



ALINE PEREIRA MARTINS

**ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS
NATURAIS SOBRE ENDÓSPOROS DE
Clostridium perfringens EM MORTADELAS**

LAVRAS - MG

2013

ALINE PEREIRA MARTINS

**ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS NATURAIS SOBRE
ENDÓSPOROS DE *Clostridium perfringens* EM MORTADELAS**

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

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Martins, Aline Pereira.

Atividade de antimicrobianos naturais sobre endósporos de
Clostridium perfringens em mortadelas / Aline Pereira Martins. –
Lavras : UFLA, 2013.

123 p. : il.

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

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Óleos essenciais. 2. Nisina. 3. Mortadela. 4. Bacteriologia. 5.
Aditivos naturais. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.9296

ALINE PEREIRA MARTINS

**ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS NATURAIS SOBRE
ENDÓSPOROS DE *Clostridium perfringens* EM MORTADELAS**

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

APROVADA em 28 de Fevereiro de 2013.

Dr. Alexandre Tourino Mendonça UNINCOR

Dr. Disney Ribeiro Dias UFLA

Dr. Eduardo Mendes Ramos UFLA

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

LAVRAS – MG

2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fonte de força, luz e fé.

Aos meus pais, Ana Maria Pereira Martins e Geraldo Gomes Martins de Souza, que sempre me apoiaram independente dos obstáculos que isso acarreta e pelo amor incondicional.

As minhas irmãs, Amanda e Ana Carolina, pelo amor e companheirismo.

Ao meu grande amigo e companheiro, Álvaro, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e fazendo acreditar que um sonho pode se concretizar.

A toda minha família os quais me apoiaram e acreditaram em mim.

Ao Gustavo, por todo o amor e compreensão.

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

Ao prof. Eduardo Mendes Ramos, pela coorientação, e a prof^a. Alcinéia de Lemos Souza Ramos, que sempre me acolheram com muito carinho e contribuíram significativamente para a realização desta etapa tão importante.

Ao prof. Cleiton Antônio Nunes que se disponibilizou a contribuir com este trabalho.

À Andressa, companheira de república, por toda a força.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), a todos professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos que me acolheram com tanto carinho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

Ao prof. Maurilio Lopes Martins pela orientação durante a graduação e ainda por ser o principal responsável pela minha escolha em seguir a área de Microbiologia.

À Eliane, técnica do Laboratório de Microbiologia, pela disponibilidade, amizade e auxílio.

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

À Cecília pelo auxílio no processamento e pelas horas de conversa e amizade.

À Andressa, Carolina e Monalisa pelo auxílio nas análises.

À Élide e Monalisa, por toda ajuda com a estatística e todo o carinho.

A todos do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência dos Alimentos, que estiveram presentes durante essa caminhada, obrigada pelo carinho e auxílio.

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

Enfim a todos que de alguma forma contribuíram/torceram pela realização desta etapa em minha vida.

Muito obrigada!

RESUMO

Clostridium perfringens apresenta-se na forma de bastonete Gram-positivo, é imóvel, anaeróbico aerotolerante e formador de endósporos, e está diretamente associado à toxinfecção alimentar. Devido ao crescente interesse dos consumidores por alimentos ditos “naturais”, os óleos essenciais e a nisina surgem como alternativas, não só para substituição, mas também, como em uso conjunto, reduzindo os níveis de aditivos químicos, como o nitrito, empregados na elaboração de alimentos. Diante do exposto, a presente pesquisa tem por objetivo avaliar o efeito antimicrobiano sinérgico entre óleos essenciais, nisina e nitrito de sódio sobre endósporos de *C. perfringens* Tipo A ATCC 13124 inoculados em mortadela, bem como sua influência sobre a oxidação lipídica do produto. Para determinar a concentração mínima inibitória (MIC) tanto dos óleos essenciais individuais quanto das combinações e da nisina foi utilizado o método de diluições em caldo. As mortadelas foram elaboradas com as combinações de óleos essenciais, nisina e nitrito, mais efetivas nos testes *in vitro*. As amostras para análises microbiológicas foram armazenadas a 25°C/30 dias, sendo inoculadas com 10⁵ UFC/g de endósporos de *C. perfringens* e as amostras para análises físico-químicas foram armazenadas a 4°C/30 dias. Observou-se que o óleo de canela foi o mais efetivo contra endósporos de *C. perfringens* com MIC de 0,4%, seguida dos óleos de gengibre, orégano, capim-limão, cardamomo, alecrim com MIC de 3,1%. Já os óleos de pimenta chinesa, limão siciliano, grapefruit, cravo da Índia, basilicão e tomilho branco apresentaram MIC de 6,3%. Enquanto que, na utilização de salvia e tangerina constatou-se a necessidade de 12,5% desses óleos para a inibição da germinação do endósporo de *C. perfringens*. A combinação entre os óleos testados que apresentou melhor resultado de inibição foi aquela contendo as maiores concentrações de óleos essenciais de canela, orégano e gengibre e menor concentração de óleo essencial de cardamomo. Já a MIC da nisina foi de 0,250%. Quando testadas na mortadela as três variáveis, nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais (canela, orégano e gengibre) apresentaram-se significativas ($p < 0,10$) tanto na redução do número de endósporos viáveis quanto na contagem de células vegetativas de *C. perfringens* durante todo o período de armazenamento; entretanto foi observado efeito pró-oxidante dos óleos essenciais em concentrações elevadas sobre a mortadela e alterações na cor objetiva e na textura do produto.

Palavras-chave: *Clostridium perfringens*. Óleos essenciais. Nisina. Mortadela.

ABSTRACT

Clostridium perfringens is presented in rod-shaped Gram-positive, immobile, anaerobic aero-tolerant and forming endospores, and is directly associated with food poisoning. Due to increasing consumer demand for foods called "natural" essential oils and nisin appear as alternatives, not only for replacement, but also, as in use together, reducing the chemical additives levels, such as nitrite, included in the food preparation. Given the above, the present study had as objective to evaluate the synergistic antimicrobial effect among essential oils, nisin and sodium nitrite on endospores of *C. perfringens* type A ATCC 13124 inoculated on bologna, as well as its influence on lipid oxidation product. To determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of both individual essential oils as combinations of nisin was used broth dilution method. The bolognas were prepared with combinations of essential oils, nisin and nitrite more effective in vitro tests. The samples for microbial analysis were stored at 25 ° C/30 days, and inoculated with 10⁵ UFC/g of endospores *C. perfringens* and samples for physical- chemical analysis were stored at 4° C/30 days. It was observed that cinnamon oil was the most effective against endospores of *C. perfringens* with MIC of 0.4%, followed by oils of ginger, oregano, lemon-grass, cardamom, rosemary with MIC of 3.1%. Already the oils Chinese pepper, sicilian lemon, grapefruit, cloves India, basil and white thyme showed MIC of 6.3%. While, in the sage and tangerine use was found a need of 12.5% these oils for germination inhibition endospore *C. perfringens*. The combination among the tested oils which had the best inhibition result was that containing the highest concentration of cinnamon essential oils, oregano and ginger, and lower concentration of cardamom essential oil. Already the MIC of nisin was 0.250%. When tested in bologna the three variables, nitrite, nisin and essential oils mixture (cinnamon, oregano and ginger) were significant (p<0.10) both in reducing the number of viable endospores as the count of vegetative cells *C. perfringens* during the entire storage period, however it was observed pro-oxidant effect of essential oils in high concentrations on bologna and changes in the objective color and in product texture.

Keywords: *Clostridium perfringens*. Essential oils. Nisin. Bologna.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Localidades e mecanismos de ação de componentes dos óleos essenciais em células bacterianas. Danos à membrana citoplasmática e proteínas de membrana; efluxo de constituintes intracelulares; coagulação do citoplasma e depleção da força próton motiva.....	31
Figura 2	Mecanismo de autoxidação.....	36
Figura 3	Mecanismo de ação para os antioxidantes primários; creditado a óleos essenciais e seus componentes. Onde: Radicais livres (ROO* e R*); Antioxidante com átomo de hidrogênio ativo (AH); Radical inerte (A*).....	37
Figura 4	Combinação entre os óleos essenciais de canela, gengibre, orégano e cardamomo.....	62
Figura 5	Pesos de Análise de Compostos Principais (PCA) das combinações dos óleos essenciais de gengibre, canela, orégano e cardamomo sobre endósporos de <i>C. perfringens</i> tipo A.....	64
Figura 6	Valores preditos para o potencial de oxi-redução de mortadelas no trigésimo dia de armazenamento em função das concentrações de nitrito.....	72
Figura 7	Superfície de resposta para o Log do número de esporos de <i>Clostridium perfringens</i> das mortadelas acrescidas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, armazenadas a 25 °C por 24 horas.....	81
Figura 8	Superfície de resposta para o Log de UFC/g de endósporos de <i>Clostridium perfringens</i> das mortadelas acrescidas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, após 30 dias de armazenamento a 25 °C.....	84

Figura 9	Mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais no primeiro dia de armazenamento a 4 °C	92
Figura 10	Superfície de resposta para o índice de luminosidade (L*) das mortadelas acrescidas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 30	97
Figura 11	Mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais no primeiro dia de armazenamento	98
Figura 12	Superfície de resposta para o índice de TBARs das mortadelas acrescidas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 30	104
Figura 13	Superfície de resposta para o índice de coesividade das mortadelas acrescidas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 30	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Toxinas utilizadas para classificação de <i>C. perfringens</i> , enterotoxina e sua localização genética.....	19
Tabela 2	Diluições padrões utilizadas nas combinações dos óleos essenciais de gengibre, orégano, canela e cardamomo.....	48
Tabela 3	Formulação a ser utilizada para a elaboração das mortadela.....	49
Tabela 4	Delineamento fatorial completo para mortadelas contendo nitrito, nisina e mistura dos óleos essenciais.....	56
Tabela 5	Concentração Mínima Inibitória de óleos essenciais sobre endósporo de <i>Clostridium perfringens</i> Tipo A ATCC 13124.....	58
Tabela 6	Valores médios de atividade de água das mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, após trinta dias de armazenamento a 4 °C.....	66
Tabela 7	Valores médios do pH das mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo zero e Tempo trinta.....	68
Tabela 8	Valores médios do potencial de oxidação-redução (Eh) das mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 0 e Tempo 30.....	70
Tabela 9	Coefficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para potencial de oxi-redução em mortadela adicionada de nitrito, nisina mistura de óleos essenciais, no Tempo 30.....	71
Tabela 10	Valores médios de nitrito residual (ppm) das mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 0 e Tempo 30.....	74

Tabela 11 Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para nitrito residual em mortadela adicionada de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 0.....	75
Tabela 12 Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para nitrito residual em mortadela adicionada de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 30.....	76
Tabela 13 Log do número de UFC/g de endósporos de <i>Clostridium perfringens</i> presentes na mortadela adicionada de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, após 30 dias de armazenamento a 25 °C.....	77
Tabela 14 Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o Log do número de esporos em mortadela adicionada de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no tempo zero	78
Tabela 15 Modelo ajustado para os coeficientes significativos para o Log da contagem de esporos no tempo zero	79
Tabela 16 Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o Log do número de esporos em mortadela adicionada de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 30.....	82
Tabela 17 Modelo codificado da regressão para análise de Log da contagem de esporos Tempo 30.....	83
Tabela 18 Log do número de células vegetativas de <i>Clostridium perfringens</i> presentes na mortadela adicionada de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, após 30 dias de armazenamento a 25 °C.....	86

Tabela 19	Cor objetiva das mortadelas contendo diferentes concentrações de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 0	91
Tabela 20	Cor objetiva das mortadelas contendo diferentes concentrações de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 30	93
Tabela 21	Coefficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o Índice de luminosidade (L*) em mortadela adicionada de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 30.....	95
Tabela 22	Modelo codificado da regressão para análise de índice de luminosidade (L*) no Tempo 30.....	95
Tabela 23	Valores médios de Oxidação lipídica (Índice de TBARS), mg de malonaldeído/kg, das mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 0 e Tempo 30	99
Tabela 24	Coefficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o Índice de TBARS em mortadela adicionada de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 30	101
Tabela 25	Modelo codificado da regressão para análise de índice de TBARS no Tempo 30.....	101
Tabela 26	Valores médios para os índices de textura das mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 0.....	106
Tabela 27	Coefficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o parâmetro coesividade em mortadela adicionada de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 0.....	108
Tabela 28	Modelo codificado da regressão para análise da coesividade no Tempo 0.....	109

Tabela 29 Valores médios para os índices de textura das mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 30.....	112
Tabela 30 Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para dureza em mortadela adicionada de nitrito, nisina mistura de óleos essenciais, no Tempo 30.....	114

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	<i>Clostridium perfringens</i>	18
2.1.1	Endósporos de <i>Clostridium perfringens</i>	20
2.2	Nitrito/Nitrato em produtos cárneos curados.....	21
2.2.1	Efeitos devido ao uso de nitrito	24
2.3	Óleos essenciais.....	25
2.3.1	Óleos essenciais em alimentos	28
2.3.2	Atividade antimicrobiana de óleos essenciais	31
2.3.3	Atividade antioxidante de óleos essenciais.....	34
2.4	Nisina	39
2.5	Matriz alimentar: mortadela	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1	Local e condução do experimento	43
3.2	Padronização, estocagem e preparo do inóculo: célula vegetativa..	43
3.3	Padronização, estocagem e preparo do inóculo: endósporo.....	44
3.4	Inibição da germinação do endósporo (ação esporicida)	45
3.4.1	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) de óleos essenciais.....	46
3.4.2	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) de nisina	47
3.5	Combinações entre óleos essenciais	47
3.6	Fabricação da mortadela	49
3.7	Preparo das amostras.....	50
3.8	Análises microbiológicas	51
3.8.1	Enumeração de células vegetativas de <i>Clostridium perfringens</i>	51
3.8.2	Enumeração de endósporos de <i>Clostridium perfringens</i>	51
3.9	Análises físico-químicas dos Produtos	51
3.9.1	Determinação do pH	52
3.9.2	Determinação da Atividade de Água (Aw)	52
3.9.3	Concentração Residual de Nitrito de Sódio (NaNO ₂)	52
3.9.4	Cor Objetiva.....	53
3.9.5	Oxidação lipídica (índice de TBARs).....	53
3.9.6	Potencial de Oxi-redução	54
3.9.7	Textura	54

3.10	Análises Estatísticas	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	Concentração Mínima Inibitória (MIC).....	57
4.2	Combinação entre óleos essenciais.....	60
4.3	Análise de Atividade de Água (Aw)	65
4.4	Análise de pH	67
4.5	Potencial de oxidação-redução (Eh).....	69
4.6	Concentração residual de nitrito de sódio	73
4.7	Atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre <i>C. perfringens</i> tipo A inoculados em mortadela – Contagem de endósporos.....	77
4.8	Atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre <i>C. perfringens</i> tipo A inoculados em mortadela – Contagem de células vegetativas	85
4.9	Cor	89
4.10	Oxidação lipídica (Índice de TBARs)	99
4.11	Textura	105
5	CONCLUSÃO	116
	REFERÊNCIAS	118

1 INTRODUÇÃO

A atual demanda no mundo pelo uso de aditivos de origem natural trás consigo a necessidade de seus estudados. Na literatura, os óleos essenciais são muito estudados quanto à sua atividade bactericida, porém, os estudos, na grande maioria das vezes, são *in vitro*. Assim, vê-se a carência de pesquisas na área de conservação de alimentos utilizando-se óleos já comprovadamente bactericidas e também a combinação desses óleos essenciais com outros antimicrobianos naturais, como, por exemplo, a nisina.

Outro fato relevante, na utilização dos óleos essenciais e nisina é a possibilidade de redução da concentração utilizada de nitrito/nitrato, fato altamente desejável pela comunidade científica e pelo consumidor. Essa possibilidade advém do possível sinergismo que os óleos essenciais e nisina podem possuir juntamente com o nitrito/nitrato.

