



**LUARA APARECIDA SIMÕES**

**MISTURAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS  
COMPOSTOS MAJORITÁRIOS NA  
CONSERVAÇÃO DE APRESUNTADOS  
INOCULADOS COM *Clostridium sporogenes***

**LAVRAS – MG**

**2016**

**LUARA APARECIDA SIMÕES**

**MISTURAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS COMPOSTOS  
MAJORITÁRIOS NA CONSERVAÇÃO DE APRESUNTADOS  
INOCULADOS COM *Clostridium sporogenes***

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**

**2016**

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

Simões, Luara Aparecida.

Misturas de óleos essenciais e seus compostos majoritários na  
conservação de apresuntados inoculados com *Clostridium sporogenes* /  
Luara Aparecida Simões. – Lavras: UFLA, 2016.

108 p.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras,  
2016.

Orientador(a): Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. *Clostridium sporogenes*. 2. Aditivos naturais. 3. Produto cárneo. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**LUARA APARECIDA SIMÕES**

**MISTURAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS COMPOSTOS  
MAJORITÁRIOS NA CONSERVAÇÃO DE APRESUNTADOS  
INOCULADOS COM *Clostridium sporogenes***

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 23 de fevereiro de 2016.

Dr. Eduardo Mendes Ramos                      UFLA

Dra. Sandra Maria Oliveira Morais Veiga    UNIFAL

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2016**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de todo bem e misericórdia, por iluminar meus passos e me guiar sempre para o caminho do bem.

A minha mãe, Patrícia; meu pai, José Henrique e meus irmãos, Lucas e Luís Fellipe, por terem sempre sonhado comigo e me ensinado a nunca desistir diante das dificuldades.

A toda a minha família, por todo apoio e estímulo, não só neste momento, mas em toda a minha vida.

Ao Raul, por todo amor, carinho, amizade, companheirismo e apoio em toda essa jornada.

Às minhas companheiras de república, Carol, Mariane e Thuanny, por sempre torcerem por mim, pela amizade e carinho.

As minhas amigas de Maria da Fé, pela grande e velha amizade.

Aos amigos que fiz durante o mestrado, que foram meus grandes companheiros durante as disciplinas, em especial Amanda e Sérgio.

Aos meus amigos de Laboratório, em especial William, Silas, Rafael e Bruna. Sem eles não seria possível a realização deste projeto.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À professora Roberta Hilsdorf Piccoli, pela paciência, ensinamentos passados e pela contribuição para meu enriquecimento profissional.

Ao professor Eduardo Mendes Ramos, que contribuiu significativamente para a realização deste trabalho.

A todos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos que estiveram presente durante toda essa caminhada, sempre contribuindo de alguma forma.

À FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

**A todos que, embora não citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.**

*Ultrapassar barreiras e ir além, acreditar que é possível e alcançar.  
Não desistir jamais, vencer os desafios sempre.  
Você é bem mais capaz do que imagina.*

Cláudio M. Assunção

## RESUMO

O objetivo, neste trabalho, foi avaliar o efeito antimicrobiano *in vitro* de diferentes combinações de óleos essenciais de canela, cravo-da-índia e orégano, bem como seus respectivos compostos majoritários, cinamaldeído, eugenol e carvacrol, sobre células vegetativas de *Clostridium sporogenes* inoculadas em apresuntados. Avaliou-se o efeito desses compostos sobre a concentração de nitrito residual, pH, oxidação lipídica, atividade de água e cor dos apresuntados elaborados. A determinação da concentração mínima bactericida (CMB) foi realizada utilizando-se o método de diluição em caldo. As análises microbiológicas foram realizadas após 24 horas, aos 7, 21, 14 e 28 dias de armazenamento em que os apresuntados foram armazenadas a 7 °C e a 14°C. Já para as análises físico-químicas, os apresuntados foram armazenados a 4 °C e analisados após 24 horas e 30 dias de processamento. O óleo essencial de canela e seu composto majoritário cinamaldeído foram os mais eficientes para a inibição das células vegetativas do *C. sporogenes*, apresentando menor CMB. Em relação à contagem de células, as maiores contagens de *C. sporogenes* foram para o controle contendo 75 ppm de nitrito (TRAT2). Houve uma queda no crescimento da bactéria em relação ao tempo nos tratamentos contendo óleos e compostos, com redução de, aproximadamente, 3 ciclos log. Durante 14 dias de armazenamento, não houve a presença de esporos nos tratamentos com óleos essenciais e compostos, apresentando menores médias do número de esporos. A redução de nitrito residual foi de, aproximadamente, 54% para o TRAT 1 e de 32% a 39% para os demais. Em relação à cor, todos os tratamentos apresentaram um aumento de luminosidade, índice a\*, índice b\* e saturação C\*; somente a tonalidade (h\*) diminuiu ao longo do armazenamento, apenas para o parâmetro b\* e, para a tonalidade h\*, houve diferença significativa entre os tratamentos. Os tratamentos contendo óleos essenciais e compostos majoritários apresentaram maior oxidação lipídica, quando comparados com os controles. O pH de todos os apresuntados não se diferenciaram estatisticamente. Ao final do armazenamento, houve um aumento na atividade de água de todos os tratamentos. Portanto, tem-se que os apresuntados adicionados de óleos essenciais e compostos majoritários foram eficientes para diminuir significativamente o número de células vegetativas de *C. sporogenes* ao longo de 28 dias de armazenamento e atrasaram a esporulação do microrganismo, havendo alterações mínimas somente na cor do apresuntado. Assim, os óleos essenciais e os compostos majoritários podem ter grande aplicabilidade como conservantes naturais em apresuntados.

Palavras-chave: *Clostridium sporogenes*. Aditivos naturais. Produto cárneo.



## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the in vitro antimicrobial effect of different combinations of essential oils of cinnamon, clove and oregano, as well as their compounds majority cinnamaldehyde, eugenol and carvacrol on *Clostridium sporogenes* vegetative cells inoculated into pressed hams. It was evaluated the effect of these compounds on the residual nitrite concentration, pH, lipid oxidation, color and water activity of the prepared pressed hams. The determination of the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was performed using the broth dilution method. Microbiological analyzes were performed after 24 hours; 7, 21, 14 and 28 days of storage, the pressed ham were stored at 7° and 14° C, while for the physical-chemical analysis the pressed ham were stored at 4° C and analyzed after 24 hours and 30 days of processing. The essential oil of cinnamon and its major compound cinnamaldehyde were the most efficient for the inhibition of vegetative cells of *C. sporogenes*, presenting lower CMB. Regarding the cell counting, the highest value of *C. sporogenes* were for the control containing 75 ppm nitrite (TRAT2). There was a diminishing in the bacterial growth over time in the treatments containing oils and compounds with a reduction of approximately 3 log cycles. During 14 days of storage, it was not registered presence of spores in the treatments with essential oils and compounds, resulting in lower average number of spores. The reduction of residual nitrite was approximately 54% for TRAT 1, and 32-39% for others. Regarding color, all treatments showed an increase in luminosity, index a \*, index b \* and C\* saturation. Just the hue (h \*) decreased during storage, only for the parameter b \* and hue h \* there was significant difference between treatments. Treatments containing essential oils and majority compound had a higher lipid oxidation compared with controls. The pH of all pressed ham did not differ statistically. At the end of storage, there was an increase in water activity for all treatments. Therefore, we can conclude that the pressed ham added with essential oils and majority compounds were effective in reducing significantly the number of vegetative cells of *C. sporogenes* over 28 days of storage. The organism sporulation was delayed showing only minimal changes in the color of the pressed ham. In conclusion, the essential oils and major compounds may have great applicability as a natural preservative in pressed ham.

Keywords: *Clostridium sporogenes*. Natural additives. Meat product.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reações de formação de nitrosamina no estômago .....	20
Figura 2	Mecanismo de autoxidação, segundo Ramalho e Jorge (2006).....	32
Figura 3	Mecanismo de ação para os antioxidantes primários; creditado a óleos essenciais e seus componentes. Radicais livres: ROO* e R*; antioxidante com átomo de hidrogênio ativo: AH e radical inerte (A*).....	33
Figura 4	Fluxograma geral do processamento de apresuntado .....	50
Figura 5	Pesos da análise de componente principais (PCA) das diferentes combinações dos óleos essenciais de canela e orégano, e os compostos cinamaldeído e carvacrol sobre células vegetativas de <i>Clostridium sporogenes</i> .....	61
Figura 6	Contagem de células vegetativas (Log UFC/g) de <i>Clostridium sporogenes</i> em apresuntados armazenados por 28 dias.....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparativo entre cepas proteolíticas de <i>Clostridium botulinum</i> e do <i>Clostridium sporogenes</i> .....17
Tabela 2	Características de identidade e qualidade de apresuntados (Instrução Normativa n° 20, de 31/07/2000) .....42
Tabela 3	Composição óleos essenciais de canela, cravo-da-índia e orégano .....44
Tabela 4	Teores dos óleos essenciais e compostos majoritários aplicados de acordo com o delineamento experimental.....47
Tabela 5	Quantidade de nitrito, óleos essenciais e compostos majoritários dos quatro tratamentos de apresuntados .....48
Tabela 6	Formulação dos apresuntados utilizados no experimento .....49
Tabela 7	Valores da concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais e compostos majoritários sobre <i>Clostridium sporogenes</i> .....56
Tabela 8	Ação de diferentes combinações de óleos essenciais sobre esporos de <i>C. perfringens</i> .....60
Tabela 9	Coefficientes de regressão e p-valor para a contagem de células vegetativas de <i>Clostridium sporogenes</i> frente às diferentes combinações dos óleos essenciais e compostos majoritários .....62
Tabela 10	Contagem do número de esporos (UFC/g) de <i>Clostridium sporogenes</i> em apresuntados armazenados por 28 dias .....70
Tabela 11	Contagem do número de esporos (UFC/g) de <i>Clostridium sporogenes</i> em apresuntados armazenados a 7 e a 14 °C .....71
Tabela 12	Nitrito residual em apresuntados adicionados de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais e compostos majoritários .....73
Tabela 13	Valores do índice de TBARs (mg MA/kg) em apresuntados adicionados de óleos essenciais e compostos majoritários armazenados durante 30 dias .....78
Tabela 14	Valores de índice amarelo (b*) em apresuntados adicionados de óleos essenciais e compostos majoritários armazenados durante 30 dias .....83
Tabela 15	Valores do índice de tonalidade (h*) em apresuntados adicionados de óleos essenciais e compostos majoritários armazenados durante 30 dias .....85
Tabela 16	Valores da diferença global ( $\Delta E^*$ ) entre os tratamentos, quando comparados com o controle em apresuntados adicionados de óleos essenciais e compostos majoritários .....87

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1	<i>Clostridium sporogenes</i> .....	15
2.2	Nitrato e nitrito .....	17
2.3	Óleos essenciais .....	22
2.3.1	Óleos essenciais em alimentos .....	25
2.3.2	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais .....	27
2.3.3	Atividade antioxidante dos óleos essenciais .....	30
2.4	Descrição botânica dos óleos essenciais .....	34
2.4.1	Óleo essencial de canela ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ) .....	34
2.4.2	Óleo essencial de cravo-da-índia ( <i>Syzygium aromaticum</i> ) .....	36
2.4.3	Óleo essencial de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> L.) .....	39
2.5	Matriz alimentar: apresuntado .....	40
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	43
3.1	Óleos essenciais e compostos majoritários .....	43
3.2	Microrganismo, cultura estoque e padronização do inóculo .....	44
3.3	Determinação da concentração mínima bactericida dos óleos essenciais e compostos majoritários e de suas combinações .....	45
3.4	Elaboração do apresuntado e preparo das amostras .....	47
3.5	Contagem de células vegetativas e esporos de <i>C. sporogenes</i> inoculados em apresuntados .....	51
3.6	Análises físico-químicas .....	52
3.6.1	Concentração de nitrito residual .....	52
3.6.2	pH .....	53
3.6.3	Oxidação lipídica (índice de TBARS) .....	53
3.6.4	Atividade de água .....	54
3.6.5	Cor objetiva .....	54
3.7	Análises estatísticas .....	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
4.1	Concentração mínima bactericida dos óleos essenciais e compostos majoritários .....	56
4.2	Concentração mínima bactericida da combinação de óleos essenciais e compostos majoritários .....	58
4.3	Contagem de células vegetativas de <i>C. sporogenes</i> em apresuntados .....	64
4.4	Contagem de esporos de <i>C. sporogenes</i> em apresuntados .....	69
4.5	Nitrito residual .....	73
4.6	pH .....	77

<b>4.7</b>	<b>Oxidação lipídica (índice de TBARs)</b> .....	<b>77</b>
<b>4.8</b>	<b>Atividade de água</b> .....	<b>80</b>
<b>4.9</b>	<b>Cor</b> .....	<b>81</b>
<b>4.9.1</b>	<b>Luminosidade (L*), índice vermelho (a*), índice amarelo (b*)</b> .....	<b>81</b>
<b>4.9.2</b>	<b>Índice de saturação (C*)</b> .....	<b>84</b>
<b>4.9.3</b>	<b>Ângulo de tonalidade</b> .....	<b>84</b>
<b>4.9.4</b>	<b>Diferença global</b> .....	<b>86</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>89</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os conservantes químicos sintéticos são adicionados, durante a fabricação de alimentos, para estender a vida útil de produtos pela inibição ou a prevenção do crescimento de microrganismos. Porém, esses aditivos alimentares não estão isentos de riscos e, com frequência, estão associados a riscos toxicológicos. Portanto, a utilização de conservantes naturais vem se tornando cada vez mais promissora. Como consequência, os óleos essenciais de plantas com atividades antimicrobiana e antioxidante tornaram-se alvos de grande interesse e têm sido considerados como uma alternativa aos conservantes químicos sintéticos.

O nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) e o nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) são conservantes sintéticos empregados em soluções de cura para carnes para estabilizar a cor vermelha, prevenir alterações desagradáveis provenientes da oxidação lipídica e inibir microrganismos deteriorantes e aqueles que produzem toxinas como o microrganismo *Clostridium botulinum*. No entanto, a presença de nitrito em produtos cárneos cozidos apresenta grande risco para a saúde dos consumidores, devido à formação de nitrosaminas, substância considerada carcinogênica.

Dentre os produtos cárneos nos quais se empregam nitratos e nitritos, tem-se o apresuntado. Trata-se de um produto cárneo cozido pronto para o consumo, sendo, portanto, consumido sem nenhum tratamento térmico pós-processamento.

Em relação ao consumo de apresuntados, as preocupações de segurança podem existir pelo fato de esse produto apresentar condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos, como o *Clostridium sporogenes*, um bacilo gram-positivo que se desenvolve em meio anaeróbio, produtor de endósporos, e que apresenta similaridade genética com cepas proteolíticas do *C. botulinum*.

Os óleos essenciais são produzidos no metabolismo secundário das plantas e a composição de cada óleo essencial varia de acordo com a espécie e o estágio de desenvolvimento da planta, além de fatores ambientais. Os óleos essenciais, geralmente, têm derivados de fenilpropanoides (principais responsáveis pelas propriedades antibacterianas dos óleos essenciais) ou de terpenoides (predominantes). Frequentemente, é normal que pelo menos um desses compostos seja o majoritário, sendo os outros presentes em menores teores ou em baixíssimas quantidades (traços).

A aplicação prática dos óleos essenciais em alimentos encontra algumas restrições, pois a adição deles em altas concentrações gera mudanças indesejadas na parte sensorial dos alimentos. Uma alternativa para esse problema pode estar associada à combinação de óleos essenciais, minimizando o efeito sensorial causado. Um óleo essencial que não apresenta relevante ação antimicrobiana, quando associado a outro óleo de maior poder antisséptico, pode potencializá-lo, tornando-o um interessante agente antimicrobiano natural, tornando possível que a indústria de alimentos o empregue em escalas seguras e efetivas.

O objetivo, neste, trabalho foi verificar a atividade antibacteriana de diferentes óleos essenciais e compostos majoritários sobre *Clostridium sporogenes* em apresuntados. Buscou-se, ainda, determinar a concentração mínima bactericida (CMB) *in vitro* dos óleos essenciais e seus compostos majoritários, e das combinações entre eles, além de avaliar o efeito dessas combinações sobre *Clostridium sporogenes* inoculados em apresuntado e avaliar este produto em relação à concentração de nitrito residual, pH, oxidação lipídica, atividade de água e cor.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Clostridium sporogenes*

*Clostridium sporogenes* são bacilos gram-positivos anaeróbios que produzem esporos e motilidade flagelar, apresentando similaridade genética com cepas proteolíticas do *C. botulinum*. Este microrganismo é amplamente aplicado como substituto da forma proteolítica da bactéria *Clostridium botulinum*, sendo utilizado como modelo de pesquisa, garantindo a segurança laboratorial, pois, quando se comparam esses dois microrganismos, tem-se que o *C. sporogenes* não produz neurotoxinas evidenciadas nas estirpes de *C. botulinum*. Além dessa diferença, a substituição do *C. botulinum* pelo *C. sporogenes* apresenta algumas outras vantagens, como a fácil detecção por meio do odor ou da formação de gás. O *C. sporogenes* tem resistência térmica um pouco acima da do *C. botulinum*, o que o caracteriza como um bom substituto para validar processos térmicos e, além disso, há uma relativa facilidade para que culturas de esporos com alta resistência térmica sejam produzidas (BROWN; TRAN-DINH; CHAPMAN, 2012).

O microrganismo *C. sporogenes* pode ser encontrado em uma variedade de lugares, incluindo solo, sedimento de ambos os ambientes marinhos e de água doce, carnes, produtos lácteos, matéria fecal, veneno de cobra e infecções em animais domésticos e seres humanos. O *C. sporogenes* é fenotipicamente semelhante a outros membros de seu gênero, como o *C. difficile* e *C. Botulinum*. Porém, por faltar-lhe a capacidade de produzir a neurotoxina botulínica, que causa a doença humana, o microrganismo *C. sporogenes* é classificado como um nível de biossegurança I, organismo inofensivo, pela *American Type Culture Collection* (KUBIAK et al., 2015).



A parede celular do *C. sporogenes* é constituída por uma camada espessa de peptidoglicano, um polímero de aminoácidos e açúcar; outros componentes ancorados na parede celular, tais como o ácido teicoico e proteínas, sobressaem-se fora da camada de peptidoglicano, dando uma superfície rígida à célula (VOLLMER; HÖLTJE, 2004).

*C. sporogenes* exibem motilidade por meio de flagelos, característica que favorece um papel importante na reação da bactéria frente a estímulos. As membranas celulares contendo os receptores detectam os estímulos que causam a ativação dos flagelos; se o estímulo é sentido como benéfico, os flagelos movimentam-se na direção dos estímulos (e vice-versa) (BERGEY et al., 2009).

Como outros membros do gênero, os *Clostridium sporogenes* produzem endósporos como um mecanismo para sobreviver a condições ambientais desfavoráveis, tornando, assim, a bactéria de difícil eliminação (BRUNT et al., 2014).

Os esporos do *Clostridium botulinum* são as formas mais resistentes que têm sido encontrados entre os agentes bacterianos, podendo sobreviver por mais de 30 anos em meio líquido e, provavelmente, mais tempo ainda em estado seco, chegando a tolerar temperaturas de 100 °C por horas (RADOSTITS et al., 2002).

Algumas cepas do *C. sporogenes* são capazes de produzir substâncias como a bacteriocina, que pode inibir outras estirpes *C. Sporogenes* (BETZ; KENNETH; ANDERSON, 1964). Na microflora intestinal do ser humano, este microrganismo converte o triptofano em indol e, subsequentemente, o ácido indole-3-propiónico (IPA), um potente antioxidante no corpo humano (KARBOWNIK et al., 2001).

Como os *C. sporogenes* são anaeróbios obrigatórios, eles não podem utilizar nem sobreviver na presença de oxigênio; essa bactéria obtém energia por meio da fermentação de aminoácidos. A fermentação da glicose, resultando em

etanol e dióxido de carbono, pode ser utilizada como uma fonte secundária de nutrição (BERGEY et al., 2009).

