumento significativo para L^* entre o primeiro e vigésimo dia de estocagem de mortadelas, a 25 °C, formuladas com 1,56% de óleo essencial de *Satureja montana* e 100 ppm de nitrito e formuladas com 3,125% do óleo essencial e 200 ppm de nitrito.

Dias (2011) observou aumento da luminosidade (L^*) do primeiro ao décimo dia, e este se manteve constante durante o vigésimo dia de armazenamento de mortadelas adicionadas de 150 ppm de nitrito de sódio. Porém, segundo o mesmo autor, foi observada uma redução do L^* do primeiro ao décimo dia de estocagem, mantendo-se sem diferença significativa até o último dia de estocagem para mortadela adicionada de 75 ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de tomilho (1%), cravo-da-índia (2%) e capim-limão (1%).

Para o índice de vermelho (a^*) entre os dias de estocagem, houve uma pequena redução, tendo o tempo zero apresentado uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) para os demais dias de armazenamento. Isto está de acordo com o relatado por Aleixo (2013), segundo o qual que não houve interação significativa ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos (níveis de nitrito e mistura de óleos essenciais) e o

tempo de armazenamento para os índices de vermelho (a^*) e de amarelo (b^*), em mortadelas estocadas, por trinta dias, a 4 °C.

Aleixo (2013) observou efeito significativo ($p \leq 0,05$) isolado para os tratamentos contendo 150 ppm de nitrito, tendo sido constatado um aumento nos valores de a^* e redução nos valores de b^* . Resultados diferentes foram encontrados nesta pesquisa, em que houve efeito somente do tempo e redução do índice de vermelho (a^*).

Oliveira et al. (2012) também observaram variações do índice de vermelho (a^*), em função do tempo de estocagem, de acordo com as concentrações de óleo essencial de *S. montana* L. (0%, 0,78%, 1,56% e 3,125%) e as doses de nitrito (0,100, 200 ppm), utilizadas na elaboração do modelo alimentar cárneo emulsionado do tipo mortadela, que apresentou valores superiores ($p \geq 0,05$) para formulações em que foi utilizado o nitrito (NaNO_2), nas concentrações de 100 e 200 ppm, quando comparado a amostras elaboradas sem nitrito, indicando maior participação da tonalidade vermelha.

Segundo Dutra (2009), 75 ppm de nitrito de sódio foram suficientes para a formação da cor característica em amostras não irradiadas, não tendo sido verificadas diferenças entre este tratamento e amostras formuladas com 150 ppm de nitrito. Resultados semelhantes foram encontrados nesta pesquisa, em que não foi observada diferença entre os tratamentos contendo 150 e 75 ppm de nitrito, e os tratamentos contendo 75 ppm de nitrito mais adição de óleos essenciais. Segundo Feiner (2006), para se obter uma coloração característica, intensa e instável são necessários de 30 a 50 ppm de nitrito.

O nitrito, além de funcionar como agente estabilizante da cor vermelha ou rósea, confere o sabor, o aroma e a textura (melhoria das características sensoriais), que são propriedades apreciadas pelo consumidor (ROÇA, 2005). Porém, a queda do índice de vermelho neste estudo pode estar associada com a oxidação do pigmento, o que é reforçado pelas mudanças em h^* e C^* ,

relacionadas com a redução do nitrito residual nos dias de armazenamento. Segundo Oliveira et al. (2012), maiores valores no índice a^* com a adição de nitrito são esperados, uma vez que a sua adição em produtos cárneos fornece a cor característica do produto curado.

Os índices de amarelo (b^*) não apresentaram diferença no tempo 0 e no vigésimo dia, porém, apresentaram ligeira redução no último dia de estocagem. Já no décimo dia de armazenamento das mortadelas houve um aumento significativo ($p \leq 0,05$). Resultados semelhantes foram encontrados por Aleixo (2013), que observou que a adição de nitrito reduziu ligeiramente os valores de b^* em mortadelas com diferentes níveis de nitrito e óleos essenciais, armazenadas, a 4 °C, por trinta dias.