Esse aditivo químico é adicionado aos produtos alimentícios com o intuito de propiciar características sensoriais desejadas ao produto, pois são os sais responsáveis pelo processo denominado de cura nos produtos cárneos e, também, afim da conservação de alimentos, atuando, especialmente, na inibição do crescimento de *Clostridium botulinum*, com isso, ocorre ainda, a inibição de vários outros micro-organismos causadores de toxinfecções alimentares.

Um grande problema relacionado à adição dos sais de cura nos produtos cárneos é a produção de nitrosaminas. Esse processo ocorre devido à conversão imediata do nitrito em ácido nitroso, um dos principais precursores do agente nitrosante anidrido nitroso, o qual reage com aminas e aminoácidos da carne para produzir as nitrosaminas. As nitrosaminas possuem efeito tóxico, mutagênico, neuro e nefrotóxico e carcinogênico.

Um produto cárneo curado de interesse para o estudo da substituição parcial ou total do nitrito e nitrato é a mortadela, uma vez que, esse produto

cárneo é muito consumido e apreciado por pessoas de diferentes classes sociais e, também, apresenta grande possibilidade de crescimento de micro-organismos esporulados patogênicos, como é o caso do *Clostridium perfringens*.

Essa bactéria é de interesse para a indústria alimentícia, uma vez que, quando veiculada pelos alimentos é causadora de toxinfecções alimentares, devido à produção de toxinas.

A doença alimentar é causada por uma enterotoxina (*CPE Clostridium perfringens enterotoxin*), associada à esporulação *in vivo* no intestino após a ingestão de grande quantidade de células do micro-organismo.

Diante do exposto, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar o efeito sinérgico de óleos essenciais, nisina e nitrito de sódio sobre endósporos de *Clostridium perfringens* tipo A ATCC 13124 inoculados em mortadela, bem como sua atividade sobre a oxidação lipídica do produto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens é uma bactéria na forma de bastonete, Gram-positiva, anaeróbica aerotolerante, imóvel e capaz de formar endósporos quando em condições desfavoráveis para o crescimento de suas células vegetativas. Seu *habitat* primário é o trato intestinal de indivíduos saudáveis, e animais de sangue quente, podendo ser encontrado em diversos ambientes como solo, água, ar e vegetação. A partir dessas fontes, por meio de seus endósporos ou mesmo células viáveis, podem atingir ampla faixa de alimentos crus e processados, em especial carnes e produtos cárneos (GOMES et al., 2008). *C. perfringens* é transferido para carnes diretamente durante o abate ou pela contaminação posterior por utensílios, manipuladores ou poeira (JAY, 2005).

Essa bactéria é mesófila, com temperatura ótima de crescimento entre 37 °C e 45 °C. A menor temperatura para o crescimento está em torno de 20 °C, e a maior encontra-se próxima dos 50 °C. O tempo de geração (G_t) para a maioria das estirpes à temperaturas entre 33 °C e 49 °C é abaixo de 20 minutos sendo G_t de 8 minutos também observados (LABBÉ, 2000). São sulfito redutores, fermentam a lactose, reduzem o nitrito e hidrolisam a gelatina. Quanto ao pH, muitas linhagens multiplicam-se no intervalo de 5,5 a 8,0, mas geralmente não apresentam crescimento abaixo de 5,0, ou acima de 8,5. A atividade de água (a_w) mínima é de 0,93, porém o menor valor de a_w registrado para o crescimento e germinação dos endósporos encontra-se entre 0,97 e 0,95 com sacarose ou cloreto de sódio (NaCl). O crescimento é inibido pela concentração de NaCl de aproximadamente 5% (JAY, 2005). O crescimento é estimulado pela presença de um carboidrato fermentável e não é inibido por 20% de bile e apresenta vigorosa produção de gás. Embora não seja difícil obter o crescimento deste

micro-organismo em diferentes meios de cultura, a esporulação ocorre com dificuldade e requer a utilização de meio específico, como por exemplo, o descrito por Duncan e Strong (1968).

C. perfringens é heterofermentativo e degrada grande número de carboidratos. São necessários no mínimo 13 aminoácidos para o seu crescimento, juntamente com biotina, pantotenato, adenina e outros compostos afins (JAY, 2005).

C. perfringens é capaz de produzir uma série de toxinas, embora cada cepa, individualmente, produza apenas número limitado das existentes. Com base na capacidade de produzir as quatro toxinas mais letais (alfa, beta, epsilon e iota), as cepas da espécie são classificadas em cinco tipos: A, B, C, D e E (Tabela 1) (CAMAN, 2008).

Tabela 1 Toxinas utilizadas para classificação de *C. perfringens*, enterotoxina e sua localização genética

Tipo	α -toxina	β -toxina	ϵ -toxina	ι -toxina	Enterotoxina
A	+	-	-	-	+
B	+	+	+	-	+
C	+	+	-	-	+
D	+	-	+	-	+
E	+	-	-	+	+
Gene	<i>Plc</i>	<i>cpb1</i> <i>cpb2</i>	<i>Etx</i>	<i>iap</i> <i>ibp</i>	<i>Cpe</i>
Localização genética	Cromossomo	Plasmídeo	Plasmídeo	Plasmídeo	Plasmídeo/ Cromossomo

Fonte: Brynestad e Granum (2002)

C. perfringens tipo A, C e D são patógenos humanos, enquanto os tipos B, C, D e E são patógenos de animais. O tipo A causa gangrena gasosa em

homens, animais e toxinfecção alimentar em humanos; o tipo B é responsável pela disenteria em alguns animais; o tipo C enterite necrótica (NE) em animais e humanos, além de enterotoxemia em bezerros, leitões e ovelhas; os tipos D e E causam enterotoxemia em carneiros, cordeiros e gado (FORSYTHE, 2002).

2.1.1 Endósporos de *Clostridium perfringens*

Em condições desfavoráveis para o crescimento, as células vegetativas de *C. perfringens* podem se diferenciar para a forma de endósporos; estruturas altamente resistente. O processo de formação dos endósporos pode levar horas e é acompanhado por alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (PAREDES-SABJA et al., 2007).

Os endósporos de *C. perfringens* isolados de indivíduos que apresentavam distúrbios alimentares exibem elevada resistência a fatores ambientais de estresse como calor úmido; estresse induzidos por pressão osmótica, nitrito e pH; estocagem sob refrigeração prolongada e pressão hidrostática elevada; fator que favorece sua sobrevivência em diversos gêneros alimentícios (LI; MCCLANE, 2006; PAREDES-SABJA et al., 2007).

A estrutura do esporo é composta de uma camada externa de natureza proteica; em seu interior é encontrada a região do córtex do esporo, composto por peptidoglicano; no interior o centro do esporo contém DNA, ribossomos, enzimas, quantidades significantes de ácido depicolínico e íons Ca^{2+} , além de apresentar baixo teor de umidade (MITCHELL, 2001).

Em condições apropriadas, os endósporos podem reverter a sua forma de célula vegetativa. Essa conversão do esporo em célula vegetativa é chamada de germinação e envolve três etapas: ativação, germinação e crescimento. A ativação pode ser alcançada por aquecimento dos endósporos a temperaturas subletais, eles respondem também ao pH e ao álcool e a diversos nutrientes

como aminoácidos, açúcares, lactato e nicotinamida. Os endósporos de *C.perfringens* podem completar sua germinação em 20 minutos quando estão em presença de L-asparagina e íons k^+ (PAREDES-SABJA et al., 2008). No período da germinação, o centro dos endósporos é transformado em citoplasma com ribossomos e área nuclear definida, enquanto o período de crescimento é caracterizado pela síntese de RNA, proteínas, membranas, parede celular e DNA (MITCHELL, 2001).

O tratamento térmico pode contribuir para a germinação dos endósporos e eliminação da microbiota acompanhante competidora, resultando em crescimento rápido (bactéria se multiplica até níveis causadores de enfermidades) do micro-organismo no resfriamento impróprio e abusos de temperatura durante a manipulação (JUNEJA et al., 2009). Como resultado do rápido crescimento o aumento de 5 log em células vegetativas pode ocorrer em 2 horas sob condições ótimas (TAORMINA; BARTHOLOMEW; DORSA, 2003).

A produção de enterotoxina do *C. perfringens* (*CPE*) é associada com a formação de endósporos *in vivo* estimulada pelas condições ácidas do estômago e pelos sais biliares do intestino. Durante o processo de esporulação, as células produzem enterotoxina *CPE*, que é acumulada no citoplasma da célula e liberada no organismo, juntamente com endósporo maduro (BRYNESTAD; GRANUM, 2002).

2.2 Nitrito/Nitrato em produtos cárneos curados

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

como nitrito de sódio). A quantidade de nitrato residual também é legislada, não podendo passar de 300 ppm (também expressa como nitrito de sódio) no produto (BRASIL, 1998; BRASIL, 2009).

Sais de nitrito e nitrato são adicionados à carne com os propósitos de conservação (especialmente como agente antimicrobiano contra *Clostridium botulinum*) e pelas características sensoriais desejáveis que conferem aos produtos curados (FEINER, 2006; TOLDRÁ, 2010).

A coloração rosa avermelhada de produtos cárneos curados é um dos mais importantes efeitos do processo de cura. A mioglobina (Mb), principal pigmento associado à cor da carne, pode existir no músculo em três estados, mioglobina reduzida ou deoximioglobina (Mb^+), oximioglobina (O_2Mb) e metamioglobina (MMb). O átomo de ferro, elemento central do anel de porfirina, pode ser encontrado na forma reduzida (Fe^{2+}) ou oxidada (Fe^{3+}); estando em seu estado reduzido, outras moléculas podem se complexar formando compostos com colorações variadas. O oxigênio e outros agentes oxidantes como o nitrito podem oxidar o ferro da sua forma Fe^{2+} para Fe^{3+} .

Possivelmente, a reação inicial na cura consiste na conversão das formas químicas da mioglobina, em especial a oximioglobina, em metamioglobina ($MbFe^{3+}$), que confere coloração marrom à carne (RAMOS; GOMIDE, 2007). No entanto, nas condições presentes na carne (pH entre 5,5 e 6,0), o nitrito é convertido a ácido nitroso (HNO_2) e deste a óxido nítrico (NO), presentes em equilíbrio. O NO formado se combina com a porção heme da metamioglonina para originar o pigmento de nitrosometamioglobina ($MbFeNO$), altamente instável e que é, rapidamente, reduzida à forma química de nitrosomioglobina ($MbFe^{2+}NO$), pigmento de cor vermelho rosado característica de produtos curados crus (TOLDRÁ, 2010). A nitrosomioglobina, no entanto, é muito instável e a estabilização do complexo pode ser promovida pela desnaturação da molécula de globina pelo aquecimento (50-60 °C), formando o pigmento

nitrosohemocromo que apresenta cor rósea característica de produtos curados (RAMOS; GOMIDE, 2007).

A atividade sobre *C. botulinum*, ou seja, atividade antibotulínica, do nitrito em carnes curadas é mais importante, em termos de saúde pública, do que os fatores que a cor e o desenvolvimento de sabor, atributos relacionados à aceitação do produto pelos consumidores. Para o desenvolvimento de cor e sabor, baixas dosagens, como 30 a 60 ppm, se mostram adequadas para diversos produtos cárneos. O efeito antibotulínico requer ao menos 120 ppm em bacon, presunto curado e em carne enlatada (FEINER, 2006). Esse é o motivo pelo qual as autoridades sanitárias de diversos países, entre eles o Brasil, permitem valores residuais máximos de 150 ppm em produtos curados (DUTRA, 2009).

O nitrito inibe o crescimento de *C. botulinum* interferindo em enzimas ferro-enxofre, como a ferredoxina, evitando a síntese de adenosina trifosfato (ATP) a partir do piruvato. A primeira descoberta nesse sentido foi realizada por Woods et al. (1981 citado por JAY, 2005), que mostraram que o sistema fosforoclástico de *Clostridium sporogenes* é inibido pelo óxido nítrico. Mais tarde, foi demonstrado que o mesmo ocorre para o *C. botulinum* e também algumas outras espécies do gênero *Clostridium*, resultando em acúmulo de ácido pirúvico no meio (JAY, 2005).

O nitrito é capaz de retardar ou inibir reações de oxidação. Sua atividade antioxidante é baseada na formação de compostos estáveis entre pigmentos heme e nitrito (oxidante), com redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} que reduz o número de íons ferro livre Fe^{3+} catalisadores da oxidação lipídica. Cerca de 20 a 60 ppm de nitrito são necessários para que atue como antioxidante (TOLDRÁ, 2010).

O nitrito apresenta efeito reduzido sobre *Micrococcus* ssp., *Lactobacillus* ssp. e *Enterococcus* ssp. A concentração residual de 80-140 ppm de nitrito de sódio, em produto cárneo, é barreira efetiva no controle microbiológico (CAMMACK et al., 1999; FEINER, 2006).

2.2.1 Efeitos devido ao uso de nitrito

O nitrito em concentrações elevadas é tóxico para os seres humanos. O principal efeito tóxico é a oxidação da oxihemoglobina levando à methemoglobinemia que pode ser fatal, principalmente, em crianças, cuja capacidade de redução de methemoglobina é baixa. Efeitos agudos foram observados em casos de ingestão acidental em água potável, salsichas e remédios (CAMMACK et al., 1999).

O nitrito pode ser convertido em ácido nitroso, um dos principais precursores do agente nitrosante anidrido nitroso, principal agente nitrosante em alimentos, o qual reage com aminas e aminoácidos da carne para produzir nitrosaminas. Somente aminas secundárias formam nitrosaminas estáveis. Aminas primárias são, imediatamente, degradadas a álcool e nitrogênio, enquanto que as terciárias não reagem (KARL-OTTO, 2008) As nitrosaminas possuem efeito tóxico, mutagênico, neuro e nefrotóxico e carcinogêncio (FRANCIS, 2000). Micro-organismos também podem participar da formação de nitrosaminas reduzindo o nitrato a nitrito e degradando proteínas em aminas e aminoácidos (TRICKER; PREUSSMANN, 1991).

A presença de compostos N-nitrosos tem sido relatada em grande variedade de carnes conservadas pelo uso de nitrito e nitrato. Entre as nitrosaminas voláteis detectadas estão N-nitrosodimetilamina (NDMA), Nnitrosopirrolidina (NPIR) e N-nitrosopiperidina (NPIP).

A aplicação de altas temperaturas, como na fritura, em produtos cárneos curados, resulta na formação de compostos cancerígenos, o que explica os altos níveis desses compostos observados em bacon. Devido ao fato de o processo de fritura ser comum em bacons, a *United States Department of Agriculture (USDA)* estabeleceu exigências especiais para esse produto, reduzindo os níveis de nitrito no produto para 120 ppm, com exclusão do uso de nitrato, e aumento

dos níveis de ascorbatos ou isoascorbatos (eritorbatos) para 550 ppm (GLÓRIA; BARBOUR; SCALAN, 1997).

O ácido ascórbico (vitamina C), seu isômero ácido eritórbico e outros compostos redutores, como o α -tocoferol (vitamina E), têm sido relatados como principais inibidores da reação de nitrosação (WALTERS, 1992). Outros substitutos têm sido estudados na tentativa de reduzir o teor de nitrito em produtos cárneos.

Diversos trabalhos têm demonstrando a preferência dos consumidores por alimentos “naturais”, ou seja, com índices reduzidos de aditivos químicos, com isso diversos autores têm trabalhado a fim de obter a substituição total ou parcial de nitrito (AL-SHUIBI; AL-ABDULLAH, 2002; DIAS et al., 2011; JAFARI; EMAN-DJOMEH, 2007; OLIVEIRA et al., 2011).