No trabalho de Cui, Gabriel e Nakano (2011), os efeitos das frações de 12 extratos de plantas solúveis em etanol foram testados para sensibilização do calor sobre os esporos de *Clostridium botulinum* (tipo A e tipo B) e *Clostridium sporogenes* PA 3679, verificando-se que não ocorreram grandes diferenças nos resultados, podendo, então, o *C. sporogenes* PA 3679 substituir adequadamente o *C. botulinum* em modelos de pesquisa.

Na Tabela 1 podem-se observar algumas comparações das cepas proteolíticas de *Clostridium botulinum* e do *Clostridium sporogenes*.

Tabela 1 Comparativo entre cepas proteolíticas de *Clostridium botulinum* e do *Clostridium sporogenes*

<b>Fatores</b>	<b><i>C. botulinum</i></b>	<b><i>C. sporogenes</i></b>
Produção de neurotoxinas	Sim	Não
Temperatura ótima de crescimento (°C)	37	37
pH mínimo de crescimento	4,6	4,6
Concentração inibitória de NaCl	>10%	>10%
Atividade de água mínima	0,94	0,94
Produção de esporos	Baixa	Alta
Resistência térmica dos esporos D121°C	0,1-0,2 min	1,2-2,5 min

Brown, Tran-Dinh e Chapman (2012) e Smith (1980)

## 2.2 Nitrato e nitrito

Os nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e os nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) são compostos iônicos encontrados na natureza, fazendo parte do ciclo de azoto. O nitrato é a forma mais estável, em relação às estruturas oxigenadas do nitrogênio. Mesmo apresentando relativa estabilidade química, o nitrito é facilmente oxidado por

processos biológicos ou químicos a nitrato ou a redução origina outros diversos compostos (KHATOUNIAN, 2001).

Há séculos têm-se utilizado sais de nitrito e nitrato de sódio ou potássio em embutidos cárneos. A adição de nitrito em produtos curados apresenta três finalidades básicas: funciona como agente estabilizante da cor vermelha ou rósea, conferindo sabor, aroma e textura (melhoria das características sensoriais), características dos produtos curados; atuam como antioxidante e inibem o desenvolvimento de microrganismos (CASSENS, 1997; ROÇA, 2005), como os do gênero *Clostridium* e sua produção de toxinas (SILVA, 1999).

Conforme descrito por Muller (1991), as concentrações residuais de nitrito necessárias para que ocorram diversos efeitos nos produtos cárneos variam de 30 a 50 ppm, para desenvolvimento de cor; de 20 a 40 ppm, para desenvolvimento de aroma e de 80 a 150ppm, para o efeito conservante. Lucke (2000) relata que, para efeito antioxidante, são necessárias concentrações entre 20 a 50 ppm de nitrito, sendo esses valores dependentes do tipo de produto cárneo. Hill (1996) ressalta que a atuação antimicrobiana do nitrito sobre diversos microrganismos depende das condições em que o sistema cárneo se apresenta como a composição química (incluindo os aditivos como fosfatos, sal, e outros agentes antimicrobianos), o pH, a temperatura de armazenamento do produto e o potencial redox (Eh). Para produtos que contêm baixo conteúdo de sal e há a pretensão de que este produto tenha vida útil prolongada, seria necessária a adição entre 50 e 150 ppm de nitrito para inibir o crescimento de *C. botulinum* (VARNAM; SUTHERLAND, 1995).

A maioria do nitrito presente nos produtos cárneos está ligada aos componentes da carne, como a mioglobina, os lipídios e as proteínas, ou na forma de óxido nítrico. Porém, porcentagem significativa (aproximadamente 25%) do nitrito de sódio pode ser detectada nos produtos curados como nitrito residual, dependendo das condições de armazenamento (HONIKEL, 2008).

O nitrato é reduzido a nitrito, nos produtos cárneos, por bactérias que, geralmente, fazem parte da microbiota da carne; o nitrito, por sua vez, é reduzido a óxido nítrico (NO), composto que reage com o principal pigmento da carne a mioglobina, formando a nitrosomioglobina e conferindo a coloração típica da carne curada. Já o óxido nítrico ligado à porção heme presente na carne a torna indisponível para oxidação típica, retardando a rancidez (GREVER; RUITER, 2001; ZADARNI; DAZZI; CHIZZOLINI, 2002).

Apesar do benefício do nitrato e do nitrito em produtos cárneos curados, há grande preocupação devido à formação de compostos com propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas (HECHT, 1997; PEGG; SHAHIDI, 2000; SAWAMURA et al., 2005).

A manipulação e o uso de nitrito devem ser bastante cuidadosos, pois o uso indiscriminado pode trazer riscos à saúde. Quando ingerido em doses acima das permitidas, o nitrito é considerado tóxico (LE MOS; YAMADA; HAGUIWARA, 2008). A ingestão diária aceitável (IDA) para o nitrito, estabelecida de acordo com o Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares o JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives), é de 0-0,06 mg/kg de peso corpóreo, e, para o nitrato, é de 0-3,7 mg/kg de peso corpóreo. Ambos não devem ser consumidos por crianças com menos de 3 meses de idade (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2013).

A Legislação Brasileira permite o uso de nitrato de sódio ou potássio, associado ou não a nitrito de sódio ou potássio, com um limite máximo de 30 mg/100 g de produtos cárneos curados, exceto charque, expressos em íon nitrito. Já para o nitrito de sódio ou potássio, usado isoladamente ou combinado, o limite máximo permitido é de 15 mg/100 g de produto para produtos cárneos curados, exceto charque e alimentos infantis, expresso em íon nitrito (BRASIL, 1998). A presença de meta-hemoglobina é uma das razões para que a quantidade

de nitrito ingerido seja controlada, principalmente por crianças, pois esta reação impede que a hemoglobina exerça sua função normal de transportar oxigênio para os tecidos. Em doses baixas, os sintomas são enrubescimento da face e extremidades, desconforto gastrointestinal e dor de cabeça. Em doses mais elevadas, observam-se cianose, náusea, vômitos e dores abdominais, podendo, inclusive, levar a óbito (MÍDIO; MARTINS, 2000; SGARBIERI, 1987).

Nitrato e nitrito são produtos de oxidação e fontes de agentes nitrosantes, dos quais os mais importantes são o óxido nítrico (NO) e o ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>), pois participam na formação de nitrosaminas. Os agentes nitrosantes reagem rapidamente com superóxido para formar peróxido de nitrito (ONOO<sup>-</sup>), o qual é altamente reativo e responsável pelos efeitos celulares adversos no câncer (CHOW; HONG, 2002). Na Figura 1 é possível observar a formação de nitrosamina no estômago; o ácido nitroso, a partir de nitrito de sódio, reage com a amina secundária oriunda da dieta, resultando em nitrosamina.

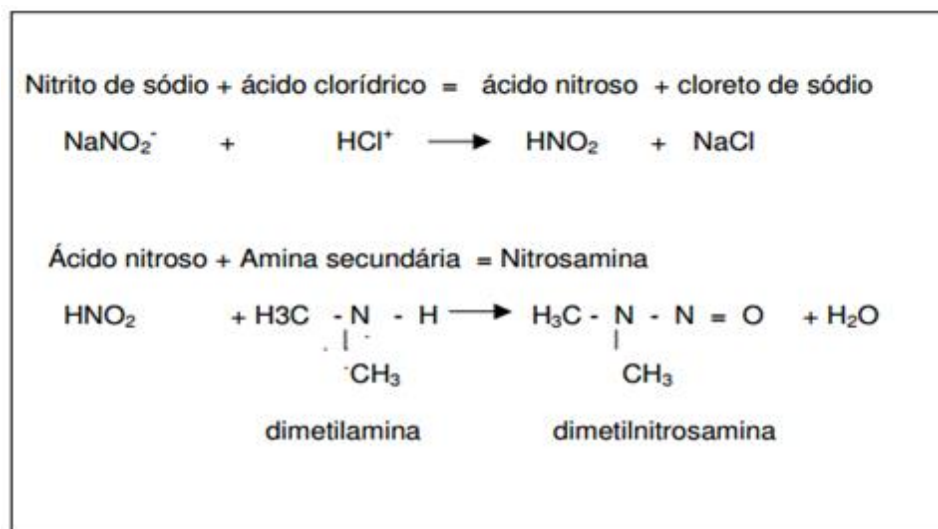


Figura 1 Reações de formação de nitrosamina no estômago

Os compostos N-nitrosos e, em particular, as N-nitrosaminas são potentes mutagênicos, além de apresentarem ação teratogênica e carcinogênica em animais de laboratório. As N-nitrosaminas podem ser formadas durante o processamento de alimentos, bem como, *in vivo*, no trato gastrintestinal, pela nitrosação de amins secundárias, as quais estão associadas com alto risco de câncer gástrico, hepático e de esôfago. De modo geral, os alimentos crus, tais como vegetais, carnes, peixes, frutas, cereais e produtos lácteos, contêm baixos teores de N-nitrosaminas. No entanto, o processo de cura, em que se adicionam nitrito e/ou nitrato, favorece consideravelmente o aumento do nível de nitrosaminas (ANDRADE, 2004; SINDELAR; MILKOWSKI, 2011).

Em estudos realizados pela comunidade científica concluiu-se que apenas 5% da ingestão média de nitritos e de nitratos provém do consumo de produtos cárneos curados (PENNINGTON, 1998; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2010). O nitrato provém do consumo de algumas plantas, como espinafre, couve, cenoura, cereais e rabanete, devido ao uso de fertilizantes azotados empregados na agricultura para o seu cultivo. O nitrito provém, principalmente, da ingestão de produtos cárneos curados e de peixes defumados. Também o nitrito e o nitrato podem ser provenientes do consumo de água contaminada por fertilizantes (WHO, 2003).

A Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), por meio da Portaria nº 240, de 26 de outubro de 2015, divulgou a notícia de que comer carne processada, como salsichas, hambúrgueres e bacon, aumenta o risco de câncer. O documento conclui que este tipo de alimento é “carcinogênico para os humanos” e o inclui no grupo de substâncias mais perigosas para a saúde, junto com o cigarro, o plutônio e o ar contaminado, entre outros mais de cem compostos analisados anteriormente. Em um relatório publicado, aquela organização também considera que a carne vermelha (vaca, porco, cavalo, cordeiro, cabra) é “provavelmente

carcinogênica”. Um grupo de 22 cientistas de dez países da Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer (IARC, em inglês), que integra a agência de saúde das Nações Unidas, foi encarregado de revisar os estudos científicos publicados sobre o tema (BRASIL, 2015).

O mecanismo de ação do nitrito sobre os microrganismos ainda não está bem elucidado. Acredita-se que o nitrito inibe o crescimento do *C. botulinum*, pois o mesmo interfere nas enzimas ferro-enxofre, como a ferredoxina, impedindo a síntese da adenosina trifosfato (ATP) a partir do piruvato. Woods, Wood e Gibbs (1981) demonstraram que o sistema fosforoclástico do *C. botulinum* e do *C. sporogenes* é inibido com óxido nítrico, devido à acumulação de ácido pirúvico no meio (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). A reação fosforoclástica envolve a quebra do piruvato com fosfato inorgânico e coenzima-A, produzindo acetilfosfato. Em presença de adenosina difosfato (ADP) se sintetiza o ATP a partir do acetilfosfato. Durante a quebra do piruvato, primeiro os elétrons se transferem para ferredoxina e, em seguida, para o íon H, para formar o H<sub>2</sub> em uma reação catalisada pela enzima hidrogenase. As enzimas ferredoxina e hidrogenase são proteínas não heme que contêm complexos ferro-enxofre.

### 2.3 Óleos essenciais

Óleos essenciais constituem complexas misturas de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas (SIMÕES; SPITZER 1999), cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, etc., em diferentes concentrações, nos quais, normalmente, um composto farmacologicamente ativo é majoritário (SIMÕES et al., 2007).

De acordo com Oussalah et al. (2007), os óleos essenciais são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, variando a intensidade e a

composição de acordo com a espécie, fatores ambientais e o estágio de desenvolvimento da planta.

Os metabólitos secundários apresentam várias atividades biológicas e muitas são de importância comercial, tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica e de perfumaria, entre outras. Entre os metabólitos secundários, os principais grupos de compostos encontrados com atividade biológica são alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (SIMÕES et al., 2007).

Segundo Conner (1993), os óleos essenciais têm servido como agentes aromatizantes em alimentos e bebidas, e, devido ao seu teor versátil de compostos antimicrobianos, têm potencial como agentes naturais para a conservação de alimentos.

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

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente e, geralmente, é específica para determinado órgão e característica para seu estágio de desenvolvimento (SALGADO, 2005). As condições ambientais são capazes de causar variações de grande significância, como a influência do ciclo vegetativo, em que pode ocorrer a variação da concentração de cada um dos constituintes durante o desenvolvimento do vegetal. O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e os tipos de cultivo também influenciam os óleos essenciais em relação à sua composição química. A temperatura, a insolação, a umidade relativa e o regime de ventos exercem influência direta, sobretudo sobre as espécies que têm estruturas histológicas de estocagem de óleo essencial na superfície.



Os constituintes químicos dos óleos essenciais estão distribuídos em duas classes químicas distintas: terpenoides e fenilpropanoides. Os terpenoides são mais frequentes e produzidos com maior quantidade, enquanto os fenilpropanoides são indispensáveis para características flavorizantes e odorizantes (SANGWAN et al., 2001).

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

Os componentes majoritários são aqueles que estão presentes no óleo essencial em altas concentrações, de 20% a 70%. Geralmente, são dois ou três componentes do óleo. Também existem outras substâncias que contribuem para a composição dos óleos, mas são encontradas em menores quantidades (BAKKALI et al., 2008).

Esses compostos têm propriedades biológicas e podem ser utilizados para a síntese de novos medicamentos ou, mesmo, ser utilizados como substitutos de princípios ativos sintéticos, como os antibióticos, no intuito de reduzir a resistência microbiana (AHMAD; BEG, 2001).

A composição e a concentração dos componentes dos óleos essenciais de plantas de mesma espécie podem variar devido a fatores ecológicos e a condições edafoclimáticas (YIN, 1991). Assim, essas diferenças químicas

existentes entre os óleos essenciais podem refletir diretamente nas propriedades funcionais, como a atividade antimicrobiana e antioxidante.

### **2.3.1 Óleos essenciais em alimentos**

Os conservantes alimentares são quaisquer substâncias ou misturas de substâncias adicionadas ao alimento com o objetivo de preservá-lo, em concentrações controladas, que não façam parte da composição do alimento. Os conservantes podem ser adicionados aos alimentos durante as etapas de produção, processamento, tratamento, embalagem, transporte e armazenamento (MPOUNTOUKAS et al., 2008).

Seguindo a tendência de mercado, a legislação de alimentos tem progressivamente restringido ou limitado o uso de alguns conservantes químicos em diferentes alimentos. Desse modo, esta restrição tem causado problemas para a indústria de alimentos, pois a susceptibilidade de alguns microrganismos frente a certos antimicrobianos sintéticos clássicos tem diminuído (LEUSCHNER; ZAMPARINI, 2002). O uso descontrolado de antimicrobianos sintéticos tem sido responsável pelo surgimento de cepas microbianas progressivamente mais resistentes a diferentes compostos antimicrobianos (SOUZA, 2006).

Os óleos essenciais têm sido muito utilizados no preparo de alimentos em virtude do sabor e aroma diferenciado, proporcionando o aumento da vida útil do produto, inibindo o crescimento de microrganismo indesejável e a consequente deterioração dos alimentos. Eles têm atividade antibacteriana e antifúngica, sendo extraídos de plantas aromáticas e medicinais (TRAJANO; SANTOS, 2009).

A utilização de óleos essenciais como aromatizantes naturais há muito é explorada pela indústria de alimentos, porém, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e a busca por alternativas naturais para combater os

microrganismos deterioradores e patogênicos têm assumido papel relevante no emprego dessas substâncias (DORMAN; DEANS, 2000; ELGAYYAR et al., 2001).

Alguns estudos reportam que a atividade antibacteriana dos óleos essenciais é derivada dos compostos terpenoides e fenólicos presentes nesses óleos. Em geral, maiores quantidades de óleos essenciais são necessárias em alimentos, quando comparadas às quantidades utilizadas em meios de cultura em laboratório. Portanto, a aplicação prática dos óleos essenciais é restrita, já que a adição de altas concentrações de óleos essenciais gera mudanças indesejadas na parte sensorial dos alimentos (YAMAZAKI et al., 2004).

Uma alternativa para esse problema pode estar associada à combinação de óleos essenciais, minimizando o efeito sensorial causado. Um óleo essencial que não apresenta relevante ação antimicrobiana, quando associado a outro óleo de maior poder antisséptico, pode potencializá-lo, tornando-o um interessante agente antimicrobiano natural e proporcionando à indústria de alimentos o seu emprego em escalas seguras e efetivas (ULTEE et al., 2000).

Os óleos essenciais, como agentes antimicrobianos, apresentam, como principais características, a sua origem natural e o fato de serem considerados como sendo de baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana frente à sua ação. A segunda característica citada toma como base o fato de que os óleos essenciais são compostos por misturas de componentes que, aparentemente, apresentam diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana, e, dessa forma, tornam mais difícil a adaptabilidade dos microrganismos (DAFERERA et al., 2000).

Diversos autores têm estudado a atividade antimicrobiana dos condimentos e/ou especiarias, assim como de seus óleos essenciais, que progressivamente têm sido adicionados aos alimentos como aromatizantes (CHAO; YOUNG, 2000; MENDONÇA, 2004; SOUZA et al., 2005). Entretanto,

os componentes das matrizes alimentares podem, possivelmente, interagir com os princípios ativos destes potenciais compostos antimicrobianos, resultando em moderada a não significativa a eficácia do antimicrobiano (MENON; GARG, 2001).

Alguns componentes dos óleos essenciais têm sido registrados pela Comissão Europeia para utilização como aromatizante em gêneros alimentícios. Esses óleos caracterizam-se por não apresentarem qualquer risco à saúde do consumidor e incluem carvacrol, carvona, cinamaldeído, citrato, p-cimeno, eugenol, mentol e timol (THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1999).

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

### **2.3.2 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais**

Os agentes antimicrobianos, incluindo conservantes alimentares e ácidos orgânicos, têm sido utilizados para inibir as bactérias nos alimentos e estender a vida útil dos alimentos processados. Muitos compostos que ocorrem naturalmente em plantas comestíveis e medicinais, ervas e especiarias, como os óleos essenciais, demonstraram possuir funções antimicrobianas contra agentes patógenos dos alimentos (DEANS; RITCHIE, 1987; JANSSEN et al., 1985).

Os componentes fenólicos são os principais responsáveis pelas propriedades antibacterianas dos óleos essenciais (COSENTINO et al., 1999).

Estas propriedades são de grande interesse, pois consistem em alternativa para a não utilização ou a redução de aditivos químicos nos alimentos. Nos últimos anos, relata-se que alguns óleos essenciais foram capazes de aumentar a vida útil de alimentos processados, devido à inibição bacteriana (KIM et al., 1995; SMITH-PALMER et al., 1998).

Considerando a variabilidade de grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, observa-se que sua atividade antibacteriana não é atribuída somente a um mecanismo específico, havendo vários alvos na célula microbiana (CARSON; MEE; RILEY, 2002).

Dorman e Deans (2000) descrevem o mecanismo de ação dos óleos essenciais. Acredita-se que a maioria deles exerça efeito antimicrobiano na estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas. Alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática para íons de hidrogênio e potássio, causando a interrupção dos processos vitais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações que dependem de enzimas, o que resulta em perda do controle quimiosmótico da célula afetada, levando à morte bacteriana.

Mecanismos específicos de ação bactericida dos componentes majoritários, como o timol e carvacrol, permanecem, no entanto, mal caracterizados. As propriedades antibacterianas desses compostos são, evidentemente, associadas ao seu caráter lipofílico, levando ao acúmulo em membranas e eventos adversos associados à membrana subsequentes, tais como esgotamento de energia (CONNER, 1993; SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995).

Segundo Dorman e Deans (2000), a menor ou a maior atividade inibitória dos óleos essenciais sobre bactérias gram-negativas ou gram-positivas podem estar relacionadas com a eficácia de cada componente em particular presentes no óleo essencial em diferentes microrganismos, em vez da estrutura da célula dos microrganismos.