Dias (2011) analisou mortadelas com diferentes concentrações de nitrito e óleos essenciais e observou, durante o armazenamento, um aumento ($p < 0,05$) do índice de amarelo (b^*) para o tratamento contendo 75ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de tomilho (1%), cravo-da-índia (2%) e capim-limão (1%), do primeiro ao décimo dia, mantendo-se constante no vigésimo dia de estocagem. Entretanto, o tratamento contendo 75ppm nitrito de sódio e óleos essenciais de orégano (2,5%), tomilho (0,3%) e cravo-da-índia (0,6%) reduziu o valor de b^* do primeiro ao décimo dia de armazenamento, sem diferença até o último dia de estocagem, não sendo observadas diferenças ($p \geq 0,05$) nas demais amostras de mortadelas. Estes resultados contrastam com os encontrados nesta pesquisa, em que foi encontrada diferença somente entre os dias de armazenamento, e não apresentou diferença significativa entre os tratamentos.

Para o índice de tonalidade (h^*), somente no décimo dia foi encontrada diferença estatística com ($p \leq 0,05$), ocorrendo um aumento do ângulo de tonalidade (h^*), devido a um aumento na participação do índice de amarelo neste tempo. Porém, no vigésimo dia de armazenamento, apesar da redução dos valores de b^* e a^* , o h^* não foi diferente ($p \geq 0,05$) do tempo zero. O ângulo de

tonalidade (h^*) é representado como a grandeza que caracteriza a qualidade da cor (vermelho, verde, amarelo, azul etc.), permitindo diferenciá-la (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Dias (2011) observou, durante os vinte dias de armazenamento, redução do índice de vermelho (a^*) e aumento do índice de amarelo (b^*) em praticamente todas as mortadelas contendo diferentes concentrações de nitrito de sódio e óleos essenciais. Estas alterações foram evidenciadas pelo aumento do ângulo de tonalidade (h^*) do produto, indicando uma maior participação da tonalidade de amarelo na cor rósea do produto, característica considerada por este autor indesejável para as amostras testadas. Resultados semelhantes foram observados neste estudo, no décimo dia de estocagem.

Oliveira et al. (2012) verificaram que concentrações superiores a 1,56% do óleo essencial de *Satureja montana* L. adicionadas em mortadelas provocaram efeitos negativos na cor do produto, com reduções do índice de vermelho (a^*) e aumento da participação da tonalidade amarelo (aumento de b^* e h^*). Este autor relatou que o uso de óleo essencial em concentrações elevadas promove alterações da coloração da mortadela, descaracterizando, assim, o produto.

Segundo Dutra (2009), não houve diferença nos valores de tonalidade (h^*) nas amostras de mortadelas adicionadas de diferentes concentrações de nitrito (75,150 ppm) e submetidas a diferentes doses de irradiação (0, 7,5 e 15 kGy). Apenas as amostras sem adição de nitrito apresentaram maiores valores de tonalidade, podendo-se afirmar que o aumento do ângulo de tonalidade implicou em amostras mais amareladas/amarronzadas.

O acréscimo dos parâmetros L^* e b^* e a redução do a^* estão relacionados a uma descoloração do produto, que não é apreciada pelo consumidor (AKSU; KAYA, 2005).

Para o índice de saturação (c^*) ocorreu uma redução significativa ($p \leq 0,05$) no vigésimo dia de armazenamento (Tabela 9).

Estes resultados estão de acordo com os de Oliveira et al. (2012), que observaram que, em mortadelas elaboradas com 3,125% de óleo essencial de *Satureja montana* L., ocorreu efeito significativo de tempo de estocagem com valores de C^* inferiores ao final do armazenamento de 30 dias.

5 CONCLUSÃO

O óleo essencial de canela foi o mais efetivo sobre *C. botulinum* do tipo D, seguido de orégano, tomilho e cravo-botão. Suas combinações apresentaram efeito bactericida em todas as concentrações testadas.