Vários compostos preservativos têm sido propostos, incluindo a nisina, o ácido sórbico e os sulfitos, entretanto, nenhum foi considerado completamente satisfatório. Já o uso de ácido sórbico e seus sais é considerado promissor no controle do *C. botulinum* em produtos curados, desde que o nitrito esteja presente em níveis acima de 40 ppm, uma vez que o uso do ácido sórbico sozinho em produtos cárneos emulsionados favorece a oxidação lipídica e altera os atributos sensoriais (AL-SHUIBI; AL-ABDULLAH, 2002).

2.3 Óleos essenciais

O metabolismo dos seres vivos é dividido em primário e secundário. O metabolismo primário diz respeito ao conjunto das reações químicas, relacionadas com a transformação de macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) em unidades constitutivas da célula, sendo, portanto essencial à vida e comum a todos os seres vivos.

Vegetais, micro-organismos e, em menor escala animais, possuem arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias, não necessariamente, relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo. Nesse grupo encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número de organismos, com bioquímica e metabolismo específicos e únicos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização. Esse conjunto metabólico é definido como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema (SANTOS, 2007). Os vegetais, em relação ao metabolismo secundário, possuem elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade numa mesma espécie (SIMÕES et al., 2007).

O conjunto de compostos secundários nas plantas é resultado do balanço entre formação e eliminação desses compostos, durante o crescimento da planta, sendo esse equilíbrio influenciado por fatores fixos e variáveis, genéticos e os ambientais como luz, temperatura, tipo de solo e água, respectivamente (CARDOSO et al., 2005).

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

Segundo Simões et al. (2007), embora vários órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais (flores, folhas, casca do caule, madeira,

raízes, rizomas, frutos e sementes), sua composição pode variar conforme a localização em uma mesma espécie.

Os óleos essenciais são frações líquidas, voláteis e odoríferas obtidas a partir do metabolismo secundário de espécimes vegetais; apresentam propriedades biológicas comprovadas, como atividade antioxidante e antimicrobiana. São misturas naturais complexas que podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações variáveis. São caracterizados por dois ou três compostos majoritários presentes em concentrações relativamente elevadas (20-70%) existindo outros componentes presentes em concentrações vestigiais (traços) (BAKKALI et al., 2008). Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre (SIMÕES et al., 2007).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada, geneticamente e, em geral, é específica para um determinado órgão e característica para seu estágio de desenvolvimento. As condições ambientais são capazes, porém, de causar variações significativas, como a influência do ciclo vegetativo, em que a concentração de cada um dos constituintes do óleo pode variar durante o desenvolvimento do vegetal. O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e os tipos de cultivo, também, influenciam na composição química dos óleos essenciais. A temperatura, a umidade relativa, o sol e o regime de ventos exercem influência direta, sobretudo, sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem de óleo essencial na superfície (SALGADO, 2005). As plantas ricas em óleos essenciais devem ser coletadas pela manhã ou à noite, pois, o período de exposição ao sol pode provocar perdas quantitativas importantes do óleo existente no vegetal. O grau de hidratação do terreno e os teores de macronutrientes (N, P, K), também, podem influenciar a

composição dos óleos voláteis. Entretanto, não se pode estabelecer um único padrão, pois, cada espécie reage de forma diferenciada (CASTRO et al., 2006).

Aproximadamente 3000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importantes especialmente para as indústrias farmacêuticas, agronômicas, alimentícias, sanitárias, cosméticas e de perfumaria, sendo conhecidos por suas propriedades antisépticas, bactericidas, virucidas, fúngicas, medicinais, são usados em conservantes de alimentos como agentes antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmo líticos e drogas anestésicas locais (SIMÕES et al., 2007).

2.3.1 Óleos essenciais em alimentos

A conservação de alimentos tornou-se problema complexo. Novos produtos são constantemente introduzidos no mercado, e exigem vida útil mais longa e maior garantia de segurança contra patógenos de origem alimentar (WILSON; DROBY, 2000). O uso excessivo de conservantes químicos, questionados em virtude de seu potencial carcinogênico, atributos teratogênicos e toxicidade residual têm levado ao aumento da pressão sobre os fabricantes de alimentos para substituição desses agentes por técnicas alternativas de preservação classificadas como “naturais”. Consequentemente há interesse considerável na pesquisa da possibilidade do uso de produtos naturais tais como óleos essenciais, extratos de plantas comestíveis e ervas medicinais e especiarias (FRIEDMAN; HENIKA; MANDRELL, 2002).

Poucos conservantes contendo óleos essenciais estão comercialmente disponíveis. Dentre eles tem-se o “DMC Base Natural” produzido pela DOMCA S.A., (Alhendin, Granada, Spain) sendo composto por 50% de óleos essenciais de alecrim, salvia e citrus e 50% de glicerol (MENDOZA-YEPES et al., 1997). O “*Protecta One*” e “*Protecta Two*” são misturas de extratos de ervas

produzidos por Bavária Corp. Apopka, FL, Estados Unidos, e são classificados como *GRAS* nesse país. Embora o conteúdo preciso não seja divulgado pelo fabricante, provavelmente contém um ou mais óleos essenciais dispersos em soluções de citrato de sódio e cloreto de sódio, respectivamente (CUTTER, 2000).

Vários componentes de óleos essenciais têm sido registrados pela Comissão Europeia para utilização como aromatizante em gêneros alimentícios. Os compostos registrados são caracterizados por não apresentarem qualquer risco à saúde do consumidor e incluem entre outros carvacrol, carvona, cinamaldeído, citrato, *p*-cimeno, eugenol, limoneno, mentol, e timol (COMMISSION DECISION OF 23 JANUARY, 2002).

A tecnologia de “obstáculos ou barreiras” que envolvem técnicas de preservação múltiplas simultâneas é realizada com sucesso no controle de patógenos, e a manutenção da qualidade dos alimentos durante o armazenamento (LEISTNER, 2000). Diversos sinergismos potenciais entre componentes de óleos essenciais e conservantes, ou métodos de conservação de alimentos têm sido sugeridos: baixo pH, baixa atividade de água, agentes quelantes, tensões de oxigênio reduzidas, tratamentos térmicos moderados e elevação de pressão.

Tassou, Drosinos e Nychas (1995), observaram o sinergismo entre NaCl e o óleo essencial de hortelã sobre *Salmonella Enteritidis* e *Listeria monocytogenes*. A ação sinérgica entre o óleo essencial de orégano e nitrito de sódio e seus efeitos sobre o crescimento e produção de toxinas de *C. botulinum* foram observados por Ismaiel e Pierson (1990). Timol e carvacrol apresentaram efeito sinérgico quando associados a elevadas pressões hidrostáticas (HHP) na redução das contagens de *Listeria monocytogenes* (KARATZAS et al., 2001). As atividades antibacterianas dos óleos essenciais de tomilho e orégano sobre *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus* foram mais pronunciadas em

baixos níveis de oxigênio (PASTER et al., 1990). Skandamis e Nichas (2001) observaram que o óleo essencial de orégano retardou o crescimento microbiano e suprimiu as contagens de micro-organismos deterioradores em carne picada estocada em embalagem com atmosfera modificada (MAP, 40% CO₂, 30% N₂ e 30% de O₂), quando em contraste, a inibição não foi pronunciada em amostras estocadas em atmosfera comum.

Para aplicação de óleos essenciais em alimentos o impacto sensorial deve ser considerado. Se elevadas concentrações são necessárias para atingir ação desejada, níveis inaceitáveis de sabor e aroma inapropriados podem ser percebidos (GUTIERREZ et al., 2008).

A utilização de óleos essenciais de plantas e condimentos no controle de micro-organismos patogênicos e deterioradores de alimentos requer avaliação de sua eficácia em gêneros alimentícios ou modelos que simulem sua composição. De forma geral a eficiência de muitos agentes antimicrobianos naturais pode ser reduzida por determinados componentes de alimentos (água, lipídios, carboidratos, proteínas) (GLASS; JOHNSON, 2004). Elevados níveis de proteínas e/ou lipídios em matrizes alimentares parecem proteger micro-organismos da ação dos óleos essenciais (AURELI et al., 1992).

Além de suas características bactericidas os óleos essenciais também apresentam capacidade antioxidante. Nos últimos tempos tem aumentado a demanda dos consumidores por produtos naturais “livres de aditivos químicos”, levando a indústria de alimentos a considerar a incorporação de antioxidantes naturais em produtos diversos (BADI et al., 2004). Assim, há interesse crescente em pesquisas científicas e industriais por condimentos e ervas aromáticas, em virtude de suas fortes propriedades antioxidantes, propriedades relacionadas à presença de diversas substâncias como vitaminas, flavonoides, terpenoides, carotenoides, fitoestrógenos e minerais (CALLUCCI et al., 2003).

2.3.2 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

O estudo da atividade *in vitro* de óleos essenciais e seus constituintes sobre bactérias patogênicas e deteriorantes têm sido realizado por diversos autores (BASSOLE et al., 2003; BURT, 2004; DIAS et al., 2011; DORMAN; DEANS, 2000; OLIVEIRA et al., 2011; OUSSALAH et al., 2007; PEREIRA et al., 2008). Porém o mecanismo de ação dos óleos essenciais ainda não foram totalmente elucidados (LAMBERT et al., 2001), embora as propriedades antimicrobianas e seus componentes tenham sido pesquisados desde muito tempo (KOEDAM, 1977; NYCHAS, 1995). Considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presente nos óleos essenciais, é mais provável que sua atividade antibacteriana não seja atribuída a um mecanismo específico, mas sim a vários alvos na célula (Figura 1) (BURT, 2004; CARSON; MEE; RILEY, 2002).

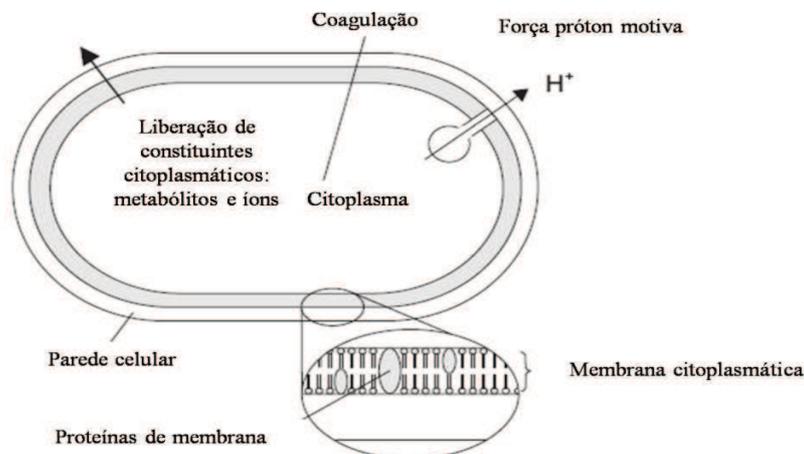


Figura 1 Localidades e mecanismos de ação de componentes dos óleos essenciais em células bacterianas. Danos à membrana citoplasmática e proteínas de membrana; efluxo de constituintes intracelulares; coagulação do citoplasma e depleção da força próton motiva

Fonte: (BURT, 2004) com modificações

Uma característica importante dos óleos essenciais é a sua hidrofobicidade, fato que permite a partição dos lipídeos da membrana citoplasmática bacteriana perturbando sua estrutura e sua função (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1994). Pode então ocorrer o vazamento de íons e do conteúdo celular (CARSON; MEE; RILEY, 2002; LAMBERT et al., 2001). Di Pasqua et al. (2007) em seu trabalho tratou cepas bacterianas de *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens* e *Brochothrix thermosphacta* com os componentes de óleos essenciais, timol, eugenol e carvacrol (compostos fenólicos), limoneno (terpeno) e cinamaldeído (aldeídos alifáticos), em concentração de antimicrobianos superior a concentração mínima inibitória (MIC), para verificar a ação desses compostos sobre o perfil de ácidos graxos da membrana das células.

Esses pesquisadores observaram que depois de apenas duas horas de exposição das células aos compostos, o percentual de ácidos graxos insaturados encontrados foi inferior aos ácidos graxos saturados. Esse resultado daria apoio ao mecanismo de ação dos compostos sobre a membrana lipídica provocando alterações estruturais na mesma. Em estudo anterior dos mesmos autores (DI PARQUA et al., 2006), a adaptação das células aos compostos, numa concentração inferior ao MIC, resultou em aumento sensível do percentual de ácidos graxos insaturados, que são bem conhecidos por dar alto grau de fluidez à membrana. Alto grau de ácidos graxos saturados na bicamada lipídica da membrana é relacionado com a diminuição da fluidez da membrana e consequente aumento de sua rigidez (BAYER et al., 2000).

A elevada atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre patógenos de origem alimentar provavelmente se dá devido às altas porcentagens de compostos fenólicos como carvacrol, eugenol e timol (COSENTINO et al., 1999; DORMAN; DEANS, 2000; LAMBERT et al., 2001). Parece que a

presença do grupo hidroxila, presente nesses compostos, está relacionada com a inativação das enzimas microbianas. Muito provavelmente, os compostos fenólicos interagem com a membrana celular, causando vazamento de componentes celulares, provocando a mudança em ácidos graxos e fosfolipídios, diminuindo o metabolismo energético e influenciando na síntese de material genético (CEYLAN; FUNG, 2004).

Estudos mostram que os compostos fenólicos agem na membrana citoplasmática, interrompendo a força próton motriz (FPM), o fluxo de elétrons, o transporte ativo e a coagulação do conteúdo das células (DAVIDSON, 1997; DENYER; HUGO, 1991).

Da mesma forma que os compostos fenólicos, o local de ação dos terpenos, outro componente dos óleos essenciais, é a membrana celular. Eles permeiam através da membrana fazendo com que ela inche, assim inibindo enzimas respiratórias e causando a dissipação parcial do gradiente de pH e de potencial elétrico. Cinamaldeído tem a maior atividade antifúngica entre os aldeídos alifáticos, o qual permeia a membrana citoplasmática alcançando o periplasma, mas não resulta na desintegração da membrana como no caso de carvacrol e timol (CEYLAN; FUNG, 2004; HELANDER, et al., 2008).

A maioria dos estudos que investigam a ação de óleos essenciais sobre micro-organismos sugerem que esses óleos são ligeiramente mais ativos contra bactérias *Gram*-positivas do que *Gram*-negativas (CIMANGA et al., 2002; HARPAZ et al., 2003; PINTORE et al., 2002). Os organismos *Gram*-negativos são menos sensíveis à ação dos óleos essenciais, provavelmente, devido à presença da membrana externa que envolve a parede celular (RATLEDGE; WILKINSON, 1988), e restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através da sua camada lipopolissacarídica (VAARA, 1992). Nevas et al. (2004) observaram em sua pesquisa que, dos 13 óleos essenciais testados contra 12 espécies de bactérias patogênicas e/ou deterioradoras, as bactérias *Gram*-positivas

apresentaram-se mais sensíveis aos óleos, sendo que dentre as *Gram*-positivas testadas *C. butulinum* tipos B e E e *Clostridium perfringens* se apresentaram mais sensíveis. Dentre as bactérias *Gram*-negativas *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* foram mais resistentes.

Porém, nem todos os estudos sobre óleos essenciais concluíram que *Gram*-positivos são mais suscetíveis. *Aeromonas hydrophila*, uma bactéria *Gram*-negativa, parece de fato ser uma das espécies mais sensíveis (WAN; WILCOCK; COVENTRY, 1998). Ouattara et al. (1997) observaram em seu estudo que, não houve diferença na susceptibilidade entre bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas após 24 horas de contato com os óleos essenciais, mas após 48 horas os micro-organismos *Gram*-negativos apresentaram maior resistência do que os micro-organismos *Gram*-positivos.

Dentre as bactérias *Gram*-negativas, as do gênero *Pseudomonas* sp., são as que apresentam maior resistência aos óleos essenciais e também a outros antimicrobianos naturais (DORMAN; DEANS, 2000; PINTORE et al., 2002; TSIGARIDA; SKANDAMIS; NYCHAS, 2000).