Conforme descrito por Nikaido (1996), todas as bactérias gram-negativas têm uma membrana externa que proporciona à bactéria uma superfície hidrofílica, devido à presença de moléculas de lipopolissacarídeo (LPS). Pequenos solutos hidrofílicos são capazes de atravessar a membrana externa, através de proteínas abundantes distribuídas nessa membrana denominadas porinas, que proporcionam canais transmembranares, enquanto a membrana externa serve como uma barreira para a penetração de macromoléculas e de compostos hidrofóbicos. É por esta razão que as bactérias gram-negativas são relativamente resistentes aos antibióticos e a drogas tóxicas hidrofóbicas, sendo menos sensíveis à ação dos óleos essenciais, provavelmente devido à presença da membrana externa que envolve a parede celular (NIKAIDO, 1996; NIKAIDO; VAARA, 1985; RATLEDGE; WILKINSON, 1988).

Segundo uma pesquisa desenvolvida por Nevas et al. (2004), com 13 óleos essenciais testados contra 12 espécies de bactérias patogênicas e/ou deterioradoras, as bactérias gram-positivas apresentaram-se mais sensíveis aos óleos. Dentre as gram-positivas testadas, *C. butulinum* tipos B e E e *Clostridium perfringens* se apresentaram mais sensíveis.

Várias investigações científicas estão sendo realizadas com o objetivo de confirmar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Assim têm sido desenvolvidos métodos de investigação *in vitro*, contudo, essa tarefa encontra dificuldades devido às peculiaridades que os óleos essenciais apresentam, como volatilidade, insolubilidade em água e complexidade, características que interferem significativamente nos resultados. Por isso, em testes de susceptibilidade microbiana, deve-se levar em consideração a técnica utilizada, o microrganismo estudado, o meio de cultura e o óleo essencial testado (ALMEIDA et al., 2006; ARRUDA et al., 2006; BENKEBLIA, 2004; CLAFFEY, 2003; NUNES et al., 2006; REHDER et al., 2004; SEYMOUR, 2003).

De acordo com Burt (2004), sabe-se que a potência antimicrobiana dos óleos essenciais em sistemas alimentares, geralmente, é reduzida, comparada às obtidas em trabalho *in vitro*, pois, nos alimentos, a presença de gorduras, carboidratos, proteínas e sais minerais, além do pH, influenciam fortemente a sua eficácia. Por conseguinte, quantidades mais elevadas de óleos essenciais são necessárias em sistemas alimentares, pois interferem seriamente nos aspectos organolépticos do alimento (LIS-BALCHIN; BUCHBAUER; HIRTENLEHNER, 2003). Nesse sentido, a influência da composição dos alimentos sobre a eficácia antimicrobiana dos óleos essenciais torna-se desafiadora e importante área de estudo (HOLLEY; PATEL, 2005).

Interações entre os componentes dos óleos essenciais podem provocar efeitos antagônicos, aditivos ou sinérgicos. Em alguns estudos tem sido 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).

### **2.3.3 Atividade antioxidante dos óleos essenciais**

Os óleos e as gorduras estão sujeitos, durante o processamento e a estocagem de alimentos, a reações químicas que podem alterar de modo indesejável as características do produto final. Hidrólise e oxidação podem ser responsáveis por esse processo, sobretudo a oxidação dos lipídeos. Antioxidantes são, geralmente, utilizados em óleos e alimentos gordurosos, para retardar sua auto-oxidação (WENG; WANG, 2000).

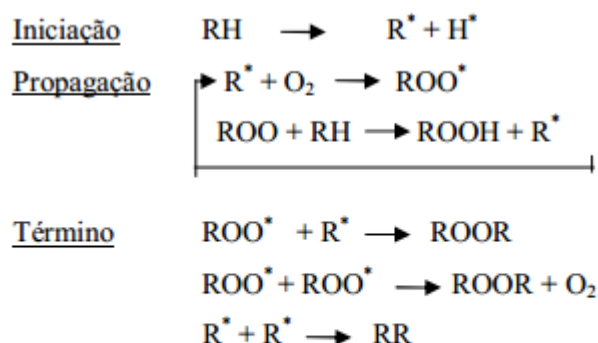
Os lipídeos podem ser oxidados de diferentes formas. A rancificação hidrolítica é catalisada pelas enzimas lípases ou pela ação de umidade e calor,

havendo a formação de ácidos graxos livres. A oxidação por via enzimática ocorre devido à ação das enzimas lipoxigenases que têm atividade sobre os ácidos graxos poli-insaturados, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poli-insaturada, ocorrendo a formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas que podem se envolver em diversas e variadas reações degradativas. O mecanismo de fotoxidação de gorduras insaturadas é promovido, essencialmente, pela radiação UV em presença de fotossensibilizadores (clorofila, riboflavina e mioglobina, entre outros) que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e a transferem para o oxigênio triplete ( $3O_2$ ), assim gerando o estado singlete ( $1O_2$ ). O oxigênio singlete reage com as ligações duplas diretamente por adição, formando hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência de luz e de sensibilizadores, e que, por degradação posterior, originam aldeídos, hidrocarbonetos e álcoois (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

A autoxidação dos lipídios em produtos cárneos envolve a peroxidação de ácidos graxos insaturados, em particular daqueles associados com fosfolipídios localizados nas membranas celulares. A suscetibilidade ao processo oxidativo depende da capacidade de os ácidos graxos doarem um átomo de hidrogênio, com produção de um radical livre de lipídio que, por sua vez, reage com oxigênio molecular para formar um radical peróxi (BELITZ; GROSCH, 1999).

Assim, os átomos de carbono adjacentes às duplas ligações tendem a doar um átomo de hidrogênio, levando à formação de radicais estabilizados por ressonância. Uma vez que a autoxidação dos lipídios procede via mecanismo de cadeia de radicais livres, é catalisada por muitos fatores, tais como presença de calor, luz, radiação ionizante, íons metálicos e metaloporfirinas (BELITZ; GROSCH, 1999). O mecanismo de autoxidação está ilustrado na Figura 2.





Legenda: Ácido graxo insaturado (RH); Radical livre (R<sup>•</sup>);  
Radical peróxido (ROO<sup>•</sup>); Hidroperóxido (ROOH).

Figura 2 Mecanismo de autoxidação, segundo Ramalho e Jorge (2006)

A deterioração oxidativa pode resultar, ainda, em rancidez organoléptica no produto final, tornando-o inaceitável pelos consumidores e também causar efeitos degradativos, como destruição de vitaminas, perdas nutricionais e descoloração (STROTMANN et al., 2008).

Conforme Jayaprakasha, Singh e Sakariah (2001), alguns antioxidantes sintéticos, como butil-hidroxianisol (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT), bastante utilizados em alimentos, revelaram-se tóxicos em altas doses. Portanto, os óleos essenciais podem ser empregados como potenciais substitutos de antioxidantes sintéticos.

A atividade antioxidante das especiarias e de seus extratos é atribuída aos compostos fenólicos que podem atuar como sequestrantes de radicais livres (GUERRA; LAJOLO, 2005). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se, principalmente, às suas propriedades redutoras e à estrutura química, que desempenham papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOARES, 2002; SOUZA et al., 2007). De acordo com Soares (2002), os intermediários formados pela ação de

antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias.

Segundo Angelo e Jorge (2007), de acordo com modo de ação, os antioxidantes dos óleos essenciais podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação por meio da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autoxidação por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete.

A reação em cadeia dos antioxidantes primários, como os compostos fenólicos presentes em óleos essenciais, está ilustrada na Figura 3.

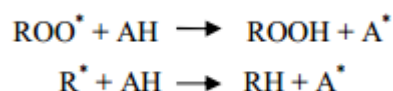


Figura 3 Mecanismo de ação para os antioxidantes primários; creditado a óleos essenciais e seus componentes. Radicais livres: ROO\* e R\*; antioxidante com átomo de hidrogênio ativo: AH e radical inerte (A\*)

Diversos compostos antioxidantes são encontrados nos óleos essenciais. Em orégano tem-se a presença do carvacrol e de isômeros monoterpênicos fenólicos do timol (PETER, 2000); no cravo-da-índia é possível encontrar galatos, biflorina, isômeros de eugenol e acetato de eugenila (LEE; SHIBAMATO, 2001), e, em alecrim e sálvia, ocorre a presença de carnosol, ésteres de etil e metil, ácido carnósico, rosmadial, rosmariquinona, rosmanol e rosmaridifenol (PIZZALE et al., 2002).

## 2.4 Descrição botânica dos óleos essenciais

### 2.4.1 Óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

A espécie *Cinnamomum zeylanicum* é uma planta aromática e medicinal pertencente à família Lauraceae, originária de algumas regiões da Índia e do Ceilão. É encontrada e conhecida no Brasil como canela-da-índia ou canela-do-ceilão. O óleo essencial da canela pode ser obtido tanto das cascas como das folhas da planta, sendo a composição dos dois completamente diferente. O óleo obtido da casca é utilizado na aromatização de alimentos; já o obtido das folhas da canela é utilizado no ramo de cosméticos e aromaterapia (GROSSMAN, 2005).

O óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) é utilizado como flavorizante, aromatizante e conservante natural de alimentos. Foi demonstrado, em estudos, a capacidade de inibir o crescimento de fungos (LIMA et al., 2006) e de bactérias (MATAN et al., 2006). De acordo com Benarroz et al. (2008), suas qualidades sensoriais são ligeiramente doce, agradável, quente e amargo, além de ser fortemente aromático.

*Cinnamomum zeylanicum* mostrou muitas aplicações biológicas devido a seu efeito analgésico, antisséptico, antiespasmódico, afrodisíaco, adstringente, carminativo hemostática, inseticida e parasiticida. O óleo essencial extraído das cascas da canela é comercializado como a canela comercial, que tem um longo uso em perfumaria, culinário e sistemas de medicina nativos (GAYOSO et al., 2005; SAMARASEKERA; KALHARI; WEERASINGHE, 2005).

Lima et al. (2005) descrevem a composição do óleo de folhas de *C. zeylanicum*, que inclui eugenol (76,10%), trans- $\beta$ -cariofileno (6,7%), linalol (3,7%), acetato de eugenol (2,8%) e benzoato de benzilo (1,9%) (FICHI et al., 2006). O eugenol é o composto principal encontrado no óleo essencial de canela

obtido a partir de folhas, enquanto os óleos a partir de ramos apresentaram linalol (10,6%),  $\alpha$ -pineno (9,9%) e  $\alpha$ -felandreno (9,2%) como compostos prevalentes. No óleo essencial de canela encontrado na casca estavam presentes os compostos aldeído cinâmico (55%) e eugenol (12%) (KOKETSU et al., 1997).

Um efeito interessante em relação à capacidade antimicrobiana do óleo essencial de *C. zeylanicum* para algumas bactérias patogênicas foi observado no trabalho de López-Díaz et al. (2002). Estes autores relataram que o óleo essencial de canela tem maior eficácia na inibição do crescimento de bactérias gram-negativas, do que de bactérias gram-positivas.

Acredita-se que terpenos oxigenados e hidrocarbonetos, como 4-terpineole, p-cimeno,  $\beta$ -pineno, linalool e  $\alpha$ -pineno, encontrados em óleo essencial *C. zeylanicum*, se acumulam na membrana bacteriana e causam uma perda da integridade da membrana, resultando no vazamento de conteúdo citoplasmático, na dissipação de força motriz de prótons e, por fim, a lise celular (GUSTAFSON et al., 1998; SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995).

De acordo com Matan et al. (2006), os compostos ativos presentes no óleo da canela, entre 50% a 60% de cinnamaldeídos e 4% a 7% de eugenol, apresentam a capacidade de interferir na síntese de algumas enzimas nas bactérias, além de provocarem danos à estrutura da parede bacteriana.

Cinamaldeído é um dos compostos mais eficazes existentes na canela (SHAH; DAVIDSON; ZHONG, 2012) e é aplicado amplamente no material de preservação de alimentos como um ingrediente antimicrobiano seguro (BALAGUER et al., 2013).

O cinamaldeído pode entrar nas células microbianas, danificando a membrana celular, de modo a alterar as estruturas espaciais das biomacromoléculas, destruindo o seu metabolismo ordenado. No entanto, devido à sua hidrofobicidade, o cinamaldeído é moderadamente solúvel em água e é

difícil dispersar-se uniformemente em matrizes alimentares. Isto leva a uma aplicação relativamente limitada deste composto em conservação de alimentos (BANG et al., 2000).

Singh et al. (2007), em pesquisa com *C. zeylanicum*, verificaram a presença de 13 componentes no seu óleo essencial. (E)-cinamaldeído (97,7%) foi encontrado como o principal, seguido de  $\beta$ -cadineno (0,9%),  $\beta$ -copaeno e (0,8%) and  $\beta$ -amorfeno (0,5%)

No trabalho de Andrade et al. (2012), o óleo essencial de canela foi o mais efetivo na inibição do crescimento bacteriano. Esse resultado pode estar relacionado com a presença do componente majoritário aldeído cinâmico em elevada concentração (77,72%).

#### **2.4.2 Óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*)**

Madagascar e Indonésia são os principais produtores de cravo-da-índia. No Brasil, a planta é conhecida como craveiro, craveiro-da-índia e cravo. Trata-se de uma planta arbóreae perene que atinge 10 metros de altura. A copa é bem verde, de formato piramidal. As folhas são ovais, persistentes e de coloração verde-brilhante. As flores brancas são agrupadas em inflorescência do tipo cacho e seus botões são colhidos quando sua cor muda de verde para carmim; posteriormente ocorre uma cuidadosa dessecação ao sol. O fruto é do tipo baga e de formato alongado. Desenvolve-se em regiões de clima tropical e a propagação é feita por sementes, que preferem solos ricos em matéria orgânica e nutrientes, úmidos e bem drenados (NAGRAES, 2003).

O cravo-da-índia é uma planta de odor fortemente aromático, sabor ardente e característico. Das sementes, de aroma ativo, extrai-se o ácido eugênico, incolor e de sabor picante. Sua composição química é constituída, principalmente, por eugenol, betacariofileno, ácido oleânico, acetato de eugenol

e substâncias das seguintes classes: cetonas, triterpeno, esteróis, ceras vegetais, resinas e taninos. O eugenol apresenta efeito anti-inflamatório, analgésico e cicatrizante, e é eficaz no combate e na diminuição de bactérias presentes na boca. Seus efeitos medicinais compreendem o tratamento de náuseas, indigestão, diarreia e flatulências. Com propriedades antibactericidas, é também utilizado como anestésico e antisséptico, para o alívio de dores de dente (NASCIMENTO; LOCATELLI; FREITAS, 2000).

O cravo-da-índia, *S. aromaticum*, da família *Myrtaceae*, tem seu óleo essencial obtido dos botões florais dessecados, o qual contém mais de 85%, por volume, de substâncias fenólicas totais, preponderando eugenol (70% a 95%), acetato de eugenila e  $\beta$ -cariofileno. É caracterizado como um líquido incolor ou amarelo-claro, classificado como aromatizante, e utilizado nos casos de dispepsia, bronquite e tratamentos dentários (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Segundo Matan et al. (2006), o óleo essencial de cravo-da-índia está presente na planta em grande quantidade, entre 15% e 25% e é utilizado na culinária, nas indústrias de alimento e também na medicina, sendo sua ação antimicrobiana relatada frente a inúmeros microrganismos (DORMAN; DEANS, 2000).

No trabalho desenvolvido por Mazzafera (2003), o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou os compostos eugenol (75%), acetato de eugenila (15%) e  $\beta$ -cariofileno (10%). No estudo realizado por Pereira et al. (2008), o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou, em sua constituição, eugenol (86,3%), trans-cariofileno (8,2), acetato de eugenila (3,6%) e  $\alpha$ -humuleno (0,8%). No trabalho de Oliveira (2009), foi verificada a presença de 88% de eugenol, 11% de acetato de eugenila e 1% de  $\beta$ -cariofileno na composição do óleo essencial de botões florais de cravo-da-índia. De acordo com Oussalah et al. (2007), os constituintes do óleo essencial de cravo-da-índia foram 78% de eugenol e 8% de acetato de eugenila.

O eugenol é derivado do óleo essencial de cravo, canela e louro. É uma classe de fenilpropenos voláteis com aroma característico e dispõe de extensos grupos de diversos compostos fenólicos anfipáticos, exibindo excelente atividade antimicrobiana (KOEDUKA et al., 2013; LI; MCCLEMENTS, 2014; ROBERTS et al., 2014).

O eugenol exibe comprovadas atividades como antimicrobiano, anti-inflamatório, anestésico, antisséptico, antioxidante, alelopático e repelente (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Além disso, o eugenol tem sido empregado para a produção de outros fenólicos, tal como a vanilina (PRIEFERT; RABENHORST; STEINBUHEL, 2001).

O principal mecanismo antibacteriano do eugenol é devido à sua alta permeabilidade não específica na membrana citoplasmática e assim resulta no rompimento da membrana e na supressão de ação da enzima, causada por grupo hidroxila do eugenol que se liga a proteínas. Apesar de sua aplicação potencial e demanda na área de alimentos, a eficiência do eugenol é substancialmente limitada por sua alta volatilidade, baixa solubilidade em água e alta susceptibilidade ao ambiente, processamento ou em condições gastrintestinais (LI et al., 2011).

O óleo essencial de cravo-da-índia tem ação antioxidante muito forte, provavelmente devido ao elevado teor de eugenol na composição, pois, segundo Scherer e Godoy (2009), o eugenol apresenta valor de IAA entre 10 e 11. Entre os usos do eugenol destacam-se o emprego no alívio da dor de dente, como antisséptico em odontologia e na fabricação de dentifrícios, em perfumaria, saboaria e como clarificador em histologia. O eugenol é também empregado como matéria-prima para a obtenção de vanilina, empregada na aromatização de doces, chocolates, sorvetes e tabacos (COSTA, 2000).

### 2.4.3 Óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.)

Tradicionalmente, o orégano tem sido consumido como tempero. No entanto, recentemente, tem obtido mais interesse em outros usos potenciais, em particular como um óleo essencial, que tem provado ser bom agente antimicrobiano e antioxidante. A maioria dos estudos foi realizada com óleo essencial de orégano europeu (*Origanum vulgare* L.) (KULISIC et al., 2004).

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

Certos números de estudos sobre as atividades antioxidantes dos óleos essenciais a partir de várias plantas aromáticas relatam que o óleo essencial de orégano, rico em timol e carvacrol, tem um considerável efeito antioxidante no processo de oxidação lipídica (LAGOUR et al., 1993). Segundo Dorman e Deans (2003), a capacidade antioxidante do óleo essencial de orégano está relacionada com a doação de elétrons aos radicais livres reativos, tornando as moléculas mais estáveis ou não reativas.

O orégano é uma erva anual, perene, nativa de regiões do Mediterrâneo, Irano-Sibéria e Euro-Sibéria. São reconhecidas, no mundo, no total, 38 espécies de orégano que crescem abundantemente em encostas e montanhas rochosas em uma ampla faixa de altitudes, devido à variabilidade de aroma e características químicas. Plantas de *Origanum* pertencentes a diferentes espécies e biotipos são utilizadas amplamente na agricultura, na indústria farmacêutica e cosmética, como erva culinária, aromatizando produtos alimentícios, bebidas alcoólicas e perfumaria, devido à fragrância picante (SAHIN et al., 2004).



*Origanum vulgare* é uma planta muito versátil, com muitas propriedades terapêuticas, como, por exemplo, sudorífico, anti-inflamatório, antisséptico, carminativo, antiespasmódico e tônico, sendo utilizados em sistemas de medicina nativa por um longo tempo (CHUN et al., 2005; SAHIN et al., 2004).

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) é um composto orgânico que ocorre naturalmente em óleos essenciais de muitas plantas. É bem conhecido pelo seu amplo perfil farmacológico, especialmente analgésico (GUIMARÃES et al., 2010).

O carvacrol é, geralmente, considerado um aditivo alimentar seguro e agente aromatizante. É encontrado em bebidas, doces e goma de mascar (OLIVEIRA et al., 2014). Várias plantas medicinais contendo carvacrol foram amplamente utilizadas na medicina popular, antes de os componentes de sua eficácia terapêutica terem sido descobertos (KRIMER; BAS; TÜMEN, 1995; SOKMEN et al., 2004).

Este composto tem sido relatado como tendo uma vasta gama de propriedades de proteção contra estados de doença, incluindo a inflamação, o estresse oxidativo, o crescimento do tumor e infecções microbianas (BASER, 2008).