Os tratamentos adicionados nas mortadelas não foram eficientes para inibir completamente o crescimento das células vegetativas de *C. botulinum*, ocorrendo esporulação durante o armazenamento.

Os tratamentos utilizados não promoveram efeito negativo nas características tecnológicas e físico-químicas, sendo similar ao controle (Trat 1: 150 ppm de nitrito de sódio).

REFERÊNCIAS

ABO-KHATWA, N.; KUBO, I. Chemical composition of the essential oil of cardamom seeds, *Elattaria cardamomum*. **Proceeding Saudi Biology Society**, Arábia, v. 10, p. 297-305, 1987.

ABRAHAM, A. et al. **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins**. 2. ed. Silver Spring: Bad Bug Book, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alerta: Anvisa investiga caso de botulismo. **Cria Saúde**, 2014. Disponível em: <<http://www.criasaude.com.br/N14927/alerta-anvisa-investiga-surto-de-botulismo.html>>, Acesso em: 12 abr. 2014.

AKSU, M. I.; KAYA, M. The effect of α -tocopherol and butylated hydroxyanisole on the colour properties and lipid oxidation of kavurma, a cooked meat product. **Meat Science**, Barking, v. 71, n. 2, p. 277-283, Oct. 2005.

ALEIXO, G. C. **Efeito dos óleos essenciais e compostos majoritários sobre endósporos de *Clostridium botulinum* inoculados em mortadela**. 2013. 58 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

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

ALZOREKY, N. S.; NAKAHARA, K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. **Journal of Food Microbiology**, Yemen; v.80, n. 3. p. 223-230, feb. 2003.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R. MALLETT, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e

antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr-jun, 2012.

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

AOAC (1996). *Official methods of analysis*. Washington D.C.: Association of Official Analytical Chemists.

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

ARNON, S. S. et al. Infant botulism: epidemiology and relation to sudden infant death syndrome. **Epidemiologic Review**, Baltimore, v.3, p. 45-66, 1981.

AYALA, Z. J. F. AYALA-ZAVALA, J. F. SERRANO, I. O. AGUILAR, G.; PARRILLA, E. A.; BELLOSO, O. M. Bio-preservation of fresh-cut tomatoes using natural antimicrobials. **European Food Research and Technology**, v. 226, n.1,p.1047-1055, April. 2007.

BAKALLI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: A review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p.446-475, Feb. 2008.

BALZ, R. **The healing power of essential oils**. Twin Lakes: Lotus Press, 1999.

BARATTA, M. T.; DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 10, n. 6, p. 618-627, 1998.

BAYTOP, T. **Therapy with medicinal plants in Tukey**. Istanbul: Present Universith, 1984.

BHUNIA, A. K. **Food Microbial Pathogens – Mechanisms e Pathogenesis**. Editora Springer. West Lafayette - USA, 296 p. 2008.

BOTSOGLOU, N. A. et al. The effects of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. **Meat Science**, Barking, v. 65, n. 3, p. 1193-1200, Nov. 2003.

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

BOYLE, W. Spices and essential oils as preservatives. **American Perfumer and Essential Review**, Pontiac, v. 66, p. 25–28, 1955.

BOZIN, B. et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 5, p. 1820-1828, Mar. 2006.

BRACCO, U.; LOLIGER, J.; VIRET, J. I. Production and use of natural antioxidant. **Journal of Oil & Fat Industries**, Chicago, v. 58, n. 6, p. 686, 1981.

BRASIL. Centro de Vigilância Sanitária de Secretaria da Saúde. Portaria nº6 de 10/03/99. Aprova o regulamento técnico que estabelece os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimento de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, mar. 1999.