A composição dos óleos essenciais desempenha importante papel na atividade antimicrobiana. A atividade do óleo essencial de sálvia e alecrim está relacionada à presença de borneol e outros constituintes fenólicos; carvacrol, ρ -cimeno e timol são, provavelmente, responsáveis pela atividade em orégano, tomilho e segurelha (DAVIDSON; NAIDU, 2000).

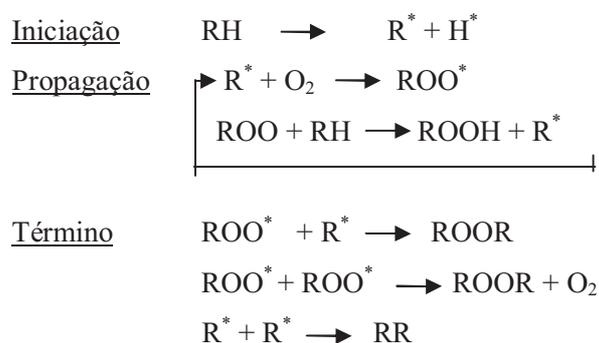
2.3.3 Atividade antioxidante de óleos essenciais

A degradação de lipídeos pode ser ocasionada por oxidação, hidrólise polimerização, pirólise e absorção de sabores e odores estranhos. Dentre esses fatores, a oxidação é a principal causa de deterioração de diversos produtos, alterando suas propriedades, como qualidade sensorial, valor nutricional,

funcionalidade e toxidez. Tais mudanças podem ter sua origem durante a produção, o processamento, a preservação, o armazenamento e o preparo do alimento. Muito embora a oxidação em geral se inicie na fração lipídica, eventualmente outros componentes são afetados, tais como proteínas, vitaminas e pigmentos (ARAÚJO, 2001).

Os lipídios podem ser oxidados por diferentes caminhos: a) Reações hidrolíticas, que são catalisadas pelas enzimas lipase ou pela ação de calor e umidade, com formação de ácidos graxos livres; b) Oxidação enzimática, que ocorre pela ação das enzimas lipoxigenases que atuam sobre os ácidos graxos poli-insaturados, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poli-insaturada, com formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas que podem envolver-se em diferentes reações degradativas; c) Fotoxidacão é promovido essencialmente pela radiação UV em presença de fotossensibilizadores (clorofila, mioglobina, riboflavina e outros) que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e a transferem para o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$), gerando o estado singlete ($^1\text{O}_2$) que reage diretamente com as ligações duplas por adição formando hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência de luz e de sensibilizadores, e que por degradação posterior originam aldeídos, alcoóis e hidrocarbonetos; d) Autoxidacão é o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). A autoxidacão dos lipídios está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados e ocorre em três etapas (FARMER, 1942). Iniciação: ocorre a formação dos radicais livres do ácido graxo devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo, em condições favorecidas por luz e calor; Propagação: os radicais livres que são prontamente susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico, são convertidos em outros radicais, aparecendo os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) cuja estrutura depende da natureza dos ácidos

graxos presentes. Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico, e Término, onde dois radicais combinam-se, com a formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis) (Figura 2).



Legenda: Ácido graxo insaturado (RH); Radical livre (R*);
Radical peróxido (ROO*); Hidroperóxido (ROOH).

Figura 2 Mecanismo de autoxidação

Fonte: Proposto por Farmer et al. (1942)

Os antioxidantes são compostos químicos empregados com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação causada por radicais livres e espécies reativas de oxigênio em alimentos e sistemas biológicos. Os compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos, fazem parte de um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e, também, na medicina (RAMALHO; JORGE, 2006).

Um radical livre é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula com um elétron não pareado ocupando uma órbita externa. O ânion superóxido, o radical hidroxila e o óxido nítrico são exemplos de radicais livres.

Existem, entretanto, compostos igualmente reativos quanto aos radicais livres que não possuem elétron não pareado na última camada e, portanto, não podem ser classificados como radicais livres. Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (ROS) ou espécies reativas de nitrogênio (RNS) e incluem o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o cátion nitrosonium (NO⁺), o ânion nitroxila (NO⁻) e o peroxinitrito (ONOO⁻) (SHARIF ALI et al., 2008).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos (BAILEY, 1996), sendo os antioxidantes primários e mistos de grande interesse para a indústria de alimentos.

Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a essas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (Figura 3). Os antioxidantes principais e mais conhecidos desse grupo são os polifenóis, como butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), que são sintéticos, e tocoferóis, que são naturais (GORDON, 2001).

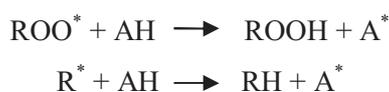


Figura 3 Mecanismo de ação para os antioxidantes primários; creditado a óleos essenciais e seus componentes. Onde: Radicais livres (ROO^{*} e R^{*}); Antioxidante com átomo de hidrogênio ativo (AH); Radical inerte (A^{*})

Os sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários

quando usados em combinação adequada com eles. Os removedores de oxigênio são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis tornando-os, conseqüentemente, indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação. Os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas, como glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases. Essas substâncias podem remover oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício. Os agentes quelantes/sequestrantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular promove a ação de complexação. Os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonoides e derivados de ácido cinâmico (ácido cafeico) (BAILEY, 1996).

Nos últimos anos tem aumentado a demanda dos consumidores por produtos naturais, livres de aditivos químicos, levando a indústria de alimentos a considerar a incorporação de antioxidantes naturais em diversos produtos. Dentre as inúmeras fontes de antioxidantes naturais estão incluídos cereais, sementes e casca de frutas cítricas, cogumelos, ervas, especiarias e plantas medicinais (BADI et al., 2004).

Os compostos responsáveis pela atividade antioxidante de alguns óleos essenciais são principalmente aqueles que possuem um ou mais grupos hidroxila (-OH), ou metoxila (-CH₃O) ligados ao anel aromático, insaturações e elétrons para serem doados provendo assim a inativação dos radicais livres (CARVALHO, 2004).

Em condimentos, ervas e seus óleos essenciais podem ser encontrados diferentes compostos antioxidantes, no cravo da Índia é possível encontrar galatos, biflorina, isômeros de eugenol, acetato de eugenila (LEE; SHIBAMATO, 2001); em alecrim e salvia encontra-se carnosol, ácido

carnósico, rosmanol, rosmaridifenol, rosmadial, rosmariquinona, ésteres de etil e metil (PIZZALE et al., 2002) e em óregano carvacrol e isômeros monoterpênicos fenólicos timol (PETER, 2000).

2.4 Nisina

A indústria de alimentos busca técnicas alternativas para substituir os métodos tradicionais de controle de micro-organismos nos alimentos, como tratamentos intensos de calor, acidificação, congelamento, desidratação, e adição de sal e agentes químicos. Nos últimos anos, as tecnologias mais estudadas são a inativação de micro-organismos por métodos não térmicos e utilização de antimicrobianos naturais (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

A nisina é um exemplo de agente conservador natural com efeito inibitório sobre vários tipos de bactérias. É uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que possui ação inibitória comprovada contra bactérias Gram-positivas, incluindo *Clostridium* sp. e algumas espécies de *Bacillus*. A nisina age promovendo a lise de células vegetativas através da permeabilização da membrana citoplasmática, com a formação de poros que causam efluxo de constituintes intracelulares, levando a completo colapso da força próton motriz. Já a ação da nisina contra esporos pode ser causada pela afinidade da bacteriocina por grupos de resíduos de proteína com grupamentos sulfidrílicos. A nisina é a única bacteriocina considerada pelo comitê de aditivos de alimentos do *Codex Alimentarius*, da FAO, como *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*) e tem o uso liberado como aditivo alimentar para controle microbiano em cerca de 50 países (GUINANE et al., 2005).

O seu uso é permitido pela Legislação Brasileira (DETEN/MS nº29, de 22 de Janeiro de 1996) como conservante natural de produtos de natureza

biológica (queijos, carnes e embalagens de embutidos), não excedendo o limite máximo de 12,5ppm.

A nisina tem grande utilização em produtos como: requeijão, queijos fundidos, ricota, sobremesas lácteas, queijos obtidos por ultrafiltração, salsichas, mortadelas, ovo líquido pasteurizado, molhos, etc.

A utilização de nisina como único conservador em alimento não é a melhor opção, pois múltiplas exposições de um patógeno à nisina aumentam a probabilidade de seleção de mutantes resistentes e estáveis. A utilização de nisina em conjunto com outros obstáculos comumente utilizados na conservação de alimentos reduz a frequência da ocorrência de micro-organismos resistentes (RILEY; WERTZ, 2002).

Burt (2004), também sugere que os efeitos da nisina podem ser potencializados pela sua associação com outros antimicrobianos naturais em baixas concentrações.

2.5 Matriz alimentar: mortadela

Os produtos cárneos emulsionados, como as salsichas e as mortadelas, são bastante populares, sendo consumidos tanto em nível doméstico como no mercado de alimentação rápida, representando importante segmento da industrialização de carnes (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2006).

Entende-se por mortadela, o produto cárneo industrializado, obtido da emulsão das carnes de animais de açougue, acrescido ou não de toucinho, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, em diferentes formas, e submetido ao tratamento térmico adequado. De acordo com a composição da matéria-prima e das técnicas de fabricação, podem ser classificadas em Mortadela, Mortadela tipo Bologna, Mortadela tipo Italiana, Mortadela Bologna e Mortadela de ave (BRASIL, 2000).

A mortadela é um produto cárneo curado e esse processo contribui para formação de cor característica, textura, sabor e aroma específicos do produto, além de efeitos antioxidantes e bacteriostáticos (MARRIOT; ; LECHOWICH; PIRSON, 1981).

O processamento da mortadela compreende as etapas de pesagem e seleção de ingredientes e matérias-primas, moagem e cominuição das carnes, pré-mistura das matérias-primas e ingredientes, emulsificação, mistura de toucinho (se houver), embutimento, cozimento e defumação (se houver), resfriamento e embalagem. Um aspecto importante refere-se à emulsificação, a qual pode ser feita por dois princípios: emulsificação em *cutters* ou com emulsificadores, sendo a seleção de qual processo a ser utilizado, dependerá do tipo de mortadela a ser produzida. Geralmente para produtos com menor qualidade utilizam-se os emulsificadores e para mortadelas de qualidade superior, utilizam-se os *cutters* (OLIVO, 2006).

Emulsão pode ser definida como sendo uma suspensão coloidal de dois líquidos imiscíveis, que se mantêm dispersos um no outro, pela ação de agente emulsificante interfacial dos alimentos que é a proteína. Quando a carne, gordura, água e sal são misturados e submetidos à alta velocidade de cominuição, massa homogênea é formada, com características de emulsão, visto que os três componentes básicos para formá-la estão presentes (água, gordura e proteína). A formação da emulsão consiste de duas transformações relacionadas: entumescimento das proteínas e formação da matriz viscosa, e emulsificação das proteínas solubilizadas com os glóbulos de gordura e água (HEDRICK et al., 1994). A proteína cárnea, especialmente a miofibrilar, por possuir uma porção hidrofóbica (apolar) e outra hidrofílica (polar) atua na interface entre a gordura e a água, permitindo a formação da emulsão.

Inicialmente a mortadela era conceituada como produto barato e consumido por pessoas de baixa renda. Contudo, com o passar dos anos, a

mortadela ganhou adeptos em todas as camadas social do Brasil, tornando-se um produto requintado, sendo conhecida pela cor rósea, sabor delicado, massa fina, aroma suave e como ingrediente de lanches. O preço acessível e as características próprias de condimentação são os principais fatores que elevaram a procura pela mortadela no território nacional (YUNES, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e condução do experimento

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e a produção de mortadela e as análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Carnes e Derivados localizados no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (DCA-UFLA).

O experimento foi conduzido em três etapas. Inicialmente, foi verificado o efeito antibacteriano *in vitro* dos diversos óleos essenciais e da nisina sobre os endósporos de *Clostridium perfringens* Tipo A ATCC 13124. Logo após, foram analisadas as combinações entre os óleos essenciais que apresentaram menor concentração mínima inibitória para os endósporos do micro-organismo estudado. Na terceira etapa foram adicionadas diferentes concentrações de combinações de óleos essenciais e nisina na mortadela inoculada com endósporos de *C. perfringens*, onde foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas, durante o período de estocagem de trinta dias.

3.2 Padronização, estocagem e preparo do inóculo: célula vegetativa

Foi utilizada cepa de *Clostridium perfringens* tipo A ATCC 13124 (*American Type Culture Collection*), histórico I.C. Hall. (L.S. Mc Clung 1997; A. J. Wildson Tipo A, cep26) INCQS 00053, cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

A cultura estoque foi mantida, durante todo o período de execução da pesquisa, congelada (-18 °C), em Meio de Congelamento (glicerol 150mL, peptona de carne 5g, extrato de levedura 3g, NaCl 5g, H₂O 1000mL, pH 7,2).

A reativação da cepa foi realizada inoculando-se 10 µL de cada cultura estoque em tubos contendo 10 mL de caldo *clostridium* suplementado com 0,5% de glicose e incubados a 37°C por 24horas em condições anaeróbicas. Após a incubação, foram retirados 10 µL dos inóculos e transferidos para 100 mL de caldo *BHI* (*Brain Heart Infusion*) HIMEDIA[®] suplementado com 0,5% de glicose e incubados a 37°C/24horas. A cada nova reativação da cultura sua pureza foi verificada por meio de crescimento em meio seletivo e diferencial Agar SPS, coloração de *Gram* e testes bioquímicos de motilidade, redução do nitrato a nitrito, fermentação de lactose e crescimento em meio de leite e ferro (coagulação tempestuosa do leite) segundo recomendações do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* da AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (LABBÉ, 2001).

A padronização foi realizada por meio da elaboração de curva de crescimento, 10⁷ UFC/mL de células vegetativas; o desenvolvimento do micro-organismo, em meio de cultivo caldo *BHI*, foi monitorado por espectrometria através da evolução da densidade ótica a 600nm e contagem direta em placas, técnica de profundida e sobrecamada, contendo Agar *BHI* suplementado com 0,5% de glicose.

3.3 Padronização, estocagem e preparo do inóculo: endósporo

Para obtenção dos endósporos, a cultura estoque de células vegetativas de *C. perfringens* foi reativada em Caldo Diferencial *Reinforced Clostridial* por três vezes consecutivas, incubado a 37 °C por 24 horas. Após esse procedimento, foi obtida uma suspensão de células vegetativas, em caldo *BHI*

adicionado de 0,5% de glicose e agitação manual. Em seguida, essa suspensão foi inoculada em *Erlenmeyer* contendo meio de esporulação líquido (3 g de extrato de carne, 5 g de triptona, 1 g de amido, 10 mg de sulfato de manganês, 1000 mL de água destilada) (MORAIS et al., 1997) e incubado a 37 °C por 144 horas. Para a padronização do número de endósporos, 10^5 UFC/mL de endósporos, foram realizadas leituras periódicas da absorbância a 600 nm. Simultaneamente, foram realizadas observações ao microscópio óptico dos endósporos, utilizando a técnica de coloração *de Wirtz-Conklin*. Essa técnica utiliza solução de Verde Malaquita 5% (m/v), e como contra corante a Safranina 0,5% (m/v), sendo que os endósporos adquirem verde intenso, enquanto outras estruturas cor rosa. Uma vez verificado a transformação das células vegetativas para endósporos, era realizada a contagem. Para aferir o número do Log de endósporos. mL⁻¹, a suspensão foi submetida a choque térmico (75 °C/15 minutos) seguido de diluições seriadas em água peptonada 0,1% (p/v) e plaqueamento em profundidade e sobrecamada, em Ágar SPS, com incubação a 37 °C por 24 horas.