De acordo com Ruberto e Barata (2000), fenóis são antioxidantes eficientes. Assim, as moléculas de timol e carvacrol são, de fato, responsáveis pela atividade antioxidante de muitos óleos essenciais que os contêm.

## **2.5 Matriz alimentar: apresentado**

Os produtos cárneos cozidos e submetidos ao processo de cura são, normalmente, considerados seguros, entretanto, a recontaminação pós-processamento por microrganismos patogênicos pode ocorrer, causando surtos de toxinfecções alimentares, pois são produtos “prontos para consumo” que não

necessitam de processo térmico imediatamente antes ao consumo (MOTTIN, 2008).

O consumidor tem à sua disposição uma enorme variedade de derivados cárneos que lhes são oferecidos pelo mercado de indústrias frigoríficas, dentre eles, presuntos, apresuntados, linguiças e salsichas, entre outros. Conforme descrito por Pardi et al. (1996), os produtos cárneos curados de suínos, nas condições brasileiras, como no caso de apresuntados, têm cada vez maior difusão, o que significa um estímulo à diversificação de especialidades.

Por se tratar de produtos de amplo consumo popular, a tendência é de crescimento contínuo. De acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2014), os produtos de salsicharia, entre os quais o apresuntado se encaixa, estão entre os 100 maiores produtos e, ou, serviços industriais do Brasil, onde, em 2009, a produção foi de 453.325 milhões de toneladas internas. Em pesquisa realizada entre os anos de 2008 e 2009, em relação ao orçamento das famílias brasileiras, observou-se que o consumo alimentar médio de apresuntado per capita (g/dia) tem aumentado ao longo dos tempos, e o maior consumo está entre os adultos (4,1%) (IBGE, 2011).

A Instrução Normativa nº 20, de 31/07/2000 (BRASIL, 2000), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que aprovou o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Apresuntado, define o apresuntado como produto cárneo industrializado obtido a partir de recortes e, ou cortes e recortes de massas musculares dos membros anteriores e, ou posteriores de suínos, adicionados de ingredientes e submetido ao processo de cozimento.

Na elaboração de apresuntados é permitida a moagem das peças cárneas (geralmente em discos de 20 a 22 mm) e, portanto, os ingredientes são misturados diretamente na massa, eliminando as etapas de preparação da salmoura, injeção e tombamento, necessárias na produção de presunto. Com o

auxílio de uma misturadeira é possível produzir produtos de qualidade, implicando num processo rápido, eficiente e de baixo custo. Por estes motivos, a produção de apresuntados no país vem se aproximando da produção de presuntos cozidos (PARDI et al., 1996).

São considerados como ingredientes obrigatórios do apresuntado: paleta ou pernil suíno, sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio em forma de salmoura. Como ingredientes opcionais têm-se proteínas de origem animal e/ou vegetal, açúcares, maltodextrina, condimentos, aromas e especiarias e aditivos intencionais. Na Tabela 2 estão listadas as características físico-químicas estabelecidas pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Apresuntado (BRASIL, 2000).

Tabela 2 Características de identidade e qualidade de apresuntados (Instrução Normativa nº 20, de 31/07/2000)

Características permitidas	Quantidade físico-química	Valor (%)
Amido	Máximo	2,0
Carboidratos totais <sup>(1)</sup>	Máximo	5,0
Umidade	Máximo	75,0
Gordura	Máximo	12
Proteína	Máximo	13
Proteína não cárnica <sup>(2)</sup>	Máximo	2,5

<sup>(1)</sup>A somatória de carboidratos totais (máx.) e amido (máx.) não deverá ultrapassar 5% ou 10%

<sup>(2)</sup>Permite-se a adição de proteínas não cárneas (vegetal e, ou, animal), como proteína agregada

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

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

O experimento foi conduzido em três etapas que foram: 1) determinaram-se as atividades antimicrobianas *in vitro* dos óleos essenciais de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), orégano (*Origanum vulgare*) e de seus respectivos compostos majoritários cinamaldeído, eugenole carvacrol sobre as células vegetativas de *Clostridium sporogenes* ATCC 11437; 2) a partir dos óleos e compostos majoritários com maior atividade antimicrobiana, avaliou-se, *in vitro*, a atividade antimicrobiana sinérgica de combinações dos óleos e seus compostos majoritários e 3) a partir das combinações com maiores atividades antimicrobianas, estas foram adicionadas na formulação de apresuntados inoculados de células vegetativas de *C. sporogenes* e realizaram-se análises microbiológicas e físico-químicas.

#### 3.1 Óleos essenciais e compostos majoritários

Os óleos essenciais foram adquiridos na Ferquima Indústria e Comércio Ltda. Já os compostos majoritários foram obtidos na empresa Sigma-Aldrich. Os óleos essenciais utilizados foram o de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e de orégano (*Origanum vulgare*), e seus respectivos compostos majoritários, cinamaldeído, eugenol e carvacrol.

As porcentagens dos compostos presentes nos óleos essenciais utilizados no experimento são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 Composição óleos essenciais de canela, cravo-da-índia e orégano

Oleos essenciais	Composição
Canela ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )	87,6% cinamaldeído 3,1% $\alpha$ -humuleno 2,5% $\gamma$ -elemeno 1,5% borneol 0,4% eugenol
Cravo-da-índia ( <i>Syzygium aromaticum</i> )	84% eugenol 8% acetato-eugenila 6% $\beta$ -cariofileno
Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )	71% carvacrol 4,5% $\gamma$ -terpineno 4% $\beta$ -carfioleno 3,5% p-cimeno

Fonte: Ferquima Indústria e Comércio Ltda

### 3.2 Microrganismo, cultura estoque e padronização do inóculo

A cepa utilizada para a realização do estudo foi a *Clostridium sporogenes* ATCC 11437, gentilmente cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil). A cultura liofilizada foi reativada em meio *Differential Reinforced Clostridium* Base Broth (DRCBB, Himedia®), suplementado com 0,5% de solução filtrada de sulfato de sódio (4%) e citrato férrico (7%), e incubação, a 37 °C, por 48 horas. Após esse período, a cultura foi centrifugada, a 3.000 x g por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante resultante da centrifugação e adicionou-se o meio de congelamento (15 mL de glicerol, 0,5 g de peptona bacteriológica, 0,3 g de extrato de levedura, 0,5 g de NaCl e 100 mL de água destilada). As culturas estoque foram armazenadas a -18 °C.

Para a reativação da cepa foi utilizado o meio DRCBB (Himedia®) suplementado com 0,5% de solução filtrada de sulfato de sódio e citrato férrico, incubados em condições anaeróbicas, a 37 °C, por 48 horas. Este processo foi

realizado por duas vezes consecutivas, para realizar a padronização do inóculo com a elaboração de uma curva de crescimento, acompanhando-se a absorbância (D.O. 600nm) e a contagem em placa utilizando-se *Reinforced Clostridium* base ágar (13 g de extrato de levedura, 10 g de peptona, 5 g de glicose, 1 g de amido solúvel, 5 g de cloreto de sódio, 3 g de acetato de sódio, 0,5 g de cloridrato de cisteína e 15,5 g de ágar). As placas foram incubadas em condições anaeróbicas, a 37 °C, por 48 horas e o inóculo foi padronizado em 10<sup>7</sup> UFC/mL.

### **3.3 Determinação da concentração mínima bactericida dos óleos essenciais e compostos majoritários e de suas combinações**

As concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos óleos essenciais e dos compostos majoritários foram determinadas empregando-se a técnica de diluição em caldo (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003). Preparou-se o caldo *Reinforced Clostridium* base acrescido de 0,5% de Tween 80, para a diluição dos óleos essenciais e seus compostos majoritários. As concentrações utilizadas dos óleos e compostos foram de 0,1%, 0,15%, 0,2%, 0,25%, 0,3%, 0,35%, 0,4%, 0,45%, 0,5%, 0,55%, 0,6% e 0,7%, sendo a concentração do composto majoritário presente no óleo essencial sido a mesma dos compostos majoritários isolados adicionados.

Alíquotas de 50 µL de células vegetativas padronizadas de *C. sporogenes* foram transferidas para tubos homogeneizados contendo 5 mL de caldo *Reinforced Clostridium* base, acrescidos das diferentes concentrações de óleos essenciais e compostos majoritários. Foi realizado o controle positivo, tubos contendo caldo *Reinforced Clostridium* base acrescido de 0,5 % (v/v) Tween 80. Após outra homogeneização, os tubos foram incubados em condições anaeróbicas, à temperatura de 37 °C, por 24 horas. Decorrido esse período,

realizou-se o plaqueamento em profundidade de 1.000  $\mu\text{L}$  da cultura em ágar *Reinforced Clostridium* base com sobrecamada. O plaqueamento foi realizado em três repetições e em triplicata. As placas foram incubadas, a 37 °C, por 24 horas, considerando como concentração mínima bactericida aquela onde não se observou crescimento do microrganismo em placas.

As combinações foram realizadas em conjuntos de dois óleos essenciais e dois compostos majoritários com melhor efeito bactericida, os teores dos óleos essenciais e compostos majoritários aplicados de acordo com o delineamento experimental estão expressos na Tabela 4. Foram consideradas CMB das combinações de óleos essenciais e compostos majoritários aquelas nas quais não se observou crescimento nas placas. As análises foram realizadas em três repetições, em triplicata.

Para a análise da atividade antimicrobiana das combinações dos óleos essenciais e compostos majoritários foi utilizado o modelo de superfície de resposta para o estudo da avaliação simultânea das quatro variáveis independentes (proporção de dois óleos essenciais e dois compostos majoritários). Para cada variável experimental, a variância foi decomposta nos componentes linear, quadrático e interação, a fim de avaliar a sua importância relativa e o ajuste de uma função polinomial.

Tabela 4 Teores dos óleos essenciais e compostos majoritários aplicados de acordo com o delineamento experimental

Ensaio	Variáveis codificadas				Variáveis reais			
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>4</sub>	Óleo A (%)	Óleo B (%)	Composto A (%)	Composto B (%)
1	-1	-1	-1	-1	0,09	0,05	0,1	0,05
2	-1	-1	-1	1	0,09	0,05	0,1	0,08
3	-1	-1	1	-1	0,09	0,05	0,22	0,05
4	-1	-1	1	1	0,09	0,05	0,22	0,08
5	-1	1	-1	-1	0,09	0,08	0,1	0,05
6	-1	1	-1	1	0,09	0,08	0,1	0,08
7	-1	1	1	-1	0,09	0,08	0,22	0,05
8	-1	1	1	1	0,09	0,08	22	0,08
9	1	-1	-1	-1	0,19	0,05	0,1	0,05
10	1	-1	-1	1	0,19	0,05	0,1	0,08
11	1	-1	1	-1	0,19	0,05	0,22	0,05
12	1	-1	1	1	0,19	0,05	0,22	0,08
13	1	1	-1	-1	0,19	0,08	0,1	0,05
14	1	1	-1	1	0,19	0,08	0,1	0,08
15	1	1	1	-1	0,19	0,08	0,22	0,05
16	1	1	1	1	0,19	0,08	0,22	0,08
17	-2	0	0	0	0,04	0,07	0,16	0,06
18	2	0	0	0	0,25	0,07	0,16	0,06
19	0	-2	0	0	0,14	0,04	0,16	0,06
20	0	2	0	0	0,14	0,1	0,16	0,06
21	0	0	-2	0	0,14	0,07	0,04	0,06
22	0	0	2	0	0,14	0,07	0,29	0,06
23	0	0	0	-2	0,14	0,07	0,16	0,04
24	0	0	0	2	0,14	0,07	0,16	0,09
25	0	0	0	0	0,14	0,07	0,16	0,06

X<sub>1</sub> = variável codificada para Óleo Essencial A; e X<sub>2</sub> = variável codificada para Óleo Essencial B, X<sub>3</sub> = variável codificada para Composto Majoritário A, X<sub>4</sub> = variável codificada para Composto Majoritário B. Óleo essencial e composto majoritário A e B: Menor CMB

### 3.4 Elaboração do apresentado e preparo das amostras

Os apresentados foram divididos em quatro tratamentos, sendo dois deles controle (sem adição de óleos essenciais e compostos majoritários) e os outros dois apresentados adicionados de duas combinações diferentes dos óleos essenciais de canela e orégano, e os compostos cinamaldeído e carvacrol. A



quantidade de nitrito, óleos essenciais e compostos majoritários dos quatro tratamentos está descrita na Tabela 5.

Tabela 5 Quantidade de nitrito, óleos essenciais e compostos majoritários dos quatro tratamentos de apresuntados

Tratamentos	Óleos e compostos(%)	Nitrito
Tratamento 1	-	150 ppm
Tratamento 2	-	75 ppm
Tratamento 3	Combinação 1	75 ppm
Tratamento 4	Combinação 2	75 ppm

Combinação 1: 0,085% óleo de canela, 0,19% óleo de orégano, 0,05% cinamaldeído, 0,22% carvacrol; Combinação 2: 0,1% óleo de canela, 0,14% óleo de orégano, 0,06% cinamaldeído, 0,16% carvacrol

A elaboração dos apresuntados foi baseada na formulação apresentada na Tabela 6, de acordo com o fluxograma geral apresentado na Figura 4.

Tabela 6 Formulação dos apresentados utilizados no experimento

<b>Ingredientes (%)</b>	<b>Tratamento 1</b>	<b>Tratamento 2</b>	<b>Tratamento 3</b>	<b>Tratamento 4</b>
Carne de pernil suíno	55	55	55	55
Água	37	37	37	37
Isolado proteico de soja (IPS)	1,7	1,7	1,7	1,7
Sal refinado	1,6	1,6	1,6	1,6
Nitrito de sódio	0,015	0,0075	0,0075	0,0075
Eritorbato	0,06	0,06	0,06	0,06
Foxmax E-10 (mix de fosfatos)	0,5	0,5	0,5	0,5
Fécula de mandioca	1,7	1,7	1,7	1,7
Glutamato monosódico (GMS)	0,3	0,3	0,3	0,3
Condimento Califórnia	0,6	0,6	0,6	0,6
E-max (206) * (maltodextrina)	1	1	1	1
Carragena	0,5	0,5	0,5	0,5
Óleo essencial e composto majoritário	-	-	0,56	0,47

\*NewMax Ingredientes/ C1: Combinação 1, C2: Combinação 2



Figura 4 Fluxograma geral do processamento de apresuntado

As carnes resfriadas (-1 a 0 °C) foram pesadas e moídas em disco de 14 mm. Transferiu-se a massa obtida para formas, às quais os ingredientes foram incorporados manualmente (acrescentando-se, inicialmente, os ingredientes secos, seguidos da água e, por último, os óleos essenciais) e misturados, por 10 minutos. A massa obtida foi mantida em câmara fria (4 °C), por 24 horas, para o processo de cura.

Após a cura, a massa foi dividida em diferentes porções e embaladas a vácuo, em filme flexível de náilon-polietileno, e enformadas em forma metálica de 500 g. Após a enformagem, os apresuntados foram imersos em banho-maria com água aquecida e cozidos segundo a seguinte programação: 60 °C/60 minutos; 70 °C/60 minutos e 80 °C por 30 minutos, tendo a temperatura interna do produto atingido 72 °C (medida pela inserção de um termopar no centro do produto enformado). Após o cozimento, aplicou-se choque térmico (resfriamento) pela imersão das formas em água fria e gelo, sendo os produtos desenformados e acondicionados sob refrigeração (4 °C), na qual permaneceram por 24 horas, para análises posteriores.

Para cada tratamento foi fabricado 1 kg de apresuntado, distribuído em quatro moldes, totalizando 4 kg de apresuntado. Para as análises microbiológicas, porções de 25 g da massa dos apresuntados foram colocadas em embalagens plásticas; o restante da peça do apresuntado foi utilizado para realizar as análises físico-químicas, tendo, antes, sido armazenado a 4 °C.

Amostras de 25 g foram homogeneizadas em Stomacher Metroterm® (490 golpes/ min.), por 2 minutos e, em seguida, inoculadas  $10^7$  UFC/g de células vegetativas de *C. sporogenes*. Posteriormente, as porções foram seladas a vácuo e levadas em estufa tipo BOD, nas temperaturas de 7 °C e 14 °C. As análises microbiológicas foram realizadas após 24 horas de processamento (tempo 0), 7 dias (tempo 7), 14 dias (tempo 14), 21 dias (tempo 21) e 28 dias de armazenamento (tempo 28). Já as análises físico-químicas foram realizadas após 24 horas de processamento (tempo 0) e após 30 dias de armazenamento (tempo 30).

### **3.5 Contagem de células vegetativas e esporos de *C. sporogenes* inoculados em apresuntados**

As embalagens contendo 25 g de apresuntado foram abertas assepticamente e adicionados 225 mL de água peptonada a 0,1% (m/v). Esta mistura foi homogeneizada em *Stomacher Metroterm*® (490 golpes/min por 2 minutos).

Após a homogeneização, para a contagem de células vegetativas, realizaram-se diluições seriadas em água peptonada 0,1% (m/v). Alíquotas de 1.000 µL dos tubos foram transferidas para placas de Petri, com plaqueamento em profundidade com sobrecamada, utilizando-se o ágar base *Reinforced Clostridium* e incubadas, a 37 °C, por 24 horas, em condições anaeróbicas. As análises foram realizadas em triplicata.

Para a contagem de esporos segue-se o mesmo procedimento, porém, após a homogeneização em água peptonada 0,1% (m/v), as amostras de suspensões de apresuntado foram submetidas ao choque térmico, 75 °C por 15 minutos, com a utilização de banho-maria, para inativação das células viáveis.

### **3.6 Análises físico-químicas**

#### **3.6.1 Concentração de nitrito residual**

O teor residual de nitrito nos produtos elaborados, expresso em nitrito de sódio (ppm), foi quantificado segundo o método oficial nº 973.31 da Association of Official Analytical Chemists (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1998).

Aproximadamente 5 g de apresuntado foram triturados e homogeneizados com 40 mL de água destilada aquecida à temperatura de 80 °C e a solução foi transferida para um balão volumétrico, com volume de 500 mL. Sucessivas lavagens foram conduzidas com água quente, até atingir o volume aproximado de 300 mL. Posteriormente, o balão volumétrico ficou em repouso em banho-maria, durante um período de duas horas, à temperatura de 80 °C, sendo agitado ocasionalmente. Passado o repouso, o balão foi resfriado à temperatura ambiente e seu volume completado com água destilada e a solução foi filtrada. Em seguida, foram transferidos 45 mL do filtrado para tubo Falcon com volume de 50 mL, sendo adicionados 2,5 mL de sulfanilamida em ácido acético. Esta solução foi homogeneizada e, após 5 minutos, adicionaram-se 2,5 mL de reagente N-(1-naftil) etilenodiamino, NED, e a mistura novamente foi homogeneizada. A solução foi mantida em repouso por 15 minutos, para o desenvolvimento da cor e, passado esse tempo, a leitura em espectrofotômetro a 540 nm foi analisada. As análises das amostras foram realizadas em triplicatas e

os valores de nitrito residual expressos em partes por milhão (ppm), utilizando uma curva padrão de nitrito de sódio.

### **3.6.2 pH**

Os valores do pH dos apresentados foram medidos por meio da inserção de um eletrodo combinado (sistema de referência de Ag/AgCl), acoplado a um potenciômetro (DM20-Digimed, São Paulo, SP, Brasil).

### **3.6.3 Oxidação lipídica (índice de TBARS)**

O grau de oxidação lipídica foi determinado de acordo com a metodologia proposta por Raharjo et al. (1992), com adaptações, utilizando-se o índice de substâncias reativas ao ácido tiobartúrico (TBARS).

Aproximadamente 10 g de amostra foram triturados e homogeneizados em 40 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% e 1 mL do antioxidante butil-hidroxitolueno (BHT) 0,15% (em etanol). Essa homogeneização foi realizada com o auxílio de um Politron. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 3.000 g, por 2 minutos, e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro para um balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume completado com ácido tricloroacético 5% (TCA). Uma alíquota de 2 mL desta solução foi adicionada de 2 mL do reagente ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,08M em ácido acético 50%, e submetida a banho-maria fervente por exatos 5 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo e a leitura da absorbância a 531 nm foi conduzida.