BRASIL. **Guia alimentar para população brasileira**. Brasília: Editora MS, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. Brasília, Lanara, 1989.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 4, de 31 de março de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade de mortadela. **Diário Oficial da União**, Brasília, abr. 2000. Seção1, p. 6.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n° 1004, de 11 de dezembro de 1998. Aprova o regulamento técnico “atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 - carne e produtos cárneos”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 dez. 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dados epidemiológicos: período de 2000 a 2013. **Portal da Saúde**, Brasília, 2014. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>. Acesso em: 11 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Surto de Botulismo em Santa Catarina. **Nota Técnica Conjunta n° 001/2011**, Brasília, abr. 2011.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy phytochemistry**: medicinal plants. 2 ed. London: Intercept, 1999.

BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L. Aromatherapy Use of Fragrances and Essential Oils as Medicaments. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v.9, n.5, p. 217-222, Sept./Oct.1994.

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

CAMMACK, R. et al. Review e nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1411, n. 2-5, p. 475-488, May 1999.

CARDOSO, T.; MANUELA, C. T.; H. ALMEIDA, C; GUIMARÃES. M.
Botulismo alimentar: estudo retrospectivo de cinco casos. **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v.17, n.1, p.54-58, Jan. 2004.

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

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Estimates of foodborne illness in the United States**. Atlanta: CDC, 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodborneburden/#>>. Acesso em: 25 nov. 2013.

CHAIIB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. Bakhrouf. **Phytotherapy Research**, London, v. 21, n. 6, p. 501-2007, Jun. 2007.

CLYDESDALE, F. M.; FRANCIS, F. J. Pigments. In: WARD, D. J. **Principles of food science**: volume 4. New York: Marcel Dekker, 1976. p. 393-402.

COORDENAÇÃO DE INFORMAÇÃO ESTRATÉGICA EM VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Lotes de mortadela e milho verde em conserva são recolhidos em SP após casos de Botulismo. **Informação Estratégica**, Rio de Janeiro, ago. 2012. Disponível em: <<http://cievsrio.wordpress.com>>. Acesso em: 22 nov. 2012.

CORREIA, C. B. Infecções e toxinfecções alimentares. **Revista Portuguesa de Defesa do Consumo**, Rio de Janeiro, v. 63, p. 65-99, 2010.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Rev. Clin Microbiol**, v.12, n.4, p. 564-582, October.1999.

- CUI, H.; GABRIEL, A. L.; NAKANO, H.; Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against *Clostridium botulinum*. **Food Control**, Guildford, v. 21, n.7, p.1030-1036, July. 2010.
- DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. Analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungi toxicity on *Penicillium digitatum*. **J. Agric. Food Chem**, Easton, v. 48, p. 2576-2581, May. 2000.
- DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The families of the monocotyledons**. New York: Springer, 1985.
- DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, 1997. p. 520-556.
- DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Washington, v. 43, n. 1, p. 148-155, Jan. 1989.
- DELAQUIS, P. J. et al. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74, n. 1-2, p. 101-109, Mar. 2002.
- DENYER, S. P.; HUGO, W. B. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In: DENYER, S. P.; HUGO, W. B. **Mechanisms of action of chemical biocides**. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1991. p. 171-188.
- DIAS, N. A. A. **Avaliações microbiológica e físico-química de mortadelas elaboradas com óleos essenciais e inoculadas com *Clostridium perfringens* tipo A**. 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

DOMCA. **Tecnología y productos para la industria alimentaria**. Barcelona: Domca, 2014. Disponível em: <<http://www.domca.com/index.php?lang=e>>. Acesso em: 19 abr. 2014.

DRESSLER, D. Botulinum toxin therapy failure: causes, evaluation procedures and management strategies. **European Journal of Neurology**, Oxford, v. 4, p. 67-70, 1997.

DUARTE, R. S. **Microrganismos mais frequentes encontrados com limites acima dos aceitáveis, segundo a RDC nº12/2001 da Anvisa em produtos de origem animal, registrados junto à Cispoa**. 2011. Monografia. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

DUTRA, M. P. et al. Radiação gama e tempo de armazenamento sobre a oxidação lipídica, cor objetiva, pigmentos heme e nitrito residual de mortadelas elaboradas com diferentes níveis de nitrito. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 12, p. 2203-2209, 2011.