3.4 Inibição da germinação do endósporo (ação esporicida)

A determinação da concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de *Litsea cubeba* (pimenta chinesa), *Zingiber officinale* (gengibre), *Citrus limon* (limão siciliano), *Citrus paradisi* (grapefruit), *Origanum vulgare* (orégano), *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia) *Cymbopogon citratus* (capim limão), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Syzygium officinalis* (sálvia), *Ocimum basilicum* (manjeriço/basilão), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Thymus vulgaris* (tomilho branco) e nisina foram realizadas (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS, 2003). Todos os óleos essenciais

utilizados foram adquiridos da empresa FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda., e a nisina (Nisaplin ®) da empresa Danisco.

3.4.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) de óleos essenciais

Foram utilizadas séries de onze tubos de ensaio, adicionados de 1 mL de Caldo *BHI*, adicionado de 0,5% de glicose e 0,5% de *Tween* 80, para cada tubo, exceto para o primeiro. Os tubos foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Para obtenção de concentrações decrescentes de óleos, foram adicionados 2 mL de óleos essenciais no primeiro tubo (tubo vazio), do qual 1 mL foi transferido para o segundo tubo, contendo 1 mL de Caldo *BHI*, sendo homogeneizado em agitador tipo vórtex e o procedimento foi repetido sucessivamente até o tubo de número 9. Desse modo, foram obtidas as seguintes concentrações aproximadas de óleo essencial expressas em µL/mL: 1000 (tubo 1), 500 (tubo 2), 250 (tubo 3), 125 (tubo 4), 63 (tubo 5), 31 (tubo 6), 15 (tubo 7), 8 (tubo 8), 4 (tubo 9). A cada tubo foram adicionados 200 µL da suspensão padronizada do endósporo, previamente submetida a choque térmico (75 °C por 15 minutos). O tubo de número 10 foi considerado o controle negativo (*BHI* + cloranfenicol + endósporos) e o tubo de número 11 o controle positivo (*BHI* + endósporos). O conteúdo foi homogeneizado e os tubos incubados a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação foi realizado o plaqueamento em meio SPS, empregando-se a técnica de plaqueamento em sobrecamada por um período de incubação de 24 horas a 37 °C, para observar o crescimento ou não do micro-organismo (NCCLS, 2003). A MIC dos óleos essenciais foi considerada como a concentração do tubo de menor diluição onde se verificou a ausência de crescimento. Todo experimento foi realizado em duplicata e três repetições.

3.4.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) de nisina

Foram utilizadas séries de doze tubos de ensaio, adicionados de 5 mL de Caldo *BHI*, adicionado de 0,5% de glicose para cada tubo. Os tubos foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

A seguir, foi feito o acréscimo da solução de nisina, sendo 5 mL da concentração inicial da solução no primeiro tubo. A solução foi então bem homogeneizada e 5 mL dela foram transferidas para o tubo seguinte. O processo foi repetido até o tubo de número 10. Desse modo, foram obtidas as seguintes concentrações aproximadas de nisina expressas em %: 0,25 (tubo 1), 0,125 (tubo 2), 0,0625 (tubo 3), 0,0312 (tubo 4), 0,0156 (tubo 5), 0,0078 (tubo 6), 0,0039 (tubo 7), 0,0019 (tubo 8), 0,0010 (tubo 9), 0,0005 (tubo 10). A cada tubo foi adicionado 200 µL da suspensão padronizada do endósporo, previamente submetida a choque térmico. O tubo de número 11 foi considerado o controle negativo (*BHI* + cloranfenicol + endósporos) e o tubo de número 12 o controle positivo (*BHI* + endósporos). O conteúdo foi homogeneizado e os tubos incubados a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação foi realizado o plaqueamento em meio SPS empregando-se a técnica de plaqueamento em sobrecamada por um período de incubação de 24 horas a 37 °C, para observar o crescimento ou não do micro-organismo (NCCLS, 2003). A MIC da nisina foi considerada como a concentração do tubo de menor diluição onde se verifica a ausência de crescimento. Todo experimento foi realizado em duplicata e três repetições.

3.5 Combinações entre óleos essenciais

Os óleos essenciais de gengibre, orégano, canela e cardamomo foram testados utilizando sua respectiva concentração mínima inibitória, em

combinações de três óleos. Esses foram os óleos selecionados, dentre os demais, uma vez que apresentaram uma menor concentração mínima inibitória. A Tabela 2 demonstra as diferentes proporções de óleos essenciais utilizadas em cada experimento. Com posterior análise dos componentes principais (*PCA*) de cada óleo.

Para avaliação da ação esporicida das combinações entre os óleos essenciais foi utilizada a metodologia de diluições em caldo e posterior plaqueamento em meio SPS (NCCLS, 2003). As análises foram realizadas em três repetições em triplicata e os tubos e as placas foram incubadas a 37°C/24h, empregando-se a técnica de plaqueamento em sobrecamada.

Tabela 2 Diluições padrões utilizadas nas combinações dos óleos essenciais de gengibre, orégano, canela e cardamomo

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

Onde: 100 refere-se à MIC de cada óleo estudado, demais números representam as proporções dos óleos utilizadas baseando-se na MIC.

3.6 Fabricação da mortadela

A elaboração das mortadelas foi baseada em formulações sem utilização de carne mecanicamente separada (Tabela 3), conforme descrito por Dutra (2009), sendo adicionados diferentes níveis de nitrito de sódio (NaNO_2).

A essas formulações de mortadela foram adicionadas diferentes concentrações da mistura de óleos essenciais e nisina, concentrações essas estabelecidas após a realização das Concentrações Mínimas Inibitórias.

Tabela 3 Formulação a ser utilizada para a elaboração das mortadela

Ingredientes/aditivos	Quantidade (g)
Carne bovina	585
Toucinho	140
Fécula de mandioca	50
Água/gelo	200
Sal	19
Ácido ascórbico	0,5
Polifosfato Fosmax 320	5

A carne bovina foi triturada no *cutter* juntamente com o gelo. Após completa homogeneização, foram adicionados, nesta ordem: fosfato; sal, nisina e nitrito de sódio. A seguir, a velocidade do *cutter* foi reduzida, sendo acrescentados o toucinho, mistura de óleos essenciais, a fécula e o ácido ascórbico. A massa obtida foi homogeneizada, ainda no *cutter*, até que a temperatura da massa atingisse 15-16°C, quando foi embutida em tripa artificial de 65-67 mm de diâmetro.

As mortadelas, contendo 450 gramas cada, destinadas às análises físico-químicas, foram imersas em água de acordo com a seguinte programação:

55°C/30 min.; 65°C/30 min.; 75°C/30 min.; e 85°C, até que a temperatura da massa atingisse 73°C (medida pela inserção de um termopar no centro da massa embutida de mortadela). Já as mortadelas, contendo 25 gramas cada, destinadas às análises microbiológicas, foram imersas em água de acordo com a seguinte programação: 55°C/5 min e, em seguida, o banho-maria foi colocado na temperatura máxima, pelo período de 10 minutos, fazendo com que o interior da massa atingisse 73°C.

Após o cozimento, as mortadelas foram mantidas em banho de água e gelo (0°C) por 10 minutos e finalmente estocadas em câmara fria (4°C), quando destinadas às análises físico-químicas e em estufas tipo BOD a 25 °C, quando essas eram destinadas às análises microbiológicas.

3.7 Preparo das amostras

Para cada tratamento foi fabricado 1 Kg mortadela sendo embutidas duas tripas com 450 gramas cada, uma destinada às análises físico-químicas do Tempo 0, após 24 horas do processamento, e outra destinada às análises físico-químicas do Tempo 30, após 30 dias de armazenamento.

Para as análises microbiológicas foram preparadas duas porções, contendo apenas 25 gramas de mortadela cada, para cada tratamento estudado, sendo uma destinada às análises microbiológicas do Tempo 0, após 24 horas do processamento, e outra às análises do Tempo 30, após 30 dias de armazenamento, assim como para as análises físico-químicas.

As amostras destinadas as análises microbiológicas foram inoculadas com endósporos, previamente submetidos ao choque térmico (75 °C/15 minutos), de *C. perfringens*, na concentração final de 10⁵ UFC/g, anteriormente a etapa de cozimento da mortadela.

3.8 Análises microbiológicas

Foram enumerados os endósporos e as células vegetativas de *Clostridium perfringens*.

3.8.1 Enumeração de células vegetativas de *Clostridium perfringens*

As embalagens das mortadelas, contendo 25 gramas, foram abertas de forma asséptica, foi adicionado 225 mL de água peptonada 0,1% (m/v) e, posteriormente, homogeneizado em *Stomacher Metroterm*® (490 golpes/2 min). Após diluições seriadas decimais em 9 mL de água peptonada 0,1% , alíquotas de 1000µL foram semeadas por profundidade em Ágar SPS, empregando-se a técnica de plaqueamento em sobrecamada. As análises foram realizadas em triplicata e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

3.8.2 Enumeração de endósporos de *Clostridium perfringens*

Após homogeneização em água peptonada 0,1% (m/v), as amostras foram submetidas a choque térmico 75°C/15 minutos para inativação das células viáveis. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas decimais em 9 mL de água peptonada 0,1%, alíquotas de 1000µL foram semeadas por profundidade em Ágar SPS, empregando-se a técnica de plaqueamento em sobrecamada. As análises foram realizadas em triplicata e as placas foram incubadas a 37°C/24h.

3.9 Análises físico-químicas dos Produtos

Foram realizadas análises físico-químicas para a caracterização do produto.

3.9.1 Determinação do pH

Os valores de pH das mortadelas foram medidos através da inserção de eletrodo combinado, acoplado a um potenciômetro (DM20-Digimed), em solução.

3.9.2 Determinação da Atividade de Água (A_w)

A atividade de água dos embutidos foi avaliada diretamente em aparelho Aqualab modelo CX2 (*Dacagon Devices Inc.*), através da determinação do ponto de orvalho, seguindo-se as orientações do fabricante.

3.9.3 Concentração Residual de Nitrito de Sódio (NaNO_2)

O teor residual de nitrito nos produtos elaborados foi quantificado segundo método o oficial no. 973.31 da Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1998).

Cerca de 5 g de amostra triturada foi homogeneizada com 40 mL de água destilada aquecida a 80°C e transferida para um balão volumétrico de 500 mL. Lavagens sucessivas foram conduzidas com água quente até atingir o volume aproximado de 300 mL. O balão ficou em repouso em banho-maria durante duas horas, sendo agitado ocasionalmente. Após o repouso, o balão foi resfriado à temperatura ambiente, seu volume completado com água destilada e filtrado.

Uma alíquota do filtrado, que continha entre 5 e 50 μg de NaNO_2 , foi adicionado de 2,5 mL de solução de sulfanilamida em ácido acético em um frasco de 50 mL e homogeneizado. Após cinco minutos, foram adicionados 2,5 mL do reagente dicloreto de N-(1-naftil) – etilenodiamina (NED), e o volume

completado com água destilada. A solução foi agitada e mantida em repouso durante 15 minutos para desenvolvimento da cor, sendo a absorvância lida a 540 nm.

A concentração de nitrito de sódio foi obtida através de curva-padrão.

3.9.4 Cor Objetiva

A avaliação objetiva da cor final dos produtos foi realizada com o uso de um colorímetro espectrofotométrico, seguindo as recomendações sugeridas por Ramos et al. (2009) para produtos curados. Para o cálculo dos índices de cor, foi estabelecido o ângulo do observador de 10°, iluminante D65 e o sistema de cor CIELAB.

Os índices de cor L^* , a^* e b^* foram obtidos considerando-se o valor médio de cinco leituras realizadas em diferentes pontos de fatias de, aproximadamente, quatro centímetros de largura.

Os índices de saturação (C^*), ângulo de tonalidade (h^*) e diferença global (ΔE^*) foram calculados pelas seguintes fórmulas (RAMOS; GOMIDE, 2007):

$$\begin{aligned} C^* &= (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}; \\ h^* &= \tan^{-1} (b^*/a^*); \text{ e} \\ \Delta E^* &= [(L^* - L^*_{\text{ref}})^2 + (a^* - a^*_{\text{ref}})^2 + (b^* - b^*_{\text{ref}})^2]^{1/2} \end{aligned} \quad (1)$$

3.9.5 Oxidação lipídica (índice de TBARs)

As análises de índice de TBARs (*Thiobarbituric acid reactive substances*) foram realizadas segundo metodologia descrita por Raharjo *et al.*

(1992), com pequenas modificações. Cerca de 10 g de amostra foram pesados, misturados a 40 mL de ácido tricloroacético 5% (TCA) e 1 mL de BHT (10 µg.BHT.g⁻¹ de lipídeo) e a solução filtrada em papel de filtro. O filtrado foi acrescentado de 0,08 M de TBA e aquecido em banho-maria fervente por 5 minutos. Depois de frio à temperatura ambiente, uma alíquota foi retirada para leitura da absorvância a 531 nm.

A concentração de malonaldeído (MAD) foi determinada a partir de curva padrão de calibração com 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) e os resultados expressos em miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra (mg de MAD/Kg).

3.9.6 Potencial de Oxi-redução

Os valores do potencial de oxi-redução das mortadelas foram medidos através da inserção de eletrodo de prata combinado, acoplado a um potenciômetro (DM20-Digimed), em solução.

3.9.7 Textura

As análises de textura objetiva foram conduzidas apenas nos produtos acabados. Amostras de cada tratamento, foram analisadas, à temperatura ambiente, pelo teste de Análise de Perfil de Textura (TPA), em um texturômetro TA.XT2i *Texture Analysis (Stable Micro System Inc.)* conectado a um computador equipado com o programa *Texture Expert*[®].

O teste de Análise de Perfil de Textura (TPA) foi conduzido segundo Matos et al. (2007). Três amostras (replicatas), cortadas em cubos de 1 cm de altura, foram comprimidas duas vezes até 50% de seu tamanho, com um prato de compressão de 7,5 cm de diâmetro. Não houve tempo de repouso da amostra

entre os dois ciclos de compressão. A curva de deformação com o tempo foi obtida a uma velocidade de compressão de 180 mm/min (5,0 mm/s), a partir da qual foram gerados seis parâmetros de textura, segundo Bourne (1978) e Szczesniak (1998): fraturabilidade; dureza; coesividade; adesividade; elasticidade; e mastigabilidade.

3.10 Análises Estatísticas

A atividade antimicrobiana das combinações entre os óleos essenciais foi avaliada empregando-se a análise de mistura e a análise dos componentes principais (*Principal component analysis, PCA*). Os dados foram pré-processados por autoescalamento antes das análises e foram realizados no *software Chemoface* (Versão 1.2, 2012).

A influência dos níveis de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais nas mortadelas foi avaliada por meio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), segundo Rodrigues e Iemma (2005), para três variáveis independentes em um esquema fatorial 2^3 , com as seguintes concentrações:

- a) 0 a 300 ppm de nitrito;
- b) 0 a 0,5 % de nisina; e
- c) 0 a 1,75 % da mistura dos óleos essenciais de canela, gengibre e orégano.