Determinou-se a concentração de malonaldeído (MAD) a partir de uma curva padrão de calibração com 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) e os resultados foram expressos em miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra (mg de MAD/kg).

### 3.6.4 Atividade de água

A atividade de água foi determinada utilizando-se equipamento Aqualab (Decagon modelo 3 TE). As amostras, aproximadamente 5 g, foram dispostas em recipientes plásticos e as leituras foram realizadas em temperatura controlada de  $25,0 \pm 0,3$  °C, tendo as determinações sido feitas em triplicata.

### 3.6.5 Cor objetiva

A avaliação da cor objetiva final dos produtos foi realizada com o auxílio de colorímetro espectrofotométrico CM700 (Konica Minolta Sensings Inc, Japão) calibrado, utilizando-se o iluminante D65, 10° para o observador e luz especular excluída. Seguiram-se as recomendações descritas por Ramos et al. (2009), que descrevem a otimização da avaliação objetiva da cor de presuntos e apresentados.

Os índices de cor  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  foram obtidos de acordo com o valor médio de cinco leituras realizadas em diferentes pontos de fatias de apresentados com, aproximadamente, 4 cm de largura. Os índices de saturação ( $C^*$ ), ângulo de tonalidade ( $h^*$ ) e diferença global ( $\Delta E^*$ ) foram calculados pelas seguintes fórmulas descritas por Ramos e Gomide (2007):

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2};$$

$$h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*); \text{ e}$$

$$\Delta E^* = [(L^* - L^*_{ref})^2 + (a^* - a^*_{ref})^2 + (b^* - b^*_{ref})^2]^{1/2}$$

### 3.7 Análises estatísticas

A atividade antimicrobiana das combinações entre os óleos essenciais e compostos majoritários foi avaliada empregando-se a análise dos componentes

principais (*principal component analysis*, PCA), realizada utilizando-se o *software Chemoface* (NUNES; PINHEIRO, 2012).

As combinações dos óleos essenciais e compostos foram estudadas por meio de um planejamento composto central rotacional (DCCR). A significância dos parâmetros da equação, para cada variável resposta, foi avaliada pelo teste F, utilizando-se o *software Statistica 8.0* (STATSOFT, 2008). Para a modelagem, foi utilizado o erro puro, avaliando-se o ajuste da regressão, a 5% de probabilidade e a significância dos coeficientes, a 10%. Na falta de ajuste do modelo completo ( $P < 0,05$ ) para o desenvolvimento dos gráficos, foi avaliado o modelo considerando apenas os coeficientes significativos ( $P < 0,10$ ).

O experimento foi disposto em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para as análises microbiológicas o esquema fatorial foi 4x5x2, sendo quatro tratamentos em cinco tempos de armazenamento (0, 7, 14, 21 e 28 dias), em duas temperaturas de armazenamento (7 e 14 °C), com três repetições. Já para as análises físico-químicas, o esquema fatorial foi de 4x2, com quatro tratamentos e dois tempos e armazenamento (0 e 30 dias). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo a comparação entre as médias conduzida pelo teste de Tukey, a 5% de significância, utilizando-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Concentração mínima bactericida dos óleos essenciais e compostos majoritários

Os valores das concentrações mínimas bactericidas (CMB) são apresentados na Tabela 7. O óleo essencial de canela e seu composto majoritário cinamaldeído apresentaram os mesmos valores de CMB, sendo mais eficientes frente ao microrganismo *Clostridium sporogenes*. Em seguida, a menor CMB foi representada pelo óleo essencial de orégano, que se diferenciou do valor do seu composto majoritário. O carvacrol apresentou CMB mediana; o óleo essencial de cravo-da-índia e o composto eugenol apresentaram os maiores valores de CMB, sendo os menos eficientes para a inibição do microrganismo *Clostridium sporogenes*.

Tabela 7 Valores da concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais e compostos majoritários sobre *Clostridium sporogenes*

Óleos e compostos	CMB
Canela ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )	0,1%
Cravo ( <i>Syzygium aromaticum</i> )	0,6%
Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )	0,25%
Composto cinamaldeído	0,1%
Composto eugenol	0,6%
Composto carvacrol	0,4%

A concentração mínima bactericida é citada, pela maioria dos pesquisadores, como a medida do desempenho antimicrobiano dos óleos essenciais (BURT, 2004).

A atividade antibacteriana depende do tipo, da composição e da concentração da espécie ou do óleo essencial, da composição do substrato, do processamento e das condições de estocagem e do tipo do microrganismo em questão (BERTINI et al., 2005).

A diferença da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é explicada pelas diferenças em suas composições químicas. 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, como as alterações da membrana citoplasmática; perturbações sobre a força próton motriz, no fluxo de elétrons e no transporte ativo, e coagulação do conteúdo da célula. Nem todos esses mecanismos atingem alvos separados, podendo alguns ocorrer em consequência de outro mecanismo (BURT, 2004).

No trabalho de Rodrigues (2014) foi realizada a avaliação antimicrobiana de vários óleos essenciais frente ao microrganismo *C. botulinum* tipo E e o óleo essencial de cravo-botão apresentou CMB na concentração de 7%. Já os óleos essenciais de orégano e canela 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%. Verifica-se que as concentrações mínimas bactericidas dos óleos essenciais empregadas neste trabalho estão abaixo dos valores encontrados por esse autor, segundo o qual essa baixa concentração é viável para a indústria de alimento, podendo ser adicionada sem alterar de forma exagerada o sabor e aroma original dos produtos.

No trabalho de Hoffmann et al. (1999), todos os microrganismos testados mostraram-se sensíveis aos óleos essenciais de canela e menta, nas concentrações de 10,0% e 1,0%, assim como ao óleo essencial de cravo, na concentração de 10,0%. Tais resultados são semelhantes aos encontrados por Bayoumi (1992), confirmando a eficácia dos óleos de canela e cravo como agentes antimicrobianos.

De acordo com os resultados, foi observado que o óleo essencial de canela e o composto cinamaldeído apresentam relação mais direta na redução da população de *Clostridium sporogenes*, quando comparados com os demais óleos e compostos, tendo o óleo de cravo e o composto eugenol se apresentado menos eficientes.

#### **4.2 Concentração mínima bactericida da combinação de óleos essenciais e compostos majoritários**

Os óleos essenciais de canela e orégano, e seus respectivos compostos majoritários cinamaldeído e carvacrol, foram testados utilizando-se suas respectivas concentrações mínimas bactericidas (CMB), em combinações destes quatro componentes. Esses óleos e compostos foram selecionados, dentre os demais, uma vez que apresentaram menor concentração mínima bactericida frente ao microrganismo *Clostridium sporogenes*. As diferentes combinações de óleos essenciais e compostos majoritários utilizadas em cada ensaio são mostradas na Tabela 8.

Pode-se observar a ausência de crescimento nas combinações dos ensaios 5, 12, 15, 20 e 24. Nos demais ensaios, houve crescimento na maioria das repetições das combinações, não sendo observado sinergismo entre as respectivas porcentagens dos óleos e compostos majoritários empregadas.

Segundo Fu et al. (2007), quando são combinados dois óleos essenciais ou mais, há interação entre as diversas substâncias químicas, podendo ocorrer sinergismo. Algumas das combinações de óleos essenciais e compostos majoritários que foram testadas neste trabalho alcançaram a mesma atividade antibacteriana que cada composto isolado, porém, em concentrações mais baixas, o que pode sugerir menores efeitos nas alterações sensoriais nos alimentos.

Tabela 8 Ação de diferentes combinações de óleos essenciais sobre esporos de *C. perfringens*

Ensaio	Óleo de orégano (%)	Óleo de canela (%)	Composto carvacrol (%)	Composto cinamaldeído (%)	Resultados
1	0,09	0,05	0,10	0,05	+++
2	0,09	0,05	0,10	0,08	+++
3	0,09	0,05	0,22	0,05	+++
4	0,09	0,05	0,22	0,08	+++
<b>5</b>	<b>0,09</b>	<b>0,08</b>	<b>0,10</b>	<b>0,05</b>	---
6	0,09	0,08	0,10	0,08	+++
7	0,09	0,08	0,22	0,05	+++
8	0,09	0,08	0,22	0,08	-++
9	0,19	0,05	0,10	0,05	++-
10	0,19	0,05	0,10	0,08	+++
11	0,19	0,05	0,22	0,05	++-
12	0,19	0,05	0,22	0,08	---
13	0,19	0,08	0,10	0,05	-++
14	0,19	0,08	0,10	0,08	+++
15	0,19	0,08	0,22	0,05	---
16	0,19	0,08	0,22	0,08	+++
17	0,04	0,07	0,16	0,06	+++
18	0,25	0,07	0,16	0,06	+ - +
19	0,14	0,04	0,16	0,06	- - +
<b>20</b>	<b>0,14</b>	<b>0,10</b>	<b>0,16</b>	<b>0,06</b>	---
21	0,14	0,07	0,04	0,06	++-
22	0,14	0,07	0,29	0,06	++-
23	0,14	0,07	0,16	0,04	+ - -
24	0,14	0,07	0,16	0,09	---
25	0,14	0,07	0,16	0,06	++-

(-) Inibição de células vegetativas de *Clostridium sporogenes* pelos óleos essenciais e compostos majoritários (+) Crescimento de células vegetativas de *Clostridium sporogenes*. Ensaio com as proporções respectivas dos óleos de orégano, canela, compostos majoritários carvacrol e cinamaldeído. Ensaio em negrito: combinações escolhidas para serem adicionadas no apresentado

A análise dos componentes principais (PCA) é mostrada na Figura 5, na qual se pode observar que o óleo essencial de canela foi o que mais contribuiu para a inibição das células vegetativas de *Clostridium sporogenes*. Pode-se observar que a linha que representa o óleo essencial de canela se encontra mais distante da linha que representa a contagem do microrganismo.

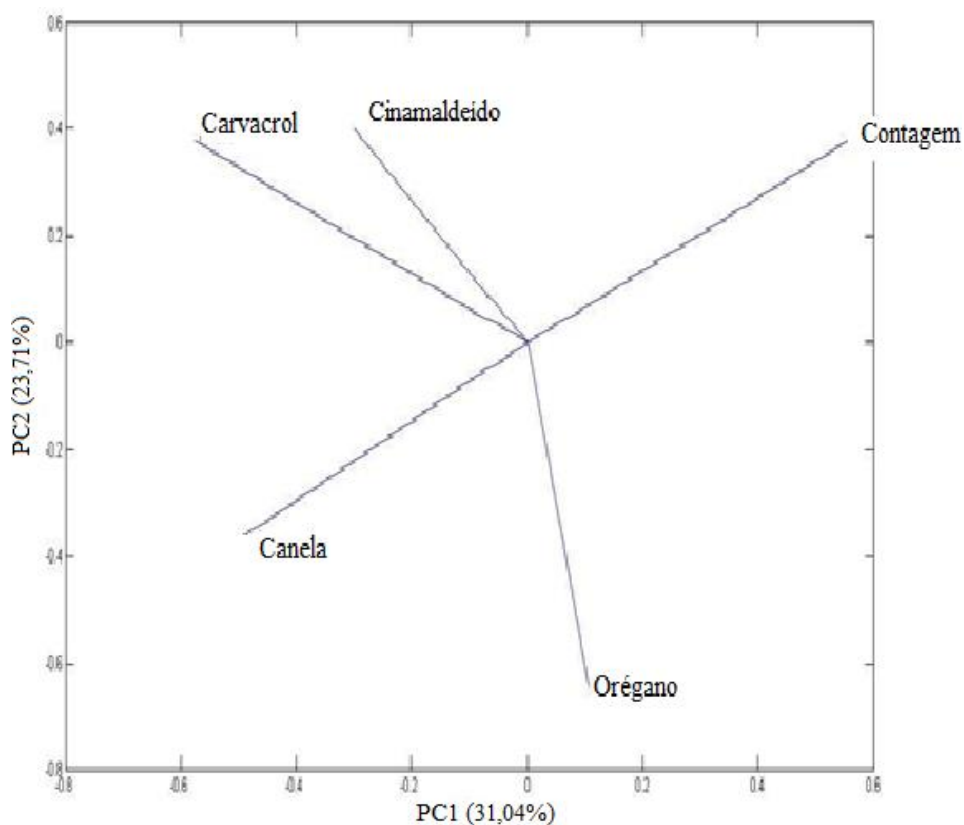


Figura 5 Pesos da análise de componente principais (PCA) das diferentes combinações dos óleos essenciais de canela e orégano, e os compostos cinamaldeído e carvacrol sobre células vegetativas de *Clostridium sporogenes*

Através da Tabela 9, pode-se observar que o modelo matemático completo não foi significativo ( $p > 0,10$ ), não sendo possível construir uma superfície de resposta em função da contagem de células vegetativas de *C. sporogenes* frente as concentrações de óleos essenciais e compostos majoritários. Apenas para o componente quadrático do óleo essencial de canela houve efeito significativo ( $p < 0,10$ ), indicando que esta variável afetou negativamente a contagem de células vegetativas de *C. sporogenes*, o que confirma os resultados já vistos nesse trabalho, onde o óleo essencial de canela foi aquele que apresentou o melhor efeito em relação a redução deste microrganismo.

Tabela 9 Coeficientes de regressão e p-valor para a contagem de células vegetativas de *Clostridium sporogenes* frente às diferentes combinações dos óleos essenciais e compostos majoritários

Fonte de variação	Coeficiente de regressão	p-valor
Média/Interação	2,3222	0,0001
A(linear)	-0,0911	0,5185
A(quadrática)	0,0771	0,6052
B(linear)	-0,2305	0,1182
<b>B(quadrática)</b>	<b>-0,2848</b>	<b>0,0735</b>
C(linear)	-0,1116	0,4312
C(quadrática)	-0,0113	0,9393
D(linear)	-0,1121	0,4288
D(quadrática)	-0,1485	0,3267
AxB(linear)	0,2143	0,2256
AxC (linear)	-0,2396	0,1786
AxD(linear)	-0,1299	0,4535
BxC(linear)	0,0954	0,5801
BxD(linear)	0,2760	0,1258
CxD(linear)	-0,1797	0,3050
R <sup>2</sup> =0,59		

A= óleo de orégano; B=óleo de canela; C=composto carvacrol; D=composto cinamaldeído. Negrito: valor significativo

Estudos demonstram que os óleos essenciais contendo carvacrol, timol e eugenol têm maior atividade antimicrobiana que outros óleos essenciais que não têm estes compostos (DIAS, 2011; OUATTARA et al., 1997). Porém, neste trabalho foi evidenciado que o óleo essencial de canela, contendo como principal composto o cinamaldeído, tem maior eficiência contra o microrganismo estudado. Entretanto, devido à variabilidade de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, observa-se que sua atividade antibacteriana não pode ser atribuída somente a um mecanismo específico, havendo diferentes alvos nos microrganismos (CARSON; MEE; RILEY, 2002).

Bakkali et al. (2008) afirmam que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é atribuída, principalmente, aos seus compostos majoritários. Entretanto, existem evidências de que componentes minoritários têm importante papel na atividade antimicrobiana do óleo essencial, promovendo ação sinérgica entre os demais (BURT, 2004).

Devido aos melhores resultados bactericidas encontrados e à menor concentração efetiva de óleo essencial e composto majoritário, foram selecionadas duas combinações (Ensaio 5 e 20) para serem adicionadas nos apresuntados. Fora elas: combinação 1: 0,085% óleo de canela, 0,19% óleo de orégano, 0,05% cinamaldeído e 0,22% carvacrol, e combinação 2: 0,1% óleo de canela, 0,14% óleo de orégano, 0,06% cinamaldeído e 0,16% carvacrol.



### 4.3 Contagem de células vegetativas de *C. sporogenes* em apresuntados

As médias da contagem do número de células vegetativas de *C. sporogenes* em Log UFC/g, de acordo com os tratamentos, tempos e temperaturas de armazenamento, estão representadas na Figura 6.

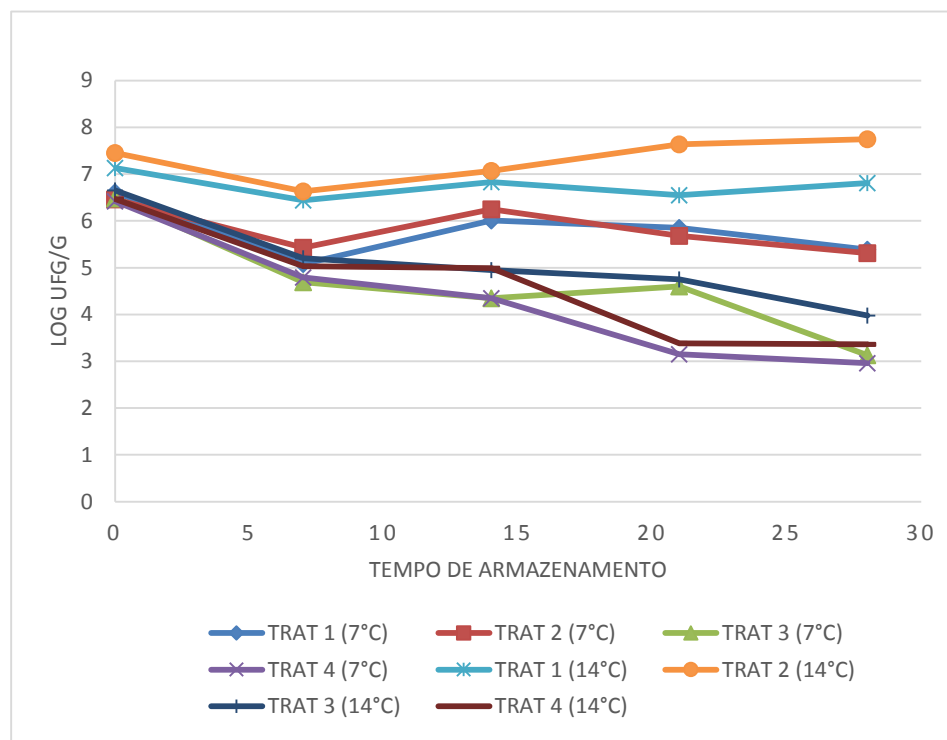


Figura 6 Contagem de células vegetativas (Log UFC/g) de *Clostridium sporogenes* em apresuntados armazenados por 28 dias

Foi observada interação significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos, tempos e temperaturas de armazenamento.

Em relação aos tratamentos, as contagens do microrganismo não se diferenciaram em relação aos tratamentos contendo as combinações de óleos essenciais (TRAT 3 e TRAT 4). Já para os controles, houve algumas diferenças

significativas na temperatura de armazenamento de 14 °C, no tempo 0, 21 e 28 dias. Pode-se observar que as maiores contagens de *C. sporogenes* foi para o controle contendo 75 ppm de nitrito (TRAT2); já as contagens dos demais tratamentos apresentaram valores similares, havendo apenas diferença no tempo 0, no qual o controle contendo 150 ppm de nitrito (TRAT 1) se diferenciou dos tratamentos contendo óleos essenciais e compostos majoritários na temperatura de 14 °C, apresentando uma maior contagem.

Devido à similaridade das contagens entre o controle contendo 150 ppm de nitrito (TRAT 1) e os tratamentos contendo óleos essenciais e compostos majoritários (TRAT 3 e TRAT 4), pode-se perceber que o nitrito teve ação contra o controle do microrganismo *C. sporogenes*, assim como os óleos e os compostos. Portanto, a diminuição do nível de nitrito em apresuntados, associada com a adição de compostos naturais como óleos essenciais e seus compostos majoritários, pode ser considerada uma alternativa viável para a elaboração desse tipo de produto cárneo.

Analisando-se a variável tempo, percebe-se que houve uma queda no crescimento da bactéria em relação ao tempo, nos tratamentos contendo óleos e compostos (TRAT 3 e TRAT 4), nos quais, a partir do tempo de 14 dias, a redução se tornou significativa, atingindo, ao final de 28 dias, redução de, aproximadamente, 3 ciclos log para o TRAT 3 e TRAT 4.

Houve um aumento na contagem de *C. sporogenes* nos dois controles analisados e apenas para o TRAT 2 ocorreu diferença significativa entre o primeiro tempo de armazenamento (tempo 0) e o último (tempo 28). Portanto, tem-se que os óleos essenciais e os compostos majoritários adicionados nos apresuntados foram eficientes para diminuir significativamente o número de células vegetativas de *Clostridium sporogenes*, ao longo de 28 dias de armazenamento.