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

DZIEZAK, J. D. Spices. **Food Technology**, Chicago, v. 43, p. 102-115, 1989.

EDUARDO, M. B. P. **Manual das doenças transmitidas por alimentos e água: *clostridium botulinum*/botulismo**. São Paulo: Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 2002.

FARREL, T. K. **Spices, condiments, and seasonings**. 3. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1995.

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

FIERHELLER, M. G. Modified atmosphere packaging of mischloride showed synergistic effects against *Lact. Curvatus* cellaneous products. In: OORAIKUL, B. **Modified atmosphere packaging of food based on the comparison of TDG values obtained for the ed**. Chichester: [s.n], 1991. p. 246-258.
FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Nutmeg processing and marketing in Grenada**. Itália: FAO, 2004. Disponível em: <www.fao.org>. Acesso em: 12 ago. 2013.

FORSYTHE, S. J. **Microbiology of safe food**. 2. ed. Oxford: Blackwell, 2010.

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

FREAN, J. et al. Fatal type A botulism in South Africa, 2002. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 98, n. 5, p. 290-295, May 2004.

FU, T-M. et al. Space-based formaldehyde measurements as constraints on volatile organic compound emissions in east and south Asia and implications for ozone, American. **Journal of Geophysical Research**, Washington, v.112, n. 6, p. 1984-2012, Mar. 2007.

GU, L. W. et al. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. **The Journal of Nutrition**, Estados Unidos, v. 134, n. 3, p. 613-617, Mar. 2004.

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

GUENTHER, E. **The essential oils**. New York: D. Van Nostrand, 1948.

GUENTHER, E. **The essential oils**. New York: D. Van Nostrand, 1950.

GUENTHER, E. **The essential oils**. New York: D. Van Nostrand, 1952.

HANNA INSTRUMENTS. **Consumo de mortadela**. São Paulo: Hanna Instruments, 2007. Disponível em: <www.hannabrasil.com>. Acesso em: 23 nov. 2012.

HARMAN, D. **Free radical in biology**: volume 5. New York: Academic Press, 1982.

HEMALSWARYA. S.; DOBLE. M. Potencial Synergism of natural products in the treatment of Pytother. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 4, p. 239-249, Apr. 2009.

IGNÁCIO, S. Morre m ulher diagnosticada com botulismo. **K3**, Araraquara, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.portalk3.com.br/Artigo/cidade/morre-mulher-por-botulismo-em-araraquara>>. Acesso em: 12 abr. 2014.

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

ISMAIEL, A. A. **The inhibition of *Clostridium botulinum* growth and toxin production by essencial oil of spice**. 1988. 146 p. Thesis (PhD) – Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, 1988.

ISMAIEL, A. A.; PIERSON, M. D. Inhibition of growth and germination of *C. botulinum* 33 A, 40 B e 1623E by essential oil spices. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 6, p. 676-1678, 2006.

ISMAIEL, A. A.; PIERSON, M. D. Inhibition of Germination, outgrowth, and vegetative growth of *C. botulinum* 67B by spices oils. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Washington, v. 53. p. 775-758, 1990.

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

JANSSEN, M. M. T. Food additives. In: VRIES, J. (Ed.). **Food safety and toxicity**. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 65-74.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, London, v. 73, p. 285-290, 2001.

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

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

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos extraídos das sementes de laranja e maracujá como aproveitamento de resíduos industriais. In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2003, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Editora da PUC, 2003.

KORIKONTIMATH, V.S.; MULGE, R.; ZACHARIAH, J. T. Variations in essential oil constituents in high yielding selections of cardamom. **Journal of Plantation Crops**, Amsterdam, v.27, p. 230-232, 1999.

LACHOWICZ, K. J. et al. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. **Letters in Applied Microbiology**, Berlin, v. 26, 209-214, 1998.