O DCCR foi composto por 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 17 ensaios. Os três fatores independentes foram investigados em cinco diferentes níveis (-1,68; -1; 0; +1 e +1,68), dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 Delineamento fatorial completo para mortadelas contendo nitrito, nisina e mistura dos óleos essenciais

ENSAIO	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
	X1	X2	X3	NO2 (ppm)	Nisina (%)	Óleo (%)
1	-1	-1	-1	60,7	0,101	0,355
2	1	-1	-1	239,3	0,101	0,355
3	-1	1	-1	60,7	0,398	0,355
4	1	1	-1	239,3	0,398	0,355
5	-1	-1	1	60,7	0,101	1,395
6	1	-1	1	239,3	0,101	1,395
7	-1	1	1	60,7	0,398	1,395
8	1	1	1	239,3	0,398	1,395
9	-1,68	0	0	0	0,25	0,875
10	1,68	0	0	300	0,25	0,875
11	0	-1,68	0	150	0	0,875
12	0	1,68	0	150	0,5	0,875
13	0	0	-1,68	150	0,25	0
14	0	0	1,68	150	0,25	1,75
15	0	0	0	150	0,25	0,875
16	0	0	0	150	0,25	0,875
17	0	0	0	150	0,25	0,875

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Concentração Mínima Inibitória (MIC)

O óleo de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) foi o que promoveu melhor resposta antimicrobiana com concentração mínima inibitória (MIC) de 0,4%, seguida dos óleos de *Zingiber officinale* (gengibre), *Origanum vulgare* (orégano), *Cymbopogon citratus* (capim limão), *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) com MIC de 3,1%. Já os óleos de *Litsea cubeba* (pimenta chinesa), *Citrus limon* (limão siciliano), *Citrus paradisi* (grapefruit), *Syzygium aromaticum* (cravo da índia), *Ocimum basilicum* (manjerição/basilicão) e *Thymus vulgaris* (tomilho branco) apresentaram MIC de 6,3%. Enquanto que na utilização de *Syzygium officinalis* (salvia) e *Citrus reticulata v.tangerine* (tangerina) constatou-se a necessidade de 12,5% destes óleos para a inibição da germinação do endósporo de *Clostridium perfringens* (Tabela 5). A concentração mínima inibitória é citada pela maioria dos pesquisadores como a medida do desempenho antimicrobiano dos óleos essenciais (BURT, 2004).

Tabela 5 Concentração Mínima Inibitória de óleos essenciais sobre endósporo de *Clostridium perfringens* Tipo A ATCC 13124

Concentração (%)	Óleos Essenciais													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0,4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
0,8	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
1,5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
3,1	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
6,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda 1:

(-) Inibição da germinação do endósporo de *Clostridium perfringens* pelos óleos essenciais.

(+) Germinação do endósporo de *Clostridium perfringens*.

Legenda 2:

1. *Litsea cubeba* (pimenta chinesa); 2. *Zingiber officinale* (gengibre); 3. *Citrus limon* (limão siciliano); 4. *Citrus paradisi* (grapefruit); 5. *Origanum vulgare* (orégano); 6. *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia); 7. *Cymbopogon citratus* (capim limão); 8. *Cinnamomum zeylanicum* (canela); 9. *Elettaria cardamomum* (cardamomo); 10. *Syzygium officinalis* (sálvia); 11. *Ocimum basilicum* (manjeriço/basilicão); 12. *Rosmarinus officinalis* (alecrim); 13. *Thymus vulgaris* (tomilho branco) e 14. *Citrus reticulata v. tangerine* (tangerina).

A diferença da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser explicada pelas diferenças na composição química das mesmas. 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, 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). Outra característica importante dos óleos essenciais é a sua hidrofobicidade, fato que permite a partição dos lipídeos da membrana citoplasmática bacteriana perturbando sua estrutura e sua função (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1994). Pode então ocorrer o vazamento de íons e do conteúdo celular (CARSON; MEE; RILEY, 2002; LAMBERT et al., 2001).

Os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes aos dados observados por Dias et al. (2011) quanto à concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de orégano, capim-limão e cravo sobre células vegetativas do mesmo micro-organismo em estudo, *Clostridium perfringens* Tipo A ATCC 13124. Sendo que, para os dois primeiros óleos a MIC encontrada foi de 3,1% e para o cravo foi de 6,25%. Já quando comparados os resultados da MIC da pimenta chinesa e da canela estes diferem, pois essa autora constatou uma MIC de 12,5% para estes, enquanto que, se observou concentrações menores para a atividade antimicrobiana dos dois óleos, sendo que, para a pimenta chinesa foi 6,3% e para a canela 0,4%. Essa comparação mostra que mesmo sendo utilizado nos dois trabalhos o mesmo micro-organismo, quando se trabalha com células vegetativas, trabalho de Dias et al. (2011) e com os endósporos do mesmo obtêm-se resultados diferentes quanto às concentrações de óleos essenciais para observação de atividade antimicrobiana.

Vários estudos foram encontrados com os mesmos óleos essenciais em estudo, porém, poucos relatos referentes ao *C. perfringens*, provavelmente devido à dificuldade em se trabalhar com tal micro-organismo, uma vez que é anaeróbio.

Oliveira et al. (2011) em seus estudos da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Satureja montana* L. contra o *C. perfringens* Tipo A observaram uma concentração mínima inibitória para tal de 1,56%.

Já a nisina apresentou uma concentração mínima inibitória de 0,250 %. Na ação da nisina sobre endósporos, a germinação é impedida pela reação de grupamentos dehidrobutirina e dehidroalanina com moléculas sulfidrílicas vitais da membrana. A nisina é a única bacteriocina disponível comercialmente para utilização em alimentos. No Brasil, a nisina é aprovada para uso em todos os tipos de queijo no limite máximo de 12,5 ppm (DE MARTINIS et al., 2002).

4.2 Combinação entre óleos essenciais

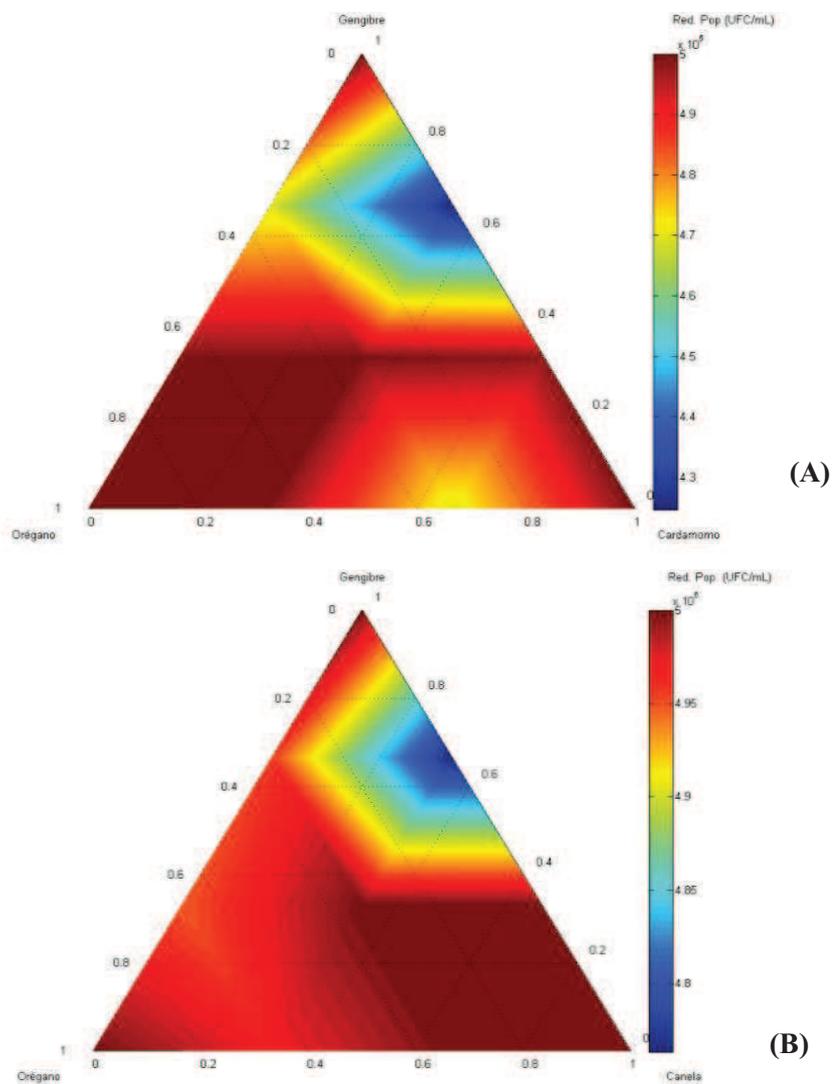
Os resultados das combinações dos óleos essenciais de canela, orégano, gengibre e cardamomo demonstraram que o óleo essencial de gengibre foi o que mais contribuiu para a inibição do *C. perfringens* tipo A, dentre os óleos testados, seguido dos óleos de orégano e canela e observa-se um efeito negativo do óleo de cardamomo no sistema (Figura 4). Dias et al. (2011) verificou, ao analisar os resultados das combinações dos óleos essenciais de orégano, tomilho, capim-limão e cravo da Índia, que o óleo essencial de orégano foi o que mais contribuiu para a inibição do mesmo micro-organismo em questão.

A Figura 4A demonstra o efeito inibitório das combinações dos óleos essenciais de gengibre, orégano e cardamomo sobre endósporo de *C. perfringens*, não sendo observado efeito sinérgico nem antagônico dos óleos essenciais sobre a bactéria. As concentrações de óleos que proporcionaram maior redução da população inicial de 10^5 UFC/mL foram aquelas contendo as maiores proporções de óleo essencial de orégano.

Entre a combinação dos óleos essenciais de gengibre, orégano e canela observa-se maior efeito inibitório quanto maiores proporções do óleo de canela, houve grande zona de inibição convergindo para o orégano, enquanto que a proximidade do óleo essencial de gengibre demonstrou menor zona de inibição (Figura 4B).

A Figura 4C representa o efeito antibacteriano da combinação dos óleos essenciais de gengibre, cardamomo e canela, pôde-se observar efeito inibitório aumentando à medida que há maiores concentrações de óleo essencial de gengibre e cardamomo e menores proporções de óleo essencial de canela.

A Figura 4D demonstra o efeito antibacteriano das combinações dos óleos essenciais de orégano, cardamomo e canela sobre *C. perfringens* tipo A. As concentrações de óleos que proporcionaram maior halo de inibição foram aquelas contendo as maiores proporções de óleo essencial de orégano.

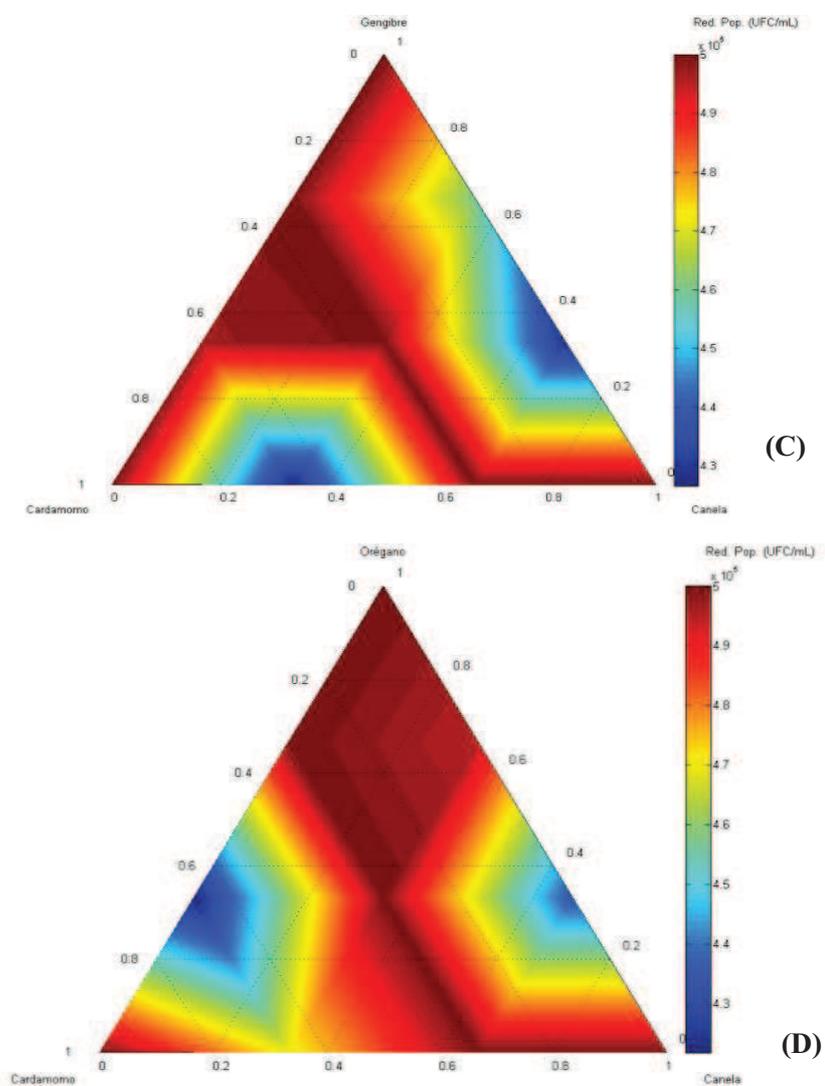


Legenda: Red. Pop (UFC/mL) – Redução da população dos endósporos de *C. perfringens*.

Figura 4 Combinação entre os óleos essenciais de canela, gengibre, orégano e cardamomo

Nota: **A:** Óleos essenciais de gengibre, orégano e cardamomo; **B:** Óleos essenciais de gengibre, orégano e canela; **C:** Óleos essenciais de gengibre, cardamomo e canela e **D:** Óleos essenciais de orégano, cardamomo e canela.

“Figura 4, conclusão”



Legenda: Red. Pop (UFC/mL) – Redução da população dos endósporos de *C. perfringens*.

Figura 4 Combinação entre os óleos essenciais de canela, gengibre, orégano e cardamomo

Nota: **A:** Óleos essenciais de gengibre, orégano e cardamomo; **B:** Óleos essenciais de gengibre, orégano e canela; **C:** Óleos essenciais de gengibre, cardamomo e canela e **D:** Óleos essenciais de orégano, cardamomo e canela.

Os dados anteriores são confirmados pela análise dos componentes principais (*PCA*), demonstrados na Figura 5, onde é possível observar que quanto maiores às concentrações de gengibre, canela e orégano maior a redução inicial da população do micro-organismo em estudo. De acordo com essa análise foi observado que o gengibre apresenta uma relação mais direta na redução da população, porém os óleos essenciais de canela e orégano apresentam um efeito secundário sobre essa redução, ao passo que o cardamomo apresenta uma menor eficiência.

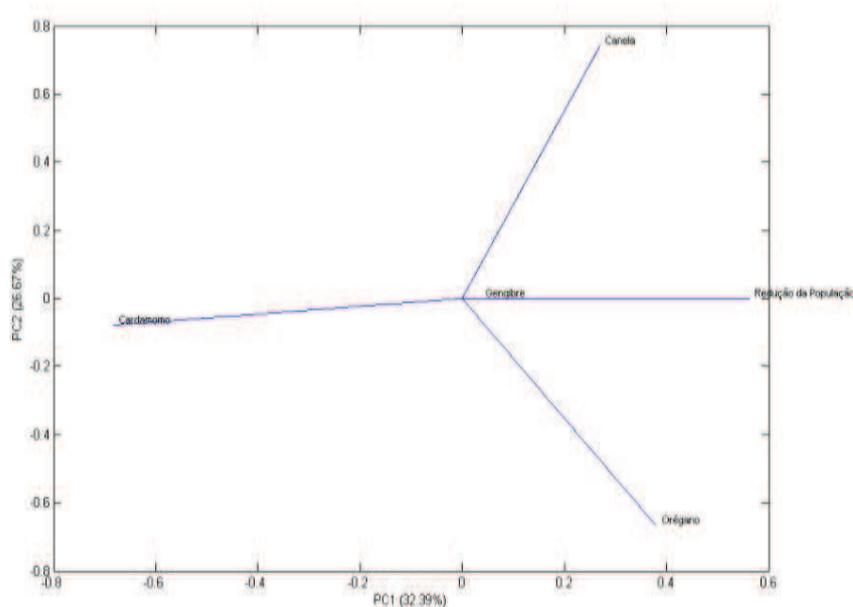


Figura 5 Pesos de Análise de Componentes Principais (*PCA*) das combinações dos óleos essenciais de gengibre, canela, orégano e cardamomo sobre endósporos de *C. perfringens* tipo A

Segundo Davidson e Parish (1989) o antagonismo é observado quando o efeito de um ou ambos os compostos é menor quando são aplicados em conjunto

do que quando aplicados individualmente, e sinergismo quando o efeito das substâncias combinadas é maior do que a soma dos efeitos individuais, pode-se afirmar que ao analisar as combinações dos óleos essenciais deste estudo, não foi observado efeito sinérgico nem antagônico sobre o microrganismo *C. perfringens* tipo A.