Em relação à temperatura de armazenamento, a diferença significativa foi observada apenas em relação ao tratamento controle contendo 75 ppm de nitrito (TRAT 2), apresentando diferenças no tempo 0, 21 e 28 dias, quando as contagens na temperatura de 14 °C foram maiores. Nos demais tratamentos não foram observadas diferenças significativas em relação à temperatura de armazenamento, porém, é evidente que, na temperatura de 7 °C, as contagens de microrganismos foram menores, quando comparadas ao armazenamento em maior temperatura (14 °C).

Segundo Burt (2004) e Lis-Balchin, Steyrl e Krenn (2003), o alto teor de gordura presente em produtos cárneos tem efeito negativo sobre a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, devido à maior solubilidade dos óleos essenciais na parte lipídica do que na parte aquosa do alimento.

Ismaiel e Pierson (1990) avaliaram os efeitos dos óleos de cravo, tomilho, pimenta-preta, pimenta, orégano, alho, cebola e canela no crescimento e na germinação de *Clostridium botulinum*, tipos 33A, 40B e 1623E. Em 200 ppm, todos os óleos apresentaram alta inibição do crescimento de *Clostridium botulinum* (33A, 40B e 1623E). Em 10 ppm, a atividade inibitória de muitos óleos diminuiu. Com relação à atividade de crescimento de *Clostridium botulinum*, os óleos de canela, orégano e cravo mostraram-se muito ativos; os de pimenta e tomilho, ativos, e os de alho, cebola e pimenta-preta, pouco ativos. A efetividade na germinação foi totalmente diferente. A 150 e 200 ppm, todos os óleos preveniram completamente a germinação. Em 10 ppm, alho e cebola mostraram maior atividade que os outros óleos.

Moleyar e Narasimham (1992) pesquisaram a atividade antibacteriana de quinze óleos essenciais sobre bactérias gram-positivas, pela técnica de plaqueamento em ágar. O aldeído cinâmico foi o componente mais ativo, seguido por citral, geraniol, eugenol e mentol. Em 500 µg/mL, o aldeído cinâmico inibiu completamente o crescimento bacteriano por mais de 30 dias a

30 °C. A 25 e a 20 °C, a atividade antibacteriana de cinco óleos essenciais aumentou. A adição de cloreto de sódio a 4% no meio (p/v) não teve efeito na atividade inibitória do aldeído cinâmico. Em misturas de aldeído cinâmico e eugenol foi observado efeito aditivo.

Em estudos com *Bacillus cereus*, Ultee, Bennink e Moezelaar (2002) mostraram que o carvacrol interage com a membrana celular e dissolve na bicamada fosfolipídica, que é assumida para ser alinhada entre cadeias de ácidos graxos. Esta distorção da estrutura física causa a expansão e a desestabilização da membrana, de forma a aumentar a sua fluidez que, por sua vez, aumenta a permeabilidade passiva.

No trabalho de Cui, Gabriel e Nakano (2010), as atividades antibotulínicas de alguns extratos vegetais, isolados ou em combinação com nitrito ( $\text{NaNO}_2$ ), foram avaliadas. Extratos solúveis em água e etanol 99,5% de 90 tipos de ervas e especiarias frescas e desidratadas foram testados em um alimento cárneo modelo. Como resultado foi encontrado que a sinergia entre extratos de plantas e  $\text{NaNO}_2$  resultou em menor MIC. Assim, os dois aditivos têm repercussão significativa no controle da bactéria *Clostridium botulinum* em produtos de carnes processados.

Ultee, Bennink e Moezelaar (2002) levantara a hipótese de que o grupo hidroxila e a presença de um sistema de elétrons deslocalizados são importantes para a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos, tais como o carvacrol e o timol. Tal estrutura particular permitiria que esses compostos atuem como permutador de próton, reduzindo, assim, o gradiente através da membrana citoplasmática. O colapso resultante da força próton motriz e o esgotamento de ATP causam, eventualmente, a morte celular. Portanto, tem-se que o grupo hidroxila livre nos compostos aromáticos tem papel fundamental na inibição do crescimento de microrganismos.

No trabalho de Andrade et al. (2012), o óleo essencial de canela foi o mais efetivo na inibição do crescimento bacteriano. Esse resultado pode estar relacionado com a presença do componente majoritário aldeído cinâmico em elevada concentração (77,72%) nessa planta, em comparação com as outras plantas estudadas. De acordo com Burt (2004), o mecanismo de ação seria, portanto, semelhante ao de outros aldeídos, que é normalmente considerado aquele que provoca danos a lipídios e proteínas. Além das perturbações descritas para monoterpenoides, acredita-se que o grupo carbonila seja capaz de se ligar às proteínas, impedindo a ação das aminoácido decarboxilases.

Dias (2011), analisando a ação bactericida de diferentes combinações de óleos essenciais sobre o microrganismo *Clostridium perfringens* em mortadelas, verificou que houve crescimento deste microrganismo no primeiro dia de armazenamento em mortadelas com a adição de 150 e 75 ppm de nitrito de sódio, armazenadas a 25 °C. Porém, no mesmo período de tempo, nos tratamentos contendo diferentes combinações de óleos essenciais e 75 ppm de nitrito, houve redução do número de *C. perfringens*. Entre as combinações utilizadas, aquela contendo óleos essenciais de orégano, tomilho e cravo-da-índia promoveu a maior redução de *C. perfringens* no produto.

Atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre *Clostridium botulinum* tipo D inoculado em mortadela foi avaliada por Rodrigues (2014), que não encontrou 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 contendo 75 ppm de NO<sub>2</sub> e óleos essenciais de canela (0,17%), orégano (0,13%) e tomilho (0,17%) apresentou variação de 0,654 ciclos logarítmicos, comparado com o tratamento controle contendo 75 ppm de nitrito, no vigésimo dia de estocagem. Dentre os

tratamentos analisados, este foi aquele que promoveu o menor crescimento de *C. botulinum*, durante os dias de armazenamento.

#### 4.4 Contagem de esporos de *C. sporogenes* em apresuntados

Para a contagem de esporos de *C. sporogenes* não houve interação significativa ( $P > 0,05$ ) entre tempo, temperatura e tratamento.

A interação dos tratamentos com o tempo de armazenamento foi significativa ( $P < 0,05$ ). O resultado está ilustrado na Tabela 10. Pode-se observar que, durante os 14 dias de armazenamento, houve ausência de esporos nos tratamentos contendo óleos essenciais e compostos majoritários (TRAT3 e TRAT4). Já para os tratamentos controle (TRAT1 e TRAT2), a esporulação do microrganismo *Clostridium sporogenes* iniciou-se após 7 dias de armazenamento.

Não ocorreu diferença significativa entre os tempos de 0 e 7 dias de armazenamento, para todos os tratamentos, porém, a média de contagem de esporos no apresuntado controle contendo 75 ppm de nitrito (TRAT2) foi também similar à contagem obtida após 14 dias de armazenamento. Os apresuntados adicionados de óleos e composto (TRAT3 e TRAT4) não se diferenciaram em relação ao tempo de armazenamento.

No final de 28 dias de armazenamento foi observado um aumento no número de esporos do microrganismo *Clostridium sporogenes* em todos os tratamentos (TRAT 1, TRAT 2, TRAT 3 e TRAT 4). A maior média foi registrada no tratamento controle com menor adição de nitrito 75ppm (TRAT 2), enquanto as menores médias foram evidenciadas nos tratamentos contendo óleos essenciais e compostos majoritários (TRAT 3 e TRAT 4), os quais não se diferenciaram estatisticamente entre eles.

Somente no tempo de 28 dias de armazenamento o tratamento controle contendo 150 ppm de nitrito (TRAT 1) se diferenciou dos apresuntados adicionados das combinações (TRAT3 e TRAT4).

A combinação 1 (TRAT 3) foi o fator que mais influenciou os valores da contagem de esporos do *C. sporogenes* em apresuntados, tendo, no final dos 28 dias, uma melhor inibição do microrganismo.

Ambas as misturas de óleos essenciais promoveram a redução do crescimento de *C.sporogenes* nos apresuntados, porém, não foram capazes de inibir completamente os esporos ou apresentar atividade esporicida.

Tabela 10 Contagem do número de esporos (UFC/g) de *Clostridium sporogenes* em apresuntados armazenados por 28 dias

Tratamentos	Tempo de armazenamento				
	0 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
TRAT 1	0 <sup>aA</sup>	2,63 <sup>aA</sup>	2,64 <sup>abA</sup>	2,61 <sup>aA</sup>	3,17 <sup>bB</sup>
TRAT 2	0 <sup>aA</sup>	2,57 <sup>abAB</sup>	2,83 <sup>bcBC</sup>	3,04 <sup>cC</sup>	3,32 <sup>dD</sup>
TRAT 3	0 <sup>aA</sup>	0 <sup>aA</sup>	0 <sup>aA</sup>	2,11 <sup>aA</sup>	2,32 <sup>aA</sup>
TRAT 4	0 <sup>aA</sup>	0 <sup>aA</sup>	0 <sup>aA</sup>	2,32 <sup>aA</sup>	2,64 <sup>aA</sup>

TRAT 1: Controle: 150 ppm de nitrito; TRAT 2: Controle: 75 ppm de nitrito; TRAT 3: 75 ppm de nitrito+ 0,085 % óleo de canela, 0,19% óleo de orégano, 0,05% cinamaldeído, 0,22% carvacrol; TRAT 4: 75 ppm de nitrito +0,1% óleo de canela, 0,14% óleo de orégano, 0,06% cinamaldeído, 0,16% carvacrol; Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

A interação entre os tratamentos e a temperatura de armazenamento dos apresuntados também foi significativa ( $P < 0,05$ ). As médias estão dispostas na Tabela 11. Na temperatura de armazenamento de 7 °C houve diferença significativa entre a amostra contendo 75 ppm de nitrito (TRAT2) e as demais. Já para a temperatura de 14 °C, ambos os controles (TRAT1 e TRAT2) se diferenciaram das amostras contendo óleos essenciais e compostos majoritários,

tendo esses tratamentos (TRAT3 e TRAT4) apresentado menor contagem de esporos de *Clostridium sporogenes* em ambas as temperaturas de armazenamento.

Tabela 11 Contagem do número de esporos (UFC/g) de *Clostridium sporogenes* em apresuntados armazenados a 7 e a 14 °C

Tratamentos	Temperatura de armazenamento	
	7°C	14°C
TRAT 1	2,46 <sup>aA</sup>	2,91 <sup>bB</sup>
TRAT 2	2,82 <sup>bA</sup>	3,04 <sup>bB</sup>
TRAT 3	1,39 <sup>aA</sup>	2,04 <sup>aA</sup>
TRAT 4	1,55 <sup>aA</sup>	2,34 <sup>aA</sup>

TRAT 1: Controle: 150 ppm de nitrito; TRAT 2: Controle: 75 ppm de nitrito; TRAT 3: 75 ppm de nitrito+ 0,085 % óleo de canela, 0,19% óleo de orégano, 0,05% cinamaldeído, 0,22% carvacrol; TRAT 4: 75 ppm de nitrito +0,1% óleo de canela, 0,14% óleo de orégano, 0,06% cinamaldeído, 0,16% carvacrol; Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

A média do número de esporos na temperatura de armazenamento de 7°C foi menor, quando comparada com a quantidade de esporos presentes nas amostras armazenadas as 14 °C. Isso já era esperado, pois o emprego da refrigeração no processamento de alimentos age de maneira inibitória, pois, de modo geral, as reações químicas, enzimáticas e o crescimento microbiológico são inibidos com a redução da temperatura (ORDÓÑEZ, 2005).

O esporo é constituído por uma estrutura formada por um centro contendo o material genético da bactéria, envolvido por várias camadas de mucopeptídeos e capas externas de natureza proteica. A formação de esporos é importante para a microbiologia dos alimentos, pois estas estruturas são resistentes a calor, radiações ionizantes, compostos químicos, desidratação e congelamento (FRANCO; LANDGRAF, 2001).



Segundo Mitchell (2001), a esporulação é iniciada em resposta à escassez de nutrientes; outros fatores que podem alterar a esporulação são pH, oxigênio e temperatura. Em geral, a esporulação é favorecida por condições que resultem em redução da taxa de crescimento.

O botulismo é uma doença grave, considerada de emergência médica e de saúde pública. Mais comumente é adquirida pela ingestão de alimentos contaminados, tais como embutidos e conservas caseiras, que sofreram tratamento térmico inadequado ou foram armazenados em condições favoráveis à germinação dos esporos do *C. botulinum* presentes no alimento e à multiplicação do microrganismo, tendo como consequência a produção da toxina botulínica (CERESER et al., 2008).

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

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

No trabalho de Aleixo (2013), os óleos essenciais de orégano e cravo-da-índia, juntamente com o carvacrol, foram selecionados para avaliação em diferentes combinações frente ao microrganismo *Clostridium botulinum* tipo D. Todas as combinações testadas apresentaram ação esporicida.

#### 4.5 Nitrito residual

As médias dos valores encontrados para o nitrito residual das amostras de apresuntados elaboradas estão dispostas na Tabela 12. Foi observada interação significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos e o tempo de armazenamento, tendo o tratamento controle adicionado de 150 ppm de nitrito (TRAT 1) se diferenciado dos demais, os quais foram adicionados de 75 ppm de nitrito. Já em relação ao tempo de armazenamento, todos os tratamentos diferenciaram-se significativamente, tendo, ao final de 30 dias, ocorrido diminuição do valor de nitrito residual.

Tabela 12 Nitrito residual em apresuntados adicionados de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais e compostos majoritários

Tratamentos	Tempo de armazenamento	
	0 dias	30 dias
TRAT 1	135,27 <sup>bB</sup>	62,68 <sup>bA</sup>
TRAT 2	72,11 <sup>aB</sup>	43,69 <sup>aA</sup>
TRAT 3	71,77 <sup>aB</sup>	47,19 <sup>aA</sup>
TRAT 4	70,96 <sup>aB</sup>	47,66 <sup>aA</sup>

TRAT 1: Controle: 150 ppm de nitrito; TRAT 2: Controle: 75 ppm de nitrito; TRAT 3: 75 ppm de nitrito+ 0,085 % óleo de canela, 0,19% óleo de orégano, 0,05% cinamaldeído, 0,22% carvacrol; TRAT 4: 75 ppm de nitrito +0,1% óleo de canela, 0,14% óleo de orégano, 0,06% cinamaldeído, 0,16% carvacrol; Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

Foram visualizadas maiores concentrações de nitrito residual na amostra adicionada de maior valor de nitrito de sódio, fato coerente com a observação de Pérez-Rodríguez, Bosch-Bosch e Garcíá-Mata (1996) de que quanto maior a concentração de nitrito adicionado, maiores os valores de nitrito residual no produto.

Acredita-se que alguns componentes (presença de sal, componentes lipídicos, proteína, etc.) das formulações de produtos cárneos tenham influência nos níveis de nitrito residuais detectados (CASSENS et al., 1979).

O nitrito reage com diferentes constituintes químicos quando é adicionado em um sistema cárneo e, portanto, há uma redução significativa de nitrito residual ao término do processamento do produto (CHOI et al., 2014). Ao longo do período avaliado, todos os tratamentos diferiram, ou seja, o nível de nitrito reduziu progressivamente, independentemente da quantidade de óleos essenciais e compostos majoritários adicionados ou não.

O residual de nitrito após o processo de produção depende de vários fatores, como pH do meio, tempo entre a mistura do produto e o final do tratamento térmico, temperatura de acondicionamento do produto, carga microbiana presente na matéria-prima e adição de antioxidantes (PARDI et al., 1996). Segundo este autor, em torno de 10% do nitrito adicionado permanecem após 7 dias.

Segundo Honikel (2008) e Hustad et al. (1973), dois terços do nitrito são perdidos durante o período de tempo entre sua adição e o final do tratamento térmico, fato não observado neste trabalho, no qual a quantidade de nitrito residual encontrada na análise após 24 horas de processamento foi bastante próxima à quantidade de nitrito adicionada na elaboração dos apresuntados.

Amstalden, Serrano e Manhani (1997) avaliaram a formação de toxina botulínica em mortadela e presunto, os quais foram contaminados com 10 esporos/amostra (aproximadamente 14 esp./g) de *C. botulinum* tipos A e B, sendo os produtos armazenados à temperatura de 30 °C. Na formulação destes produtos foram adicionados 200 mg/kg de nitrito de sódio e 500 mg/kg de eritorbato de sódio. Como resultado, os autores verificaram que não foi evidenciada toxina botulínica nas amostras de mortadela após 28 dias de estocagem a 30 °C, sendo, neste período, o residual de nitrito igual a 1,6 mg/kg.

Para o presunto, após 12 dias de estocagem a 30 °C, ocorreu o aparecimento da toxina botulínica em uma amostra, quando o residual de nitrito atingiu o nível zero.

Em estudos feitos por Honikel (2008) em salsichas armazenadas à temperatura de +2 °C, durante 60 dias, nas quais foram adicionadas diferentes quantidades de nitrito, demonstrou-se que 65% do nitrito adicionado foram reduzidos durante o período de tempo que compreendeu a adição do mesmo até o final do tratamento térmico. Neste mesmo estudo, foi verificado que, após 20 dias de armazenamento do produto, restou apenas um terço da concentração presente após o final do tratamento térmico.

Pérez-Rodríguez, Bosch-Bosch e Garcíá-Mata (1996) relataram que cerca de 50% do nitrito adicionado podem ser detectados como nitrito residual e de 10% a 15% como nitrato, em salsichas tipo Frankfurt, mesmo após duas semanas de estocagem refrigerada (3 °C). Após 12 dias de armazenamento refrigerado (3 °C), os mesmos autores observaram valores residuais próximos de 40, 50 e pouco abaixo de 150 ppm, para amostras adicionadas de 75, 125 e 250 ppm de nitrito, respectivamente.

Dias (2011), analisando mortadelas adicionadas de óleos essenciais, observou que, após vinte dias de armazenamento, 4,79% de nitrito permaneceram no produto que foi fabricado com 150 ppm de nitrito; 6,63% de nitrito permaneceram nas mortadelas fabricadas com 75 ppm de nitrito e uma média de 23,25% permaneceu nas mortadelas contendo 75 ppm de nitrito e óleos essenciais.

Observa-se que, neste trabalho, a redução de nitrito residual apresentou-se baixa após 30 dias de armazenamento, observando-se uma redução de, aproximadamente, 54% para o controle adicionado inicialmente com 150 ppm de nitrito (TRAT 1), 39% de redução para o controle adicionado inicialmente de 75 ppm (TRAT 2) e, para os apresuntados adicionados inicialmente de 75 ppm

com adição de diferentes combinações de óleos essenciais e compostos majoritários, houve redução de 34% para o TRAT 3 e 32% para o TRAT 4.

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

Foi observado que a adição de óleos essenciais e compostos majoritários não contribui para a manutenção de nitrito residual entre as amostras, e os tratamentos com adição desses componentes (TRAT 3 e 4) não se diferenciou significativamente em relação ao tratamento controle adicionado da mesma quantidade de nitrito (TRAT 2).

As concentrações de nitrito necessárias para a ocorrência dos diversos efeitos nos produtos cárneos seriam de 30 a 50ppm, para o desenvolvimento de cor; de 20 a 40ppm para o desenvolvimento de aroma (MÜLLER, 1991) e entre 20 a 50 ppm para o efeito antioxidante e esses valores dependem do tipo de produto cárneo (LÜCKE, 2000). Em todos os tratamentos, as concentrações de nitrito permitem o desenvolvimento dos três efeitos (cor, aroma e antioxidante).

No *Clostridium botulinum*, o nitrito reage nas ligações ferro-enxofre de algumas proteínas, como, por exemplo, ferredoxina, para formar complexos ferro-óxido nitrosos, inibindo o sistema fosforoclástico, o qual envolve a conversão do piruvato a acetil-fosfato, a transferência de elétrons e a síntese de ATP (CAMMACK et al., 1999).

Cui, Gabriel e Nakano (2010) avaliaram os efeitos antimicrobianos de extratos de plantas combinados com  $\text{NaNO}_2$  contra o microrganismo *C. botulinum* e encontraram um efeito sinérgico entre os componentes, sugerindo a utilização da combinação de extrato de plantas e nitrito de sódio no controle deste microrganismo.