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

LASZLO AROMATERAPIA. Disponível em: <[http:// www.laszlo.ind.br/](http://www.laszlo.ind.br/)>. Acesso em: 05 jun. 2010.

LAWRENCE, H. A.; ENZO, A. P. Activity of Essential Oils Against *Bacillus subtilis* Spores. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1590-1595, sept. 2009.

LEE, S. E.; LEE, H. S.; AHN, Y. J. Scavenging effect of plant derived materials on free radicals and active oxygen species. **Agricultural Chemistry and Biotechnology**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 40-44, 1999.

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

LIMA, K. R.; CARDOSO, G. M.; MORAIS, C. M. Análise química e efeito inseticida do óleo essencial de *Sálvia officinalis* L. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 234, p. 821-832, 2012.

LIN, R. C.; SCHELLER, R. H. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology Journal**, Stanford, v.16, p.19-49, 2000.

LINSCOTT, A. J. Food-borne illnesses. **Clinical Microbiology Newsletter**, New York, v. 33, p. 41-45, 2011.

LIOLIOS, C. et al. The genomes on line database (GOLD) in 2009: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. **Nucleic Acids Research**, London, v. 38, p. 346-354, Jan. 2009.

LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S. G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.82, n. 6, p.759-762, Jun. 1997.

LOLIGER, J. The use of antioxidants in food. In: ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B. (Ed.). **Free radicals and food additives**. London: Taylor and Francis, 1991. p. 140-173.

MAC DONALD, B; GRAY, J. I.; GIBBINS, L. N. Role of nitrite in cured meat flavor: antioxidant role of nitrite. **Journal of Food Science**, Chicago, v.45, n.4, p.893-897, July. 1980.

MAKI, D. G. Coming to grips with foodborne infection—Peanut butter, peppers, and nationwide Salmonella outbreaks. **The New England Journal of Medicine**, Oxford, v. 360, p.949-953, Mar. 2009.

MARCO, A.; NAVARRO, J. L.; FLORES, M. The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. **Meat Science**, Barking, v. 73, n. 4, p. 660-673, Aug. 2006.

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

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

MILLER, B. J.; BILLDEAU, S. M.; MILLER, D. W. Formation of N-nitrosamines in microwaved versus skillet-fried bacon containing nitrite. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 295-299, May 1989.

MITCHELL, W. J. General biology and physiology. In: BAHL, H.; DÜRRE, P. **Clostridia: biotechnology and medical applications**. New York: J. Wiley. p.287-2001, 2001.

MONTVILLE, T. J.; PARRIS, N.; CONWAY, L. K. Influence of pH on organic acid production by *Clostridium sporogenes* in test tube and fermentor cultures. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, n. 4, p. 733-736, Apr. 1985.

MORIMOTO, S.; NONAKA, G. I.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. 39. Procyanidin C- glucosides and an acylatedflavan 3-ol glucoside from the barks of *cinnamomum cassia* Blume and *C. obtusifolium* Nees. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 34, p. 643-649, 1986.

MOUREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, Guildford, v. 13, n. 4-5, p. 289-292, June/July 2002.

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

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

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 2003.

NGUEFACK, J. et al. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Camerom for controlling food spoilage and mycotoxin producun fungi. **International Journal Food Microbiology**, v. 94, p. 329-334, 2004.

NGUEFACK, J.; TAMGUE, O.; DONGMO, J. B. L. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon Citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, Guildford, v. 23, n. 2, p. 377-383, Feb. 2012.

OJEDA, D. R. G.; GODOY, V. M.; COLMENARES N. G.; SALAS, L. C., FERRER, S. F. Composition of Venezuelan lemon essential oil *Citrus limon* (L.) Burm. **Rev. Fac. Agron. Luz**, v.15, n.1, p. 343-349, maio, 1998.

OJEDA, F. Biogeography of seeder and resprouter *Erica* species in the Cape Floristic Region-Where are the resprouters? **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 63, n. 3, p. 331-347, Mar. 1998.