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).

4.3 Análise de Atividade de Água (Aw)

Os valores médios da atividade de água (Aw) para os diferentes tratamentos são representados na Tabela 6. Como o pH, também não foi possível ajustar um modelo estatístico para a Aw, tanto para os tratamentos analisados no primeiro dia de armazenamento quanto para aqueles analisados no trigésimo dia. A falta de ajuste do modelo ocorreu, provavelmente, devido às pequenas alterações da Aw nos dezessete tratamentos, bem como no decorrer do período de armazenamento. Foi observado em todos os tratamentos que a Aw apresentou-se superior a 0,97 (Tabela 6), resultado semelhante foi observado por Dias et al. (2011) em seu trabalho.

Tabela 6 Valores médios de atividade de água das mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, após trinta dias de armazenamento a 4 °C

Trat	Tratamentos			Tempo 0	Tempo 30
	NO ₂ (ppm)	Nisina (%)	Óleo (%)	Aw	Aw
1	60,7	0,101	0,355	0,971	0,971
2	239,3	0,101	0,355	0,979	0,979
3	60,7	0,398	0,355	0,975	0,975
4	239,3	0,398	0,355	0,977	0,977
5	60,7	0,101	1,395	0,983	0,983
6	239,3	0,101	1,395	0,976	0,976
7	60,7	0,398	1,395	0,978	0,978
8	239,3	0,398	1,395	0,972	0,972
9	0	0,25	0,875	0,973	0,975
10	300	0,25	0,875	0,977	0,977
11	150	0	0,875	0,983	0,983
12	150	0,5	0,875	0,976	0,976
13	150	0,25	0	0,983	0,983
14	150	0,25	1,75	0,976	0,976
15	150	0,25	0,875	0,958	0,978
16	150	0,25	0,875	0,972	0,972
17	150	0,25	0,875	0,978	0,978

A atividade de água presente nos 17 tratamentos das mortadelas durante todo o período de incubação foi acima de 0,97, favorecendo o crescimento de vários tipos de micro-organismos, dentre eles o *Clostridium perfringens*, cuja Aw está compreendida acima de 0,93 (JAY, 2005).

4.4 Análise de pH

Os valores médios do pH para os diferentes tratamentos são representados na Tabela 7. Para a análise de pH não foi possível ajustar o modelo, tanto para os tratamentos analisados no primeiro dia de armazenamento quanto para aqueles analisados no trigésimo dia. Tal fato ocorreu, provavelmente, devido às pequenas alterações do pH dentre os tratamentos. Em contrapartida, Dutra (2009) verificou em sua pesquisa que os valores de pH das mortadelas reduziram durante o período de armazenamento refrigerado, considerando a ocorrência tal fato provavelmente devido ao processo de oxidação lipídica.

A concentração hidrogeniônica que determina o pH dos alimentos é um fator de importância fundamental na limitação dos tipos de microrganismos capazes de se desenvolver em um alimento, exercendo influência sobre o crescimento, a sobrevivência ou a destruição desses microrganismos (SILVA, 2000). Neste trabalho o pH das mortadelas, tanto para o tempo zero como para o tempo trinta encontraram-se na faixa de 5,45 a 6,4, portanto as mortadelas em estudo podem ser consideradas como alimentos de baixa acidez ($\text{pH} > 4,5$), sendo portanto, mais susceptível ao desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, como o *C. perfringens* que se multiplicam no intervalo de 5,5 a 8,0.

Tabela 7 Valores médios do pH das mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo zero e Tempo trinta

Trat	Tratamentos			Tempo 0	Tempo 30
	NO ₂ (ppm)	Nisina (%)	Óleo (%)	pH	pH
1	60,7	0,101	0,355	6,09	6,04
2	239,3	0,101	0,355	6,29	6,22
3	60,7	0,398	0,355	6,23	6,33
4	239,3	0,398	0,355	6,10	5,93
5	60,7	0,101	1,395	6,12	6,03
6	239,3	0,101	1,395	6,06	5,45
7	60,7	0,398	1,395	6,40	6,17
8	239,3	0,398	1,395	6,35	6,24
9	0	0,25	0,875	6,17	6,09
10	300	0,25	0,875	6,17	6,48
11	150	0	0,875	6,06	5,76
12	150	0,5	0,875	5,93	6,25
13	150	0,25	0	6,20	5,76
14	150	0,25	1,75	6,15	6,03
15	150	0,25	0,875	6,16	6,16
16	150	0,25	0,875	6,48	6,06
17	150	0,25	0,875	6,07	5,74

Um fator que leva à redução do pH durante o armazenamento refrigerado de carnes curadas cozidas embaladas a vácuo é o crescimento de bactérias lácticas psicrotólicas, que é favorecido pela sua tolerância ao sal. O nitrito apresenta apenas um pequeno efeito inibidor no seu crescimento. Em geral, os microrganismos dominantes são *Lactobacillus* ou *Leuconostoc* spp. As bactérias lácticas causam deterioração nas carnes curadas embaladas a vácuo

com conseqüente produção de gosto ácido, descoloração, ocorrência de limosidade, produção de gás e redução de pH (ZHANG; HOLLEY, 1999).

Liu et al. (2009), estudando o efeito da adição de alecrim na qualidade da salsicha de frango durante o armazenamento refrigerado, constataram que os valores de pH da salsicha foram em torno de 6,4 e permaneceram estáveis durante os primeiros 10 dias, diminuindo para 5,9 até o 14º dia, nas amostras controle (sem adição de alecrim).

4.5 Potencial de oxidação-redução (Eh)

Estão representados na Tabela 8 os valores médios do potencial de oxidação-redução (Eh) para os diferentes tratamentos nos tempos zero e trinta dias. No tempo zero, o modelo não pode ser ajustado para Eh, não sendo, portanto, possível verificar a influência das variáveis, nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais nas mortadelas.

Tabela 8 Valores médios do potencial de oxidação-redução (Eh) das mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 0 e Tempo 30

Trat	Tratamentos			Eh (mV)	
	NO ₂ (ppm)	Nisina (%)	Óleo (%)	0 dias	30 dias
1	60,7	0,101	0,355	44,5	33,5
2	239,3	0,101	0,355	38,5	39
3	60,7	0,398	0,355	31,5	31
4	239,3	0,398	0,355	44,5	48
5	60,7	0,101	1,395	44	33,5
6	239,3	0,101	1,395	42,5	48
7	60,7	0,398	1,395	28,5	44,5
8	239,3	0,398	1,395	36,5	38
9	0	0,25	0,875	41,5	37,5
10	300	0,25	0,875	35,5	26
11	150	0	0,875	43,5	48
12	150	0,5	0,875	48,5	38
13	150	0,25	0	35	48
14	150	0,25	1,75	41,5	41
15	150	0,25	0,875	45,5	46
16	150	0,25	0,875	31	52
17	150	0,25	0,875	43,5	49,5

No trigésimo dia de armazenamento, os componentes de regressão para nisina e a mistura de óleos essenciais não foram significativos ($p > 0,10$), porém houve efeito significativo ($p < 0,10$) do Eh das mortadelas em relação ao componente quadrático do nitrito (Tabela 9), sendo o modelo ajustado e a superfície de resposta construída em função das concentrações da variável nitrito (Figura 6). Maiores valores de Eh, após trinta dias de armazenamento, foram

observados em maiores concentrações de nitrito até o nível de 150 ppm, seguido da redução destes para valores próximos aos sem adição de nitrito.

Tabela 9 Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para potencial de oxidação em mortadela adicionada de nitrito, nisina mistura de óleos essenciais, no Tempo 30

Variáveis	Potencial de Oxi-redução	
	CR	EP
Constante	49,1480*	1,7363
Nitrito (linear)	0,8193	0,8159
Nitrito (quadrática)	-6,1083**	0,8988
Nisina (linear)	-0,6815	0,8159
Nisina (quadrática)	-2,1224	0,8988
Óleo (linear)	0,0542	0,8159
Óleo (quadrática)	-1,5909	0,8988
Nitrito x Nisina	-1,1875	1,0655
Nitrito x Óleo	-1,8125	1,0655
Nisina x óleo	-0,6875	1,0655
R ²	0,5331	

*p<0,01 e **p<0,05.

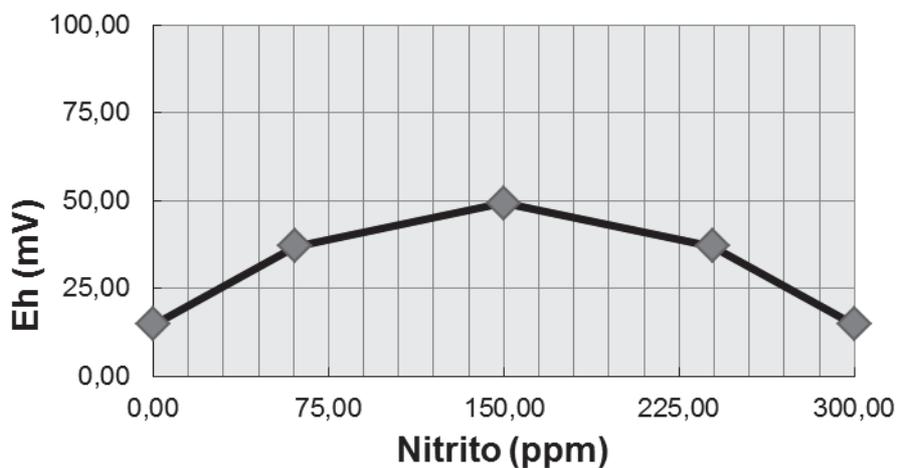


Figura 6 Valores preditos para o potencial de oxidação-redução de mortadelas no trigésimo dia de armazenamento em função das concentrações de nitrito

Segundo Ahn et al. (2005), o aumento no potencial de oxidação-redução facilita a conversão da forma ferrosa para a férrica, o que reduz a afinidade do nitrito à mioglobina e, conseqüentemente, diminui a intensidade da cor rosa

O potencial de oxidação-redução, assim como o pH e a atividade de água, são considerados fatores intrínsecos dos alimentos e estão diretamente relacionados com a microbiota que será predominante nos produtos.

C. perfringens não é um anaeróbio estrito como são os outros clostrídios, portanto suportam Eh levemente positivo, sendo expresso em mV, assim como os encontrados nesta pesquisa (Tabela 8). O crescimento a um Eh inicial de +320 mV já foi reportado (JAY, 2005).

4.6 Concentração residual de nitrito de sódio

Estão representados na Tabela 10 os valores médios do nitrito residual para os diferentes tratamentos nos tempos zero e trinta dias. Visto esses dados percebe-se que houve redução do nitrito residual com o período de armazenamento na maioria os tratamentos das mortadelas. O nitrito diminui continuamente nos produtos e sua taxa de redução é dependente da formulação, do pH, do tempo e da temperatura do produto durante o processamento e o armazenamento (PEGG; SHAHIDI, 2000).

O nitrito adicionado ao produto reage com a mioglobina e outros compostos presentes na carne e, portanto, uma parcela desses é consumida por essas reações. Para que haja controle eficaz sobre várias bactérias, dentre elas o *C. botulinum*, alguns autores consideram necessários aproximadamente 10 ppm de nitrito residual no produto final e afirmam que valores de adição inferiores a 150 ppm são insuficientes para se alcançar esse nível residual e, portanto, não previnem o desenvolvimento desse microrganismo (CASSENS, 1997).

No presente trabalho, foi detectada a presença de nitrito residual na amostra não adicionada de nitrito de sódio (Tratamento 9). Isso se deve à possível contaminação por nitrito ou nitrato oriunda de outros ingredientes, como o sal, ou a própria água da formulação, utilizado para a elaboração do produto.

Tabela 10 Valores médios de nitrito residual (ppm) das mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 0 e Tempo 30

Trat	Tratamentos			Tempo 0	Tempo 30
	NO ₂ (ppm)	Nisina (%)	Óleo (%)	NO ₂	NO ₂
1	60,7	0,101	0,355	56,59	25,58
2	239,3	0,101	0,355	149,32	56,29
3	60,7	0,398	0,355	27,19	20,93
4	239,3	0,398	0,355	172,85	48,71
5	60,7	0,101	1,395	57,19	30,73
6	239,3	0,101	1,395	126,99	62,35
7	60,7	0,398	1,395	38,91	37,90
8	239,3	0,398	1,395	138,00	64,06
9	0	0,25	0,875	8,41	1,03
10	300	0,25	0,875	184,97	59,92
11	150	0	0,875	101,94	53,86
12	150	0,5	0,875	75,98	33,96
13	150	0,25	0	34,77	21,64
14	150	0,25	1,75	110,02	26,99
15	150	0,25	0,875	72,24	29,42
16	150	0,25	0,875	72,65	41,03
17	150	0,25	0,875	38,71	40,43

No primeiro e no trigésimo dia de armazenamento, a nisina e a mistura de óleos essenciais não tiveram efeito sobre a concentração de nitrito residual, porém houve efeito significativo linear ($p < 0,10$), proporcional ao aumento do nitrito residual (Tabela 11 e Tabela 12).

Tabela 11 Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para nitrito residual em mortadela adicionada de nitrito, nisina mistura de óleos essenciais, no Tempo 0

Variáveis	Nitrito residual	
	CR	EP
Constante	60,6525**	11,2227
Nitrito (linear)	51,5876**	5,2734
Nitrito (quadrática)	14,4265	5,8095
Nisina (linear)	-4,1586	5,2734
Nisina (quadrática)	11,6887	5,8095
Óleo (linear)	5,9785	5,2734
Óleo (quadrática)	5,8193	5,8095
Nitrito x Nisina	10,2777	6,8869
Nitrito x Óleo	-8,6868	6,8869
Nisina x óleo	-0,1767	6,8869
R ²	0,9166	

**p<0,05

Tabela 12 Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para nitrito residual em mortadela adicionada de nitrito, nisina mistura de óleos essenciais, no Tempo 30

Variáveis	Nitrito residual	
	CR	EP
Constante	36,48844**	3,767173
Nitrito (linear)	13,30880**	1,770131
Nitrito (quadrática)	2,83725	1,950114
Nisina (linear)	-2,69433	1,770131
Nisina (quadrática)	4,05407	1,950114
Óleo (linear)	3,84977	1,770131
Óleo (quadrática)	-2,88895	1,950114
Nitrito x Nisina	-1,04798	2,311767
Nitrito x Óleo	-0,08838	2,311767
Nisina x óleo	2,63889	2,311767
R ²	0,8843	

**p<0,05.

Os valores de nitrito residual aumentaram linearmente a partir de valor próximo a 75 ppm de nitrito, para o primeiro dia e o trigésimo dia de armazenamento. Maiores concentrações de nitrito residual em amostras adicionadas de maiores valores de nitrito de sódio são coerentes 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. Esses mesmos autores relataram que cerca de 50% do nitrito adicionado pode ser detectado como nitrito residual e 10% a 15% como nitrato em salsichas tipo *Frankfurt*, mesmo após duas semanas de estocagem refrigerada (3°C).

4.7 Atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre *C. perfringens* tipo A inoculados em mortadela – Contagem de endósporos

O valor médio da variável Log da contagem de número de esporos para os tratamentos são representadas na Tabela 13. Tanto no primeiro dia de armazenamento, ou seja, após vinte e quatro horas do processamento, quanto após 30 dias de armazenamento, Tempo 30, os componentes quadráticos do nitrito e nisina e o componente linear do óleo afetaram significativamente ($p < 0,10$) a contagem do número de esporos (Tabela 14 e Tabela 15). A partir dos modelos ajustados para os coeficientes significativos foi possível construir as superfícies de resposta em função das concentrações de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais (canela, orégano e gengibre) (Figura 7).