#### 4.6 pH

Não houve diferença significativa entre nenhum dos parâmetros analisados para o índice de pH; a média do pH dos tratamentos no tempo 0 foi de 6,28 e, para o tempo de 30 dias de armazenamento, a média foi de 6,25.

A bactéria *Clostridium botulinum*, causadora do botulismo, e de grande importância em produtos cárneos, se multiplica em pH acima de 4,5 (SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM INDUSTRIAL - SENAI, 2000), portanto, os apresuntados elaborados apresentam uma faixa de pH favorável para o desenvolvimento dessa bactéria causadora de intoxicação alimentar, além do crescimento da bactéria *Clostridium sporogenes*, que tem similaridade genética com o *C. botulinum*

#### 4.7 Oxidação lipídica (índice de TBARs)

Os valores da oxidação lipídica dos apresuntados estão demonstrados na Tabela 13, não tendo sido observada interação significativa ( $P > 0,05$ ) entre os dias de armazenamento e os tratamentos do apresuntado. Entretanto, houve efeito significativo ( $P < 0,05$ ) isolado dos tratamentos e do tempo, sendo os resultados analisados separadamente.

Os tratamentos apresentaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre si. Ocorreu diferença discrepante entre os tratamentos controles (TRAT 1 e TRAT 2) e os tratamentos contendo as combinações de óleos essenciais e compostos majoritários (TRAT 3 e TRAT 4), tendo os controles apresentado um valor bastante reduzido do índice de TBARs.

Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para o tempo de armazenamento das amostras. Após 30 dias, ocorreu um incremento no valor de oxidação lipídica somente para o tratamento contendo a combinação 2 de óleos essenciais e compostos majoritários (TRAT 4).

Tabela 13 Valores do índice de TBARs (mg MA/kg) em apresuntados adicionados de óleos essenciais e compostos majoritários armazenados durante 30 dias

Tratamentos	Tempo de armazenamento	
	0 dias	30 dias
TRAT 1	0,03 <sup>aA</sup>	0,05 <sup>aA</sup>
TRAT 2	0,04 <sup>aA</sup>	0,06 <sup>aA</sup>
TRAT 3	0,71 <sup>bA</sup>	0,86 <sup>bA</sup>
TRAT 4	0,69 <sup>bA</sup>	0,92 <sup>bB</sup>

TRAT 1: Controle: 150 ppm de nitrito; TRAT 2: Controle: 75 ppm de nitrito; TRAT 3: 75 ppm de nitrito+ 0,085 % óleo de canela, 0,19% óleo de orégano, 0,05% cinamaldeído, 0,22% carvacrol; TRAT 4: 75 ppm de nitrito +0,1% óleo de canela, 0,14% óleo de orégano, 0,06% cinamaldeído, 0,16% carvacrol. Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

A atividade antioxidante (capacidade ou potencial antioxidante) é um parâmetro utilizado vastamente (em conjunto com outros) para caracterizar diferentes materiais biológicos. Esta atividade está relacionada com compostos capazes de proteger um sistema biológico contra os efeitos danosos de processos ou reações que causam oxidação excessiva, envolvendo espécies reativas de oxigênio (ARNAO, 2000).

Os valores de índice TBAR demonstram que, para o tratamento com maior concentração de nitrito sem adição de óleo essencial e composto majoritário (TRAT 1), foram observados índices inferiores de TBARs, enquanto o TRAT 4 (0,1% óleo de canela, 0,14% óleo de orégano, 0,06% cinamaldeído, 0,16% carvacrol) , ao final de 30 dias de estocagem, apresentou maior oxidação lipídica dentre todas as amostras .

Os aromas de ranço em carnes são, inicialmente, detectados em valores de 0,5 a 2,0 mg malonaldeído/kg de carne (O'NEILL et al., 1998). Valores de TBARS até 1,59 mg de aldeído malônico/kg de amostra são considerados baixos para serem percebidos por análise sensorial e não causam alarme para a saúde do ser humano (TORRES; OKANI, 2000).

Ao optar pelo teste de TBA, deve-se conhecer a composição em ácidos graxos do alimento em análise, uma vez que o teste mede a extensão da oxidação de lipídios com três ou mais duplas ligações. Para sistemas mais complexos, em que estão presentes misturas de constituintes, a medida de TBA tem apenas significado qualitativo e comparativo (DAHLE; HILL; HOLMAN, 1962).

Portanto, neste trabalho pode ter ocorrido a interação dos componentes presentes nos óleos essenciais e compostos majoritários, havendo a possibilidade de os aldeídos e outros constituintes dos óleos e compostos terem sido também quantificados no teste de TBA, explicando o alto nível de oxidação lipídica nos apresentados contendo misturas de óleos essenciais e compostos majoritários.

Por outro lado, a teoria de que o óleo essencial tem ação pró-oxidante ao invés de antioxidante também pode ser confirmada neste trabalho. Em estudos *in vitro* tem sido demonstrado que, em doses elevadas de  $\alpha$ -tocoferol, este pode agir como pró-oxidante, caso não haja concentrações equivalentes de outros antioxidantes para regenerar o radical  $\alpha$ -tocoferila a  $\alpha$ -tocoferol (MUNTEANU; ZINGG; AZZI, 2004).

Os trabalhos de Aleixo (2013), Dias (2011) 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.

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



#### 4.8 Atividade de água

De acordo com o tempo de armazenamento, foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nas amostras analisadas no tempo 0 e 30 dias. No tempo 0, a média dos valores de atividade de água dos apresuntados foi de 0,95 e, ao final do armazenamento, houve um aumento na atividade de água de todos os tratamentos, tendo a média sido de 0,97.

Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos e a interação dos tratamentos com o tempo de armazenamento não se apresentou significativa ( $P > 0,05$ ). Assim, tem-se que a adição de óleos essenciais e compostos majoritários nos apresuntados não interferiu significativamente na atividade de água do produto, e os tratamentos controles (TRAT 1 e TRAT 2) não se diferenciaram dos tratamentos contendo óleos e compostos (TRAT 3 e TRAT 4).

Quanto menor o teor de água livre, em comparação com a água combinada (ou *água ligada*) de um alimento, tanto melhor para a sua segurança, evitando o crescimento de microrganismos indesejáveis ou daqueles que possam, ainda, causar danos à saúde pública. Assim, alimentos que retêm água com certa estabilidade aumentam as chances de prolongar sua vida útil (KATZ, 1997).

A maioria dos alimentos apresenta uma  $A_w$  acima de 0,95 e a maioria das bactérias, leveduras e bolores crescerá acima deste ponto. Os esporos de *Clostridium botulinum* são, geralmente, inibidos em uma  $A_w$  ao redor de 0,93 ou menos (INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - ITAL, 1990).

Segundo Ribeiro e Saravalli (2004), os produtos cárneos curados cozidos são alimentos de alta atividade de água, o que favorece o crescimento de microrganismos.

O *Clostridium botulinum*, causador do botulismo, é uma bactéria com formato de bastão, gram-positivo, produtora de esporos e de toxina, multiplica-se na ausência de oxigênio e em atividade de água superior a 0,92 (SENAI, 2000). Portanto, a atividade de água encontrada nas amostras de apresuntado elaborados se situa dentro da faixa de desenvolvimento deste microrganismo, bem como o desenvolvimento do *C. sporogenes*.

## 4.9 Cor

### 4.9.1 Luminosidade (L\*), índice vermelho (a\*), índice amarelo (b\*)

A luminosidade (L\*) caracteriza o grau de claridade da cor, variando do preto para o branco, indo de 0 (escuro) a 100 (claro) (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Durante o período de armazenamento não foram observadas alterações significativas ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos, mostrando a não influência dos óleos essenciais em relação à luminosidade dos apresuntados. Não se observou interação significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos e o tempo de estocagem dos apresuntados. Já para o parâmetro tempo houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ), tendo todos os tratamentos apresentado um aumento de luminosidade ao longo do armazenamento, com média do valor L\* de 61,77 para o tempo 0 e de 66,74, para o tempo de 30 dias.

Assim, os apresuntados, ao final de 30 dias de armazenamento, apresentaram cor mais clara, quando comparados com os apresuntados recém-produzidos armazenados por 24 horas.

Tem-se que o TRAT 4, com adição da segunda combinação de óleos essenciais e compostos majoritários, apresentou a menor média, o que significa que ele manteve por mais tempo a coloração em relação ao parâmetro L\*.

Scarpa et al. (2009) avaliaram a aceitação de produtos comerciais curados, observando que a luminosidade foi o atributo de cor que mais influenciou a aceitação do produto, sendo as amostras mais claras as preferidas.

A luminosidade é o parâmetro que melhor informa a intensidade visual da cor rósea, sendo o parâmetro de cor que governa a qualidade da carne e de produtos cárneos (BREWER et al., 2001).

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 (RAMOS; GOMIDE, 2007). O parâmetro  $a^*$  é o mais sensível gerado pela análise instrumental de cor e, ao caracterizar a cor vermelha, avalia a estabilidade de produtos cárneos (GARCIA-ESTEBAN, 2003).

Não foi observada diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos, não tendo o valor do índice vermelho se diferenciado estatisticamente entre as amostras controle e aquelas adicionadas de óleos essenciais e compostos majoritários.

Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre o tempo de armazenamento, no entanto, a interação entre os tratamentos e o tempo de armazenamento não foi significativa ( $P > 0,05$ ). Observa-se que os valores de índice  $a^*$  aumentaram, após trinta dias de armazenamento, em todos os tratamentos. Após 24 horas de processamento (tempo 0), a média do índice  $a^*$  foi igual a 5,79; já após 30 dias, a média aumentou para 10,61.

O índice de amarelo ( $b^*$ ) representa tonalidade que vai do azul (valores negativos) ao amarelo (valores positivos) (RAMOS; GOMIDE, 2007). As variações do índice  $b^*$  dos apresuntados armazenados sob refrigeração a 4 °C, por 30 dias, estão apresentados na Tabela 14.

Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos, tendo os tratamentos controle (TRAT 1 e TRAT 2) se diferenciado dos tratamentos contendo óleos essenciais e compostos majoritários (TRAT 3 e 4). Os resultados mostram que os tratamentos controle apresentaram menores valores do índice  $b^*$ , em ambos os tempos de armazenamento, quando comparados com os demais.

Em relação ao tempo de armazenamento houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ). As amostras armazenadas durante o período de 30 dias apresentaram incremento no valor do índice  $b^*$ , portanto, mais próximas à cor amarela, quando comparadas com os apresentados analisados após 24 horas de processamento (tempo 0).

A interação dos tratamentos e do tempo de armazenamento não se apresentou significativa ( $P > 0,05$ ).

Tabela 14 Valores de índice amarelo ( $b^*$ ) em apresentados adicionados de óleos essenciais e compostos majoritários armazenados durante 30 dias

Tratamentos	Tempo de armazenamento	
	0 dias	30 dias
TRAT 1	9,21 <sup>aA</sup>	11,04 <sup>aB</sup>
TRAT 2	10,14 <sup>aA</sup>	11,07 <sup>aB</sup>
TRAT 3	11,92 <sup>bA</sup>	15,39 <sup>bB</sup>
TRAT 4	11,76 <sup>bA</sup>	14,12 <sup>bB</sup>

TRAT 1: Controle: 150 ppm de nitrito; TRAT 2: Controle: 75 ppm de nitrito; TRAT 3: 75 ppm de nitrito+ 0,085 % óleo de canela, 0,19% óleo de orégano, 0,05% cinamaldeído, 0,22% carvacrol; TRAT 4: 75 ppm de nitrito +0,1% óleo de canela, 0,14% óleo de orégano, 0,06% cinamaldeído, 0,16% carvacrol; Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

Dias (2011) concluiu, em sua pesquisa com produto cárneo mortadela, que a utilização de óleos essenciais (orégano, tomilho, cravo-da-índia e capim-limão) promoveu alterações sensoriais indesejáveis no produto, como o aumento do índice de amarelo ( $b^*$ ).

#### 4.9.2 Índice de saturação (C\*)

O índice de saturação (C\*) corresponde à intensidade ou à quantidade de uma tonalidade (RAMOS; GOMIDE, 2007). Não se observou diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos e a interação tempo e tratamento também não foi significativa. Portanto, o uso de óleos essenciais e compostos majoritários não foi um fator de influência no índice de saturação dos apresentados.

Houve diferença significativa ( $P<0,05$ ) somente para o tempo de armazenamento das amostras, tendo a média dos valores do índice de saturação no tempo zero sido de 12,26 e, ao final de 30 dias de armazenamento, a média do índice de saturação aumentou para todos os tratamentos, sendo igual a 16,82.

As cores que apresentam baixo valor de saturação são chamadas de pálidas ou acinzentadas, enquanto aquelas com alto valor de saturação são denominadas saturadas (RAMOS; GOMIDE, 2007). Chinait et al. (2009), ao avaliarem diferentes marcas de apresentados comerciais, reportaram as seguintes variações nos valores do índice  $C^* = 18,71$  a  $22,92$ . Os apresentados elaborados obtiveram, em geral, menores valores de  $C^*$ , se apresentando com cores menos intensas, o que pode ser explicado pelas diferenças nas matérias-primas cárneas e ingredientes utilizados.

#### 4.9.3 Ângulo de tonalidade

O ângulo de tonalidade ( $h^*$ ) é representado como a grandeza que caracteriza a qualidade da cor (vermelho, verde, amarelo e azul), permitindo diferenciá-la (RAMOS; GOMIDE, 2007). Os valores médios de tonalidade dos apresentados com diferentes formulações e armazenados por 30 dias, a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , estão ilustrados na Tabela 15.

A interação entre tempo e tratamentos das amostras de apresuntados não foi significativa ( $P>0,05$ ).

Em relação aos tratamentos, houve diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre os apresuntados, não havendo uma diferença concisa entre os tratamentos controle (TRAT 1 e 2), quando comparados com os tratamentos com a adição de óleos essenciais e compostos majoritários (TRAT 3 e 4). Os dois controles não apresentaram diferença em relação ao ângulo de tonalidade. O TRAT 4, no tempo 0, não se diferenciou dos controles, apresentando também similaridade com o TRAT 3. Já para o tempo 30, o TRAT 3 se diferenciou dos tratamentos controle quanto ao ângulo de tonalidade, não apresentando diferença em relação ao TRAT 4.

Foi observada diferença significativa ( $P<0,05$ ) em relação ao tempo de armazenamento dos apresuntados, havendo uma redução do índice de tonalidade ao final dos 30 dias de estocagem.

Tabela 15 Valores do índice de tonalidade ( $h^*$ ) em apresuntados adicionados de óleos essenciais e compostos majoritários armazenados durante 30 dias

Tratamentos	Tempo de armazenamento	
	0 dias	30 dias
TRAT 1	56,67 <sup>Aa</sup>	43,73 <sup>aB</sup>
TRAT 2	60,53 <sup>abA</sup>	44,87 <sup>abB</sup>
TRAT 3	65,78 <sup>bA</sup>	58,87 <sup>cB</sup>
TRAT 4	63,53 <sup>abA</sup>	53,56 <sup>bcB</sup>

TRAT 1: Controle: 150 ppm de nitrito; TRAT 2: Controle: 75 ppm de nitrito; TRAT 3: 75 ppm de nitrito+ 0,085 % óleo de canela, 0,19% óleo de orégano, 0,05% cinamaldeído, 0,22% carvacrol; TRAT 4: 75 ppm de nitrito +0,1% óleo de canela, 0,14% óleo de orégano, 0,06% cinamaldeído, 0,16% carvacrol; Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

Pode-se observar que os tratamentos com adição de óleos essenciais e compostos majoritários obtiveram maiores medias do índice  $h^*$ , indicando maior participação da tonalidade nos apresuntados, quando comparados com as formulações controles.

Quando se comparam os índices de tonalidade com os valores de índice  $b^*$ , observa-se que a adição de óleos e compostos majoritários contribuiu para um aumento do índice de amarelo ( $b^*$ ). Estas alterações são evidenciadas pelo aumento do ângulo de tonalidade ( $h^*$ ) do produto, indicando maior participação da tonalidade de amarelo.

#### **4.9.4 Diferença global**

A diferença global de cor ( $\Delta E^*$ ) foi utilizada para comparar a cor de todos os tratamentos, no início e no fim do armazenamento, e também para comparar a cor entre os tratamentos com adição de óleo essencial (TRAT 3 E TRAT 4) com os dois tratamentos controles (TRAT 1 e TRAT 2).

A diferença global de cor não foi afetada significativamente ( $P>0,05$ ), quando compara-se os apresuntados no início (0 dias) e fim do armazenamento (30 dias), tendo a média sido de 8,28.

A diferença global de cor entre os tratamentos com adição de óleo essencial (TRAT 3 E TRAT 4) com o controle contendo 150 ppm de nitrito (TRAT 1) também não foi afetada significativamente. A média da diferença global de cor para o TRAT 3 foi de 4,55 e, para o TRAT 4, a média foi de 3,71.

Comparando-se a diferença global de cor entre os tratamentos com adição de óleo essencial (TRAT 3 E TRAT 4) com o controle contendo 75 ppm de nitrito (TRAT 2), constatou-se que não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos. É possível observar diferença significativa ( $P<0,05$ ) em relação ao tempo de armazenamento, tendo a diferença global de

cor das amostras no tempo 0 se apresentado menor, quando comparada com a diferença global no final de 30 dias de armazenamento. Os dados estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 Valores da diferença global ( $\Delta E^*$ ) entre os tratamentos, quando comparados com o controle em apresuntados adicionados de óleos essenciais e compostos majoritários

Tratamentos	Tempo de armazenamento	
	0 dias	30 dias
TRAT 3	3,26 <sup>a</sup>	5,71 <sup>b</sup>
TRAT 4	2,43 <sup>a</sup>	4,38 <sup>b</sup>

TRAT 3: 75 ppm de nitrito+ 0,085 % óleo de canela, 0,19% óleo de orégano, 0,05% cinamaldeído, 0,22% carvacrol; TRAT 4: 75 ppm de nitrito +0,1% óleo de canela, 0,14% óleo de orégano, 0,06% cinamaldeído, 0,16% carvacrol; Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ), pelo teste de Tukey

Existem valores de delta associados a esta escala de cor ( $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  e  $\Delta b^*$ ) para indicar o quanto a amostra diferiu do padrão para  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , e são frequentemente utilizados no controle de qualidade e ajustes de formulação, além de serem utilizados para o cálculo da diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) (HUNTERLAB, 1996). Neste trabalho utilizaram-se três padrões: amostras recém-formuladas (tempo 0) e duas amostras controle, sem adição de óleos essenciais e compostos majoritários, contendo 75 e 150 ppm de nitrito.

Segundo Obon et al. (2009), valores de 0,5 a 1,5 são considerados muito pequenos e o olho humano poderia detectar diferenças apenas partir de 1,5, sendo diferenças acima de 5 evidentemente perceptíveis.

Segundo essa escala, todos os apresuntados contendo óleos e compostos, após 30 dias de armazenamento, se apresentaram diferentes dos controles. Quando se compara a diferença global de cor em relação ao tempo de armazenamento (0 e 30 dias), observam-se valores altos ( $>5$ ), evidenciando uma



diferença altamente perceptível na cor entre as amostras de apresuntados analisadas no tempo 0 e no final da estocagem.

Portanto, a diferença global de cor dos apresuntados pode ser perceptível pelo consumidor e esta percepção fica mais evidente após 30 dias de armazenamento.

## 5 CONCLUSÃO

O óleo essencial de canela e seu composto majoritário, o cinamaldeído, foram os mais eficientes para a inibição das células vegetativas do *C. sporogenes*, apresentando menor CMB.

O efeito sinérgico entre as combinações de óleos essenciais e compostos majoritários foi observado. No entanto, a adição de óleos essenciais e compostos não pode fornecer proteção completa contra *Clostridium sporogenes* em apresuntados, podendo estes produtos naturais serem utilizados para aumentar a "barreira" antibacteriana, contribuindo para a redução significativa do microrganismo *C. sporogenes* e atraso na esporulação deste microrganismo.

A aplicação de óleos essenciais e de compostos majoritários nos apresuntados não contribui para a manutenção de nitrito residual entre as amostras, além de aumentar o teor de oxidação lipídica nos apresuntados.