OLIVEIRA, A. B. A; PAULA, C. M. D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M.R.I. Doenças Transmitidas por Alimentos, Principais Agentes Etiológicos e Aspectos Gerais: uma revisão. **Rev HCPA**, v. 30, n.1 p. 279-285, Porto Alegre. 2010.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. **European Food Research Technology**, Berlin, v. 234, p. 821-832, 2012.

OLIVEIRA, T. L. C., CARVALHO, S. M. SOARES. R. A., ANDRADE, M. A., CARDOSO, M. D. RAMOS, E. M. PICCOLI. R. H. Antioxidant effects of *Satureja montana* L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. Lavras MG. **LWT-Food Science and Technology**, London, v.45, n.2, p. 204-212, September. 2012.

OLIVEIRA, T. L. C.; SOARES, R. A.; RAMOS, E. M.; CARDOSO, M. G., ALVES, E., PICCOLI, R. H. Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 3, p. 546-555, Jan. 2011.

OOI, L. S. et al. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. **The American Journal of Chinese Medicine**, New York, v. 34, n. 3, p. 511-522, 2006.

POLO, M. Botulinum toxin type A (Botox) for the neuromuscular correction of excessive gingival display on smiling (gummy smile). **Americam Journal of Orthodontics Dentofacial Orthopedics**, Saint Louis, v. 133, n. 2, p. 195-203, Feb. 2008.

POURAZRANG, H.; MOAZZAMI, A. A.; BAZZAZ, B. S. F. Inhibition of mutagenic N-nitroso compound formation in sausage samples using L-ascorbic acid and atocopherol. **Meat Science**, Barking, v. 62, p. 479-483, 2002.

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

RAMOS, E. M. et al. Otimização da avaliação objetiva da cor de presuntos e apresuntados. In: V CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 1., 2009, São Paulo. **Anais...** Campinas: ITAL/CTC, 2009. 1 CD ROM.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da Qualidade de Carnes: Fundamentos e Metodologias**. 2 n. ed. Viçosa: Editora UFV, 599 p. 2007.
RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004.

ROÇA, R. O. **Cura de Carnes**. Botucatu: Faculdade das Ciências Agrônômicas, UNESP, Laboratório de Tecnologia dos Produtos de Origem Animal. 2005.
Disponível em: <http://WWW.fca.unesp.br/outros/tcarne/textos/Roça111>.
Acesso em: 22/07/11.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, London, v. 69, n. 2, p. 67-174, May 2000.

SABULAL, B. et al. Caruophyllene-rich rhizome oil of *zingibernimmonni* from south india: chemical characterization and antimicrobial activity.

Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology, New York, v. 67, p. 2469-2473, 2006.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, n. 1, p.7-15, Jan. 2011.

SCHOLTES, V. A. et al. Can we identify predictors of multilevel botulinum toxin A injections in children with cerebral palsy who walk with a flexed knee pattern. **Journal of Child Neurology**, Littleton, v. 23, n. 6, p. 628-634, June 2008.

SCOTT, W. J. Water relation of food spoilage microorganisms. **Advances in Food Research**, San Diego, v. 7, p. 83-127, 1957.

SHAHIDI, F.; PEGG, R. B.; SEN, N. P. Absence of volatile N-nitrosamines in cooked nitrite-free cured muscle foods. **Meat Sci.**, Oxford, v.37, n. 1, p.327-336, June.1994.

SHUKER, D. E. G. The chemistry of N-nitrosation. In: HILL, M. J. **Nitrosamines**: toxicology and microbiology. Chichester: Ellis Horwood, 1988. p. 01-69.

SHUKLA, H. D.; SHARMA, S. K. *Clostridium botulinum*: a bug with beauty and weapon. **Rev Microbiol**, v. 31, n.1, p.11-18, 2005.

SIKKEMA, J. J.; DE BONT, A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 11. p.8022-8028, March. 1994.