Tabela 13 Log do número de UFC/g de endósporos de *Clostridium perfringens* presentes na mortadela adicionada de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, após 30 dias de armazenamento a 25 °C

Trat	Tratamentos			Tempo 0	Tempo 30
	NO ₂ (ppm)	Nisina (%)	Óleo (%)	Log UFC/g	Log UFC/g
1	60,7	0,101	0,355	5,50	3,87
2	239,3	0,101	0,355	5,07	3,43
3	60,7	0,398	0,355	4,69	3,69
4	239,3	0,398	0,355	5,46	3,41
5	60,7	0,101	1,395	5,62	2,56
6	239,3	0,101	1,395	5,25	2,30
7	60,7	0,398	1,395	5,07	2,07
8	239,3	0,398	1,395	5,34	2,34
9	0	0,25	0,875	5,65	3,65

“Tabela 13, conclusão”

Trat	Tratamentos		Óleo		Tempo 0	Tempo 30
	NO2 (ppm)	Nisina (%)	(%)	(%)	Log UFC/g	Log UFC/g
10	300	0,25	0,875		5,36	2,36
11	150	0	0,875		4,74	3,74
12	150	0,5	0,875		5,30	2,30
13	150	0,25	0		5,00	0
14	150	0,25	1,75		4,98	0
15	150	0,25	0,875		5,47	1,69
16	150	0,25	0,875		4,69	0
17	150	0,25	0,875		4,34	0

Tabela 14 Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o Log do número de esporos em mortadela adicionada de nitrito, nisina mistura de óleos essenciais, no tempo zero

Variáveis	Log do número de esporos	
	CR	EP
Constante	0,5558	0,5651
Nitrito (linear)	-0,2119	0,2655
Nitrito (quadrática)	0,9002***	0,2925
Nisina (linear)	-0,2257	0,2655
Nisina (quadrática)	0,9063***	0,2925
Óleo (linear)	-0,8639***	0,2655
Óleo (quadrática)	0,5376	0,2925
Nitrito x Nisina	0,0874	0,3468
Nitrito x Óleo	0,0894	0,3468
Nisina x óleo	-0,0308	0,3468
R ²	0,7180	

***p<0,10.

A partir do modelo ajustado para os coeficientes significativos (Tabela 15), foi possível construir a Superfície de Resposta das emulsões em função das concentrações de nisina, nitrito e mistura dos óleos essenciais (canela, orégano e gengibre) (Figura 7).

Tabela 15 Modelo ajustado para os coeficientes significativos para o Log da contagem de esporos no tempo zero

Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R ²
Log do número de esporos	$Y=1,2413x_1^2+0,7419x_2^2+0,7480x_3^2$	0,02	0,821

X1= variável codificada para nitrito; X2= variável codificada para nisina; X3= variável codificada para a mistura dos óleos essenciais de canela, orégano e gengibre.

A mistura dos óleos essenciais de canela, orégano e gengibre foi o fator que mais influenciou os valores da contagem de endósporos do *C. perfringens* em mortadela no primeiro dia de armazenamento (Figura 7A e 7C). Em contrapartida, foi observado que houve maior redução da contagem bacteriana quando as concentrações de nisina e nitrito apresentavam-se nos pontos centrais, ou seja, apresentou-se maior contagem das células do micro-organismo em questão em baixas concentrações de nisina e nitrito e também em concentrações mais elevadas (Figura 7B).

A atividade do óleo essencial de orégano sobre endósporos de *C. botulinum* foram estudadas em carnes de porco embaladas a vácuo, e concentrações de 0,4 µg não influenciaram significativamente o número de endósporos ou reduziram o crescimento de bactérias, entretanto combinado com pequenas concentrações de nitrito, houve redução significativa na formação de endósporos e crescimento bacteriano (ISMAIEL; PIERSON, 1990), também foi

observado 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).

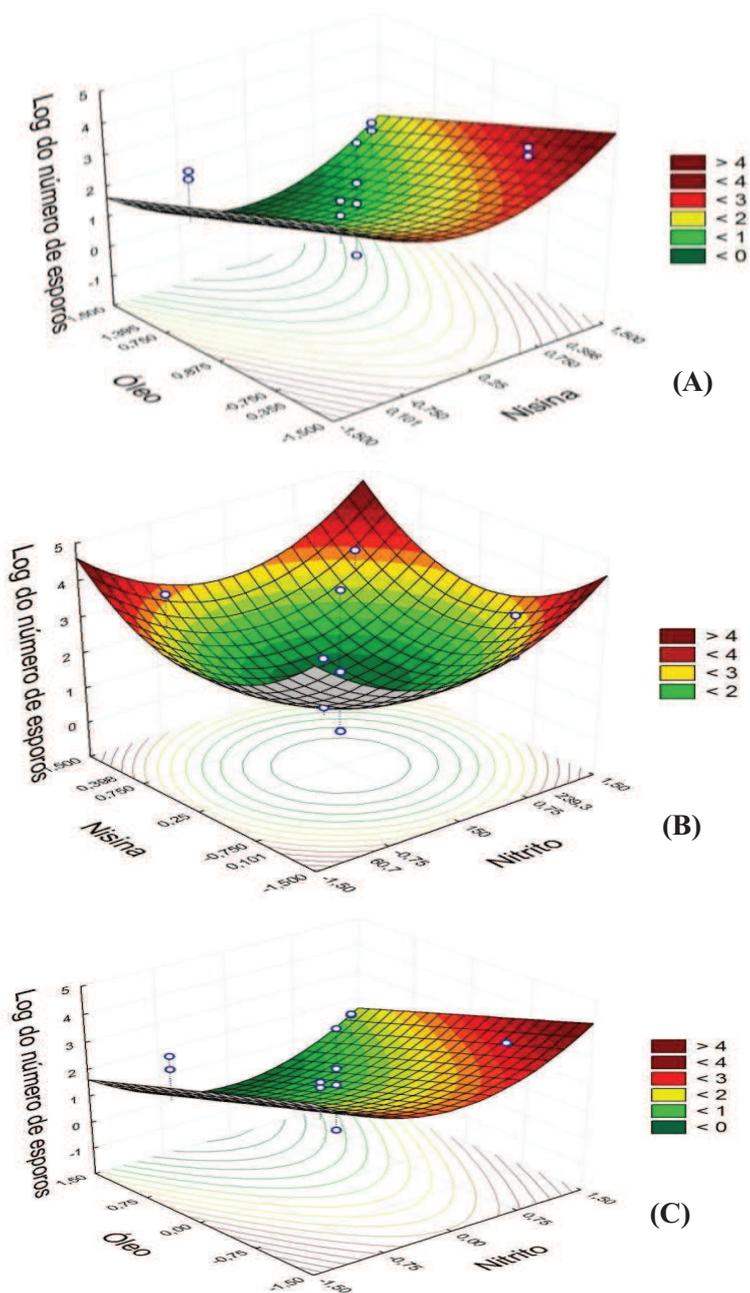


Figura 7 Superfície de resposta para o Log do número de esporos de *Clostridium perfringens* das mortadelas acrescidas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, armazenadas a 25 °C por 24 horas

No trigésimo dia de armazenamento, o componente quadrático da nisina e nitrito e o componente linear da mistura de óleos essenciais apresentaram efeito significativo ($p < 0,10$) (Tabela 16).

Tabela 16 Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o Log do número de esporos em mortadela adicionada de nitrito, nisina mistura de óleos essenciais, no Tempo 30

Variáveis	Log do número de esporos	
	CR	EP
Constante	0,5558	0,5651
Nitrito (linear)	-0,2119	0,2655
Nitrito (quadrática)	0,9002***	0,2925
Nisina (linear)	-0,2257	0,2655
Nisina (quadrática)	0,9063***	0,2925
Óleo (linear)	-0,8639***	0,2655
Óleo (quadrática)	0,5376	0,2925
Nitrito x Nisina	0,0874	0,3468
Nitrito x Óleo	0,0894	0,3468
Nisina x óleo	-0,0308	0,3468
R ²	0,7180	

*** $p < 0,10$

Com o modelo matemático ajustado (Tabela 17), foi possível construir a Superfície de Resposta das emulsões em função das concentrações de nisina, nitrito e mistura dos óleos essenciais.

Tabela 17 Modelo codificado da regressão para análise de Log da contagem de esporos Tempo 30

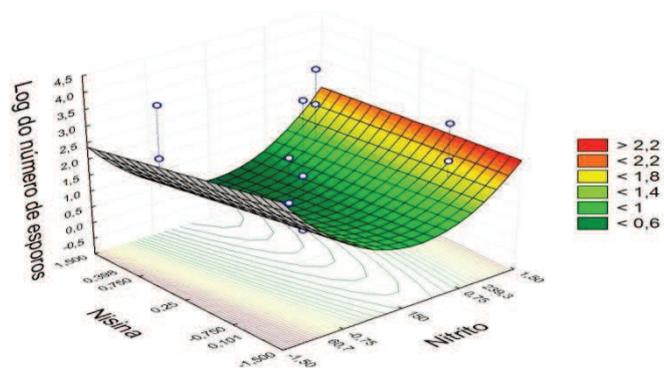
Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R ²
Log do número de esporos	$Y=0,55-0,21x_1^2+0,90x_2^2-0,22x_2+0,1x_2^2+0,08x_3$	0,02	0,8760

X1= variável codificada para nitrito; X2= variável codificada para nisina; X3= variável codificada para a mistura dos óleos essenciais de canela, orégano e gengibre.

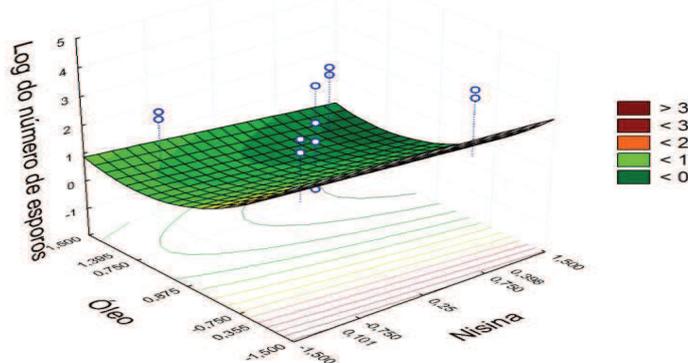
Quando comparados os resultados das contagens de esporos de *C. perfringens* do Tempo 0 e do Tempo 30 (Tabela 13) é possível constatar que houve significativa alteração em ambas, podendo ser observado uma redução de 2 a 5 ciclos logarítmicos, uma vez que foram adicionados à mortadela 5 log de UFC/g de endósporos no produto. Esse fato, possivelmente está relacionado a presença da bacteriocina nisina, uma vez que apresenta-se efetiva contra a germinação de endósporos, pois impede a reação de grupamentos dehidrobutirina e dehidroalanina com moléculas sulfidríla vitais da membrana (DE MARTINS et al., 2002).

Assim como observado para o primeiro dia de armazenamento, a mistura dos óleos essenciais de canela, orégano e gengibre foi o fator que mais influenciou os valores da contagem de endósporos do *C. perfringens* em mortadela (Figura 8B e 8C). Constatando-se, também efeito inibitório da germinação dos endósporos dessa bactéria pela ação da nisina (Figura 8A).

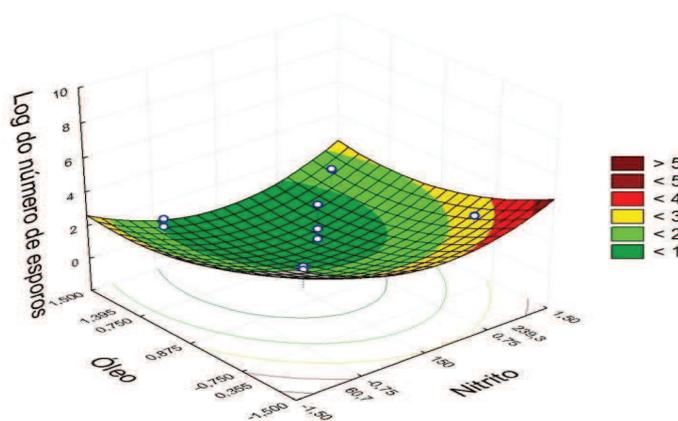
Oliveira et al. (2011) constataram grande aumento no número de esporos ao final do período de estocagem para todos os tratamentos avaliados. De acordo com Mitchell (2001) a esporulação é iniciada em resposta a escassez de nutrientes; outros fatores que podem alterar a esporulação são pH, oxigênio e temperatura. Em geral a esporulação é favorecida por condições que resultem em redução da taxa de crescimento.



(A)



(B)



(C)

Figura 8 Superfície de resposta para o Log de UFC/g de endósporos de *Clostridium perfringens* das mortadelas acrescidas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, após 30 dias de armazenamento a 25 °C

4.8 Atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre *C. perfringens* tipo A inoculados em mortadela – Contagem de células vegetativas

O valor médio da variável Log da contagem de número de células vegetativas para os tratamentos são representadas na Tabela 18. Tanto no primeiro dia de armazenamento, ou seja, o Tempo 0, quanto após 30 dias de armazenamento, Tempo 30, nenhum modelo de regressão ajustado foi significativo ($p > 0,10$) para a análise da contagem de células vegetativas do *C. perfringens* nas mortadelas. Esse fato não permitiu verificar quanto à interferência da adição das diferentes concentrações de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais na alteração da contagem de bactérias ao longo do período de armazenamento. Tal fato pode-se dever a baixa variação da população bacteriana de um tratamento para outro, e, deve-se, ainda, à ausência de células vegetativas no primeiro dia de análise.

Tabela 18 Log do número de células vegetativas de *Clostridium perfringens* presentes na mortadela adicionada de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, após 30 dias de armazenamento a 25 °C

Trat	Tratamentos			Tempo 0	Tempo 30
	NO2 (ppm)	Nisina (%)	Óleo (%)	Log UFC/g	Log UFC/g
1	60,7	0,101	0,355	0	3,94
2	239,3	0,101	0,355	0	3,74
3	60,7	0,398	0,355	0	3,65
4	239,3	0,398	0,355	0	3,99
5	60,7	0,101	1,395	0	2,88
6	239,3	0,101	1,395	0	3,90
7	60,7	0,398	1,395	0	3,50
8	239,3	0,398	1,395	0	2,88
9	0	0,25	0,875	0	3,69
10	300	0,25	0,875	0	2,79
11	150	0	0,875	0	3,94
12	150	0,5	0,875	0	2,89
13	150	0,25	0	0	3,98
14	150	0,25	1,75	0	2,68
15	150	0,25	0,875	0	3,51
16	150	0,25	0,875	0	3,60
17	150	0,25	0,875	0	3,70

Em condições apropriadas, os endósporos podem se reverter a sua forma de célula vegetativa. A ativação pode ser alcançada por aquecimento dos endósporos a temperaturas subletais, eles respondem também ao pH e ao álcool e a diversos nutrientes como aminoácidos, açúcares, lactato e nicotinamida (PAREDES-SABJA et al., 2008). Tal fato foi observado neste trabalho, uma vez que, foram adicionados 5 log de UFC/g de endósporos de *C. perfringens* nas

mortadelas, este micro-organismo quando no produto encontrou condições favoráveis para a germinação desses endósporos.

Dias et al. (2011) em sua pesquisa, constatou que quando utilizado isoladamente as concentrações de 150 e 75 ppm de nitrito em mortadela não inibiram o crescimento do *C. perfringens* no primeiro dia de armazenamento. Porém, no mesmo período de tempo, em tratamentos onde foram adicionadas diferentes combinações de óleos essenciais foi observado redução do número deste micro-organismo. Essa autora, também, concluiu