Todos os tratamentos apresentaram um aumento de luminosidade (L\*), índice vermelho (a\*), índice amarelo (b\*) e saturação (C\*), ao longo do armazenamento; a tonalidade (h\*) diminuiu e apenas para o parâmetro b\* e a tonalidade h\* houve diferença significativa entre os tratamentos.

O pH de todos os apresuntados não se diferenciaram estatisticamente ao final do armazenamento. Houve um aumento na atividade de água de todos os tratamentos e ambos os valores de pH e atividade de água dos apresuntados estão na faixa ideal para o crescimento da bactéria *Clostridium sporogenes*. Portanto, a adição de óleos essenciais e compostos majoritários com atividade antimicrobiana em apresuntados é extremamente viável, visto que estes compostos podem substituir conservantes sintéticos e promover a inibição de microrganismos.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multidrug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 74, n. 2, p. 113-23, Feb. 2001.

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

ALMEIDA, J. R. G. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, p. 638-641, 2006. Suplemento.

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

ANDRADE, M. A. et al. 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, R. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de nitrato, nitrito e n-nitrosaminas em produtos cárneos**. 2004. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

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

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 11, n. 3, p. 419-421, 2000.

ARRUDA, T. A. et al. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 307-311, jul./set. 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16<sup>th</sup> ed. Virginia, 1998.

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

BALAGUER, M. P. et al. Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 166, n. 3, p. 369-377, Sept. 2013.

BANG, K. H. et al. Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 64, n. 5, p. 1061-1063, Jan. 2000.

BASER, K. H. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 14, n. 24, p. 3106-3119, Oct. 2008.

BAYOMI, S. Bacteriostatic effect of some spices and their utilization in the manufacture of yoghurt. **Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel**, Paris, v. 14, n. 1/2, p. 21-26, 1992.

BENARROZ, M. O. et al. Effects of *Cinnamomum zeylanicum* treatment on radiolabelling of blood constituents and the morphometry of red blood cells in Wistar rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, p. 143-149, Dec. 2008. Special issue.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Springer, 1999. 919 p.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 37, n. 2, p. 263-268, Mar. 2004.

BERGEY, D. H. et al. Genus I. Clostridium. In: \_\_\_\_\_. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9<sup>th</sup> ed. New York: Springer, 2009. v. 3, p. 738-828.

BERTINI, L. M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Revista Infarma**, Brasília, v. 17, n. 314, p. 80-83, 2005.

BETZ, J. V.; KENNETH, E.; ANDERSON. Isolation and characterization of bacteriophages active on *Clostridium sporogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 87, n. 2, p. 408-415, 1964.

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

BRASIL. Agência Internacional de Pesquisa do Câncer. **Portaria nº 240**, de 26 de outubro de 2015. IARC- Monografias para avaliar o consumo de carne vermelha e carne processada. Brasília, 2015. Disponível em: <[http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240\\_S.pdf](http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240_S.pdf)>. Acesso em: 25 fev. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 1004**, de 11 de dezembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos. Brasília, 1998. Disponível em: <<http://e legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=38>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Almôndega, de Apresuntado, de Fiambre, de Hambúrguer, de Kibe e de Presunto Cozido. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 149, p. 7-12, 3 ago. 2000. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 2**, de 15 de janeiro de 2007. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 21 jul. 2014.

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

BROWN, J. L.; TRAN-DINH, N.; CHAPMAN, B. *Clostridium sporogenes* PA 3679 and its uses in the derivation of thermal processing schedules for low-acid shelf-stable foods and as a research model for proteolytic *Clostridium botulinum*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 75, n. 4, p. 779-792, 2012.

BRUNT, J. et al. Functional characterisation of germinant receptors in clostridium botulinum and clostridium sporogenes presents novel insights into spore germination systems. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 10, n. 9, p. 1-14, Sept. 2014.

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

CAMMACK, R. et al. Review: nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, n. 1411, p. 475-488, 1999.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, June 2002.

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

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

CASSENS, R. G. et al. Reactions of nitrite in meat. **Food Technology**, Chicago, v. 33, n. 7, p. 46-57, 1979.

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

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 12, n. 5, p. 630-649, Jan. 2000.

CHINAIT, T. M. N. et al. Avaliação da cor objetiva de presuntos e apresuntados comerciais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 5., 2009, São Paulo. **Anais...** Campinas: ITAL, 2009. 1 CD-ROM.

CHOI, Y. M. et al. Combined effects of potassium lactate and calcium ascorbate as sodium chloride substitutes on the physicochemical and sensory characteristics of low-sodium frankfurter sausage. **Meat Science**, San Francisco, v. 96, n. 1, p. 21-25, Jan. 2014.

CHOW, C. K.; HONG, C. B. Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. **Toxicology**, Lenxington, v. 180, n. 2, p. 195-207, Nov. 2002.

CHUN, S. S. et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 2, p. 809-816, Feb. 2005.

CLAFFEY, N. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 30, n. S5, p. 22-24, June 2003.

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

CONNER, D. E. Naturally occurring compounds. In: DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. (Ed.). **Antimicrobials in foods**. New York: Dekker, 1993. p. 441-468.

COSENTINO, S. et al. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, p. 130-135, 1999.

COSTA, P. R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 357-369, 2000.

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

CUI, H.; GABRIEL, A. A.; NAKANO, H. Heat-sensitizing effects of plant extracts on *Clostridium spp.* Spores. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 1, p. 99-104, Jan. 2011.

DAFERERA, D. et al. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 6, p. 2576-2581, June 2000.

DAHLE, L. K.; HILL, E. G.; HOLMAN, R. T. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 98, n. 2, p. 253-261, Aug. 1962.

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.

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

DIAS, N. A. A. **Avaliações microbiológica e físico-química de mortadelas elaboradas com óleos essenciais e inoculadas com *Clostridium perfringens* tipo A**. 2011. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, Feb. 2000.

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

ELGAYYAR, M. et al. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 7, p. 1019-1024, July 2001.

FICHI, G. et al. Efficacy of an essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* against *Psoroptes cuniculi*. **Phytomedicine**, Jena, v. 14, n. 2/3, p. 223-231, Feb. 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Sodium Nitrate**. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/agn/jecfaadditives/specs/Monograph1/Additive-416.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2013.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2001. 192 p.



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.

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

GAYOSO, C. W. et al. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia cariophyllata* essential oil and eugenol. **Fitoterapia**, Milano, v. 76, n. 2, p. 247-249, Mar. 2005.

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

GREVER, A. B. G.; RUITER, A. Prevention of Clostridium Outgrowth heated and hermetically Sealed meat products by nitrite: a review. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 213, n. 3, p. 165-169, Sept. 2001.

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

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

GUIMARÃES, A. G. et al. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v. 107, n. 6, p. 949-957, Dec. 2010.

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

HECHT, S. S. Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 216, p. 181-191, 1997.

HILL, M. J. (Ed.). **Nitrates and nitrites in food and water**. Cambridge: Woodhead, 1996. 196 p.

HOFFMANN, F. L. et al. Determinação da atividade antimicrobiana "in vitro" de Quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 11-20, jan./jun. 1999.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, New York, v. 22, p. 273-292, 2005.

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

HUNTERLAB. **CIE L\*a\*b\* color scale**: applications note. 1996. Disponível em: <[http://www.hunterlab.com/color\\_theory.php](http://www.hunterlab.com/color_theory.php)>. Acesso em: 12 nov. 2015.

HUSTAD, G. O. et al. Effect of sodium nitrite and sodium nitrate on botulinal toxin production and nitrosamine formation in wieners. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 22-26, July 1973.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008/2009**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 jun. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Industrial Anual (PIA)**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 jun. 2011.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Metodologia de análise microbiológica de alimentos**. Campinas: ITAL, 1990. (Manual Técnico, 15).

ISMAIEL, A.; PIERSON, M. D. Inhibition of growth and germination of *C. botulinum* 33A, 40B, and 1623E by essential oil of spices. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 6, p. 1676-1678, 1990.

JANSSEN, A. M. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ducrosia anethifolia*. In: SVENDSEN, A. B.; SCHEFFER, J. J. C. (Ed.). **Essential oils and aromatic plants**. Dordrecht: M. Nijhoff, 1985. p. 213-216.

JAY, M. J.; LOESSNER, J. M.; GOLDEN, A. D. Protección de los alimentos con sustancias químicas y mediante biocontrol. In: \_\_\_\_\_. **Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 2005. p. 311-315.

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, n. 3, p. 285-290, May 2001.

KARBOWNIK, M. et al. Indole-3-propionic acid, a melatonin-related molecule, protects hepatic microsomal membranes from iron-induced oxidative damage: relevance to cancer reduction. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 81, n. 3, p. 507-513, 2001.

KATZ, F. The changing role of water binding. **Food Technology**, Oxford, v. 51, n. 10, p. 64-66, 1997.

KHATOUNIAN, C. A. **A reconstrução ecológica da agricultura**. Botucatu: Agroecológica, 2001. 348 p.

KIM, J. M. et al. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, p. 1364-1368, 1995.

KOEDUKA, T. et al. Enhancement of production of eugenol and its glycosides in transgenic aspen plants via genetic engineering. **Biochemical and Biophysical Research**, Amsterdam, v. 436, n. 1, p. 73-78, 2013.

KOKETSU, M. et al. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 101-108, set./dez. 1997.

KRIMER, N.; BASER, G. Tümen, Carvacrol rich plants in Turkey. **Chemistry of Natural Compounds**, New York, v. 31, p. 37-42, 1995.

KUBIAK, A. M. et al. Complete genome sequence of the nonpathogenic soil-dwelling bacterium *Clostridium Sporogenes* Strain NCIMB 10696. **Genome Announcements**, Washington, v. 3, n. 4, p. e00942-15, 2015.

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

LAGOURI, V. et al. Composition and antioxidant activity of essential oil from Oregano plants grown in Greece. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 197, p. 20-23, 1993.

LEE, K. G.; SHIBAMATO, T. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds. **Food Chemistry**, London, v. 74, n. 4, p. 443-448, 2001.

LEMOS, A. L. S. C.; YAMADA, E. A.; HAGUIWARA, M. M. H. **Processamento de embutidos cárneos**. Campinas: ITAL, 2008. 213 p.

LEUSCHNER, R.; ZAMPARINI, J. Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth model systems and mayonnaise. **Food Control**, Guildford, v. 13, n. 6/7, p. 399-404, Sept./Oct. 2002.

LI, Y. et al. Controlling lipid nanoemulsion digestion using nanolaminated biopolymer coatings. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 28, n. 3, p. 166-175, 2011.

LI, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of cosurfactant on the behavior of structured emulsions under simulated intestinal lipolysis conditions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 40, p. 96-103, Oct. 2014.

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica e óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LIMA, I. O. et al. Inhibitory action of some phytochemicals on yeasts potentially causing of opportunistic infections. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 199-203, abr./jun. 2005.

LIS-BALCHIN, M.; BUCHBAUER, G.; HIRTENLEHNER, T. Antimicrobial activity of Pelargonium essential oil added to a quiche filling as a model food system. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 27, p. 207-210, 1998.

LIS-BALCHIN, M.; STEYRL, H.; KRENN, E. The comparative effect of novel Pelargonium essential oils and their corresponding hydrosols as antimicrobial agents in a model food system. **Phytotherapy Research**, London, v. 17, n. 1, p. 60-65, Jan. 2003.

LÓPEZ-DÍAZ, T. M. et al. Effect of temperatura, water activity, pH and some antimicrobials on the growth of *Penicillium oslonii* isolated from the surface of Spanish fermented sausage. **Food Microbiology**, New York, v. 19, n. 1, p. 1-7, Feb. 2002.

LÜCKE, F. K. Use of nitrite and nitrate in the manufacture of meat products. **Fleischwirtschaft International**, Berlin, v. 4, n. 4, p. 38-41, 2000.

MATAN, N. et al. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 180-185, 2006.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 231-238, mar./abr. 2003.

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *S. aureus* em ricota cremosa**. 2004. 72 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

MENON, K.; GARG, S. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. **Food Microbiology**, New York, v. 18, n. 6, p. 647-650, Dec. 2001.

MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 295 p.

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

MOLEYAR, V.; NARASIMHAM, P. Antibacterial activity of essential oil components. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 16, n. 4, p. 337-342, 1992.

MOTTIN, V. D. **Avaliação microbiológica de apresetados, fatiados e comercializados em supermercados de Porto Alegre, RS**. 2008. 70 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

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.

MPOUNTOUKAS, P. et al. Cytogenetic study in culture human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 7, p. 2390-2393, July 2008.

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

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

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

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 247-256, Oct./Dec. 2000.

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

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

NIKAIDO, H. Outer membrane. In: NEIDHARDT, F. C. (Ed.). **Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology**. Washington: ASM, 1996. v. 1, p. 29-47.

NIKAIDO, H.; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. **Microbiology Reviews**, Haren, v. 49, p. 1-32, 1985.

NUNES, C. A.; PINHEIRO, A. C. M. **SensoMaker**. Version 1.0. Lavras: UFLA, 2012.

NUNES, X. P. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, p. 642-644, 2006. Suplemento.

ÓBON, J. M. et al. Production of redpurple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model system. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 90, p. 471-479, 2009.

OLIVEIRA, F. D. E. et al. Anti-ulcer activity of essential oil constituents. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 5, p. 5717-5747, May 2014.

OLIVEIRA, R. A. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

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

O'NEILL, L. M. et al. Comparison of effects of dietary olive oil, tallow and vitamin E on the quality of broiler meat products. **British Poultry Science**, London, v. 39, p. 365-371, 1998.

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

OUATTARA, B. et al. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 37, p. 155-162, 1997.

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

PARDI, M. C. et al. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Goiânia: UFG, 1996. v. 2, 1106 p.

PARDI, M. C. et al. Processamento tecnológico da carne. In: \_\_\_\_\_. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Goiânia: UFG, 1996. v. 2, p. 719-840.

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

PENNINGTON, J. A. T. Dietary nitrates exposure models for nitrates and nitrites. **Food Control**, Wageningen, v. 9, n. 6, p. 385-395, 1998.

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

PÉREZ-RODRÍGUEZ, M. L.; BOSCH-BOSCH, N.; GARCÍA-MATA, M. Monitoring nitrite and nitrate residues in frankfurters during processing and storage. **Meat Science**, Oxford, v. 44, n. 1/2, p. 65-73, Sept./Oct. 1996.

PETER, K. V. **Handbook of herbs and spices**. Cambridge: CRC, 2000. 319 p.

PIZZALE, L. et al. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 82, n. 8, p. 1645-1651, 2002.

PRIEFERT, H.; RABENHORST, J.; STEINBUCHER, A. Biotechnological production of vanillin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 56, n. 3, p. 296-314, Aug. 2001.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

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

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

RAMOS, E. M. et al. Otimização da avaliação objetiva da cor de presuntos e apresuntados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 5., 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**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 599 p.



RATLEDGE, C.; WILKINSON, S. G. An overview of microbial lipids. In: \_\_\_\_\_. **Microbial lipids**. London: Academic, 1988. p. 3-22.

REHDER, V. L. G. et al. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 2, p. 67-71, jan. 2004.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004. 184 p.

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

ROBERTS, S. K. et al. Calcium dependence of eugenol tolerance and toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 7, p. e102712, 2014.

ROÇA, R. O. **Cura de carnes**. Botucatu: UNESP, 2005. Disponível em: <[http://www.fca.unesp.br/outros/tcarne/textos/Roça\\_111.pdf](http://www.fca.unesp.br/outros/tcarne/textos/Roça_111.pdf)>. Acesso em: 10 nov. 2015.

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

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. 167-174, 2000.

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

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

SAMARASEKERA, R.; KALHARI, K. S.; WEERASINGHE, I. Mosquitocidal activity of leaf and bark essential oils of Ceylon *Cinnamomum zeylanicum*. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 17, n. 3, p. 301-303, Jan. 2005.

- SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 3-21, Mar. 2001.
- SAWAMURA, M. et al. Inhibitory effect of yuzu es-sential oil on the formation of N-nitrosodimethy lamine in vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 10, p. 4281-4287, Apr. 2005.
- SCARPA, A. B. O. et al. Caracterização de presuntos e apresuntados comerciais: avaliação sensorial e instrumental da cor. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 8., 2009, São Paulo. **Anais...** São Paulo: UNICAMP, 2009. 1 CD-ROM.
- SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, London, v. 112, n. 3, p. 654-658, 2009.
- SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM INDUSTRIAL. **Elementos de apoio para o sistema APPCC**. Rio de Janeiro, 2000. 361 p.
- SEYMOUR, R. Additional properties and uses of essential oils. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 30, n. S5, p. 19-21, June 2003.
- SGARBIERI, V. C. **Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento**. São Paulo: UNICAMP, 1987. 387 p.
- SHAH, B.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Nanocapsular dispersion of thymol for enhanced dispersibility and increased antimicrobial effectiveness against Escherichia coli O157: H7 and Listeria monocytogenes in model food systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 23, p. 8448-8453, Dec. 2012.
- SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology Review**, Haren, v. 59, p. 201-222, 1995.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, jan. 1999.
- SILVA, J. A. Ocorrência e controle de *clostridium botulinum* em produtos cárneos curados. **Revista Tecnológica e Ciências de Carnes**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 44-56, 1999.

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

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. p. 387-416.

SINDELAR, J. J.; MILKOWSKI, A. L. **Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curing and examining the risk/benefit of its use**. Champaign: American Meat Science Association, 2011. 14 p. (White Paper Series, 3).

SINGH, G. et al. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 9, p. 1650-1661, 2007.

SMITH, L. D. S. Las esporas. In: \_\_\_\_\_. **Botulismo, el microorganismo, sus toxinas, la enfermedad**. Zaragoza: Acribia, 1980. p. 62-80.

SMITH-PALMER, A. et al. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 118-122, Feb. 1998.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, jan. 2002.

SOKMEN, M. et al. In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 11, p. 3309-3312, Apr. 2004.

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

SOUZA, E. L. **Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.): uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos**. 2006. 141 p. Tese (Doutorado em Nutrição) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

SOUZA, E. L. et al. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 4, p. 549-558, July 2005.

STASOLFT. **Statistica**: data analysis software system. 2008.

STROTMANN, C. et al. Effect of different concentrations of carbon dioxide and oxygen on the growth of pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in ground pork packaged under modified atmospheres. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, n. 4, p. 845-849, Apr. 2008.

TORRES, E. A. F. S.; OKANI, E. T. **Teste de TBA**: ranço em alimentos. São Paulo: USP, 2000. 10 p. Trabalho original recebido do próprio autor.

TRAJANO, V. N.; SANTOS, B. H. C. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 1, p. 45-50, 2009.

TSIGARIDA, E.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G. J. E. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5<sup>0</sup>C. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, n. 6, p. 901-909, Dec. 2000.

VOLLMER, W.; HÖLTJE, J. V. The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer (s). **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n. 18, p. 5978-5987, 2004.

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

ULTEE, A. et al. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**, New York, v. 174, n. 4, p. 233-238, Apr. 2000.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Meat and meat products, technology, chemistry and microbiology**. London: Chapman & Hall, 1995. 430 p.

WENG, X. C.; WANG, W. Antioxidant activity of compounds isolated from *Salvia plebeia*. **Food Chemistry**, London, v. 71, n. 4, p. 489-493, Dec. 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ingested nitrate and nitrite and cyanobacterial peptide toxins, IARC monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans**. Lyon, 2010. 462 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Safety evaluation of certain food additives**: forty-fourth report of the Joint FAO/WHO Committee on Foods Additives. Geneva, 2003. (Food Additives Series, 50). Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je05.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

WOODS, L. F. J.; WOOD, J. M.; GIBBS, P. A. The involvement of nitric oxide in the inhibition of phosphoroclastic system in *Clostridium sporogenes* by sodium nitrite. **Journal of General Microbiology**, London, v. 125, p. 399-406, 1981.

YAMAZAKI, K. et al. Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. **Food Microbiology**, New York, v. 21, n. 3, p. 283-289, June 2004.

YIN, H. W. Yield and composition variation of essential oil from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira clones in Taiwan. **Quarterly Journal of Chinese Forestry**, Beijing, n. 24, p. 83-104, 1991.

ZADARNI, E.; DAZZI, G.; CHIZZOLINI, R. Comparative study on nitrite and nitrate ions determination. **Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma**, Parma, v. 12, p. 79-86, 2002.