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

SIMPSON, L. L. The origem, structure and pharmacology activity of botulinum toxins. **Pharmacological Reviews**, v. 33, n. 3, p. 155-182, Sept. 1981.

SMITH-PALMER A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 4, p. 463-470, Aug. 2001.

SIQUEIRA, A. **Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto_correlato/consulta_correlato.asp>. Acesso em: 26 abr. 2012.

SKANDAMIS, P. N., NYCHAS, G. J. E. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. **J. Appl. Microbiol.** Kenilworth, v. 91, n. 6, p. 1011-1022, Dec. 2001.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 4, p. 463-470, Aug. 2001.

SOFOS, J. N. et al. **Naturally occurring antimicrobials in food**. Ames: Science Agricultural and Technology, 1998.

SOMANI, R. et al. Phytochemical and pharmacological potential of *Myristica fragrans* Houtt: a comprehensive review. **Pharmacognosi Reviews**, Elmsford, v. 2, p. 68-76, 2008.

SPENCER, C. M. et al. Polyphenol Complexation - Some thoughts and observations. **Phytochemistry**, Oxford, v. 27, n. 8, p. 2397-2409, 1988.

STECCHINI, M. L. et al. Effect of essential oil on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 35, n. 5, p.406-409, May 1993.

SURH, Y. J.; PARK, K. K.; CHUN, K. S.; LEE, L. J.; LEE, S. S. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and antiinflammatory activities: a short review. **Food Chemical Toxicology**, Seoul, v. 40, n. 1, p.1091-1097, 2002.

TAKEDA, M. et al. Protective effect of botulism C/D mosaic toxoid against avian botulism. **Journal of Veterinary Medicine Science**, Tokyo, v. 68, n. 4, p. 325-330, Apr. 2006.

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

U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Food additive status list**. Silver Spring: FDA, 2006. <<http://www.cfsan.fda.gov/dms/opa-appa.html#ftn.H>>. Acesso em: 20 jul. 2009.

VIUDA-MARTOS M. et al. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulate L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 12. p. 1130-1138, December. 2009.

WATTENBERG, L. Inhibitors of chemical carcinogenesis. **Advances in Cancer Research**, New York, v. 26, p. 339, 1978.

WELTI, J.; VERGARA, F. Atividade de água/conceito y aplicacion em alimentos com alto contenido de humedad. In: AGUILERA, J. M. **Temas em tecnologia de alimentos**: volume 1. Santiago: CRC Press, 1997. p. 11-26.

WEND, X. C.; WAND, W. Two novel synthetic antioxidants for deep frying oils. **Food Chemistry**, London, v. 84, n. 2, p. 219-22, Feb. 2004.

WOBESER, G. Avian botulism, another perspective. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.33, n. 2, p. 151-156, Apr. 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Reducing foodborne diseases by educating consumers**, Geneva. Geneva: WHO, 2012. Acesso em: <<http://www.who.int/foodsafety/en/>>. Acesso em: 15 dez. 2013.

YANG, J. W.; MAU, J. L.; KO, P. T.; HUANG, L. C. Antioxidant properties of fermented soybean broth. **Food Chem.** London. v. 71, n. 2, p. 249-254, November. 2000.

YANISHLIEVA, N. V. et al. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipid Science Technology**, Washington, v. 108, n. 9, p. 776-793, Sept. 2006.

YESIL, C. O.; et al. Antimicrobial activities of metanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**. London, v.100, n.1, p. 553-559, October. 2007.

YUAN, Z. M. et al. Comparing a nalysis of components in volatile oils of nutmeg and prepared nutmeg by GC-MS. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, China, v. 31, n. 9, p. 737-739, May 2006.

YUN, C. H. et al. Roles of human liver cytochrome P450 3A4 and 1A 2 enzymes in the oxidation of myristicin. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 137, n. 3, p. 143-150, Feb. 2003.

ZHANG, P. et al. An efficient drug delivery vehicle for botulism counters measure. **BMC Pharmacology**, Oxford, v. 9, p. 09-12, Oct. 2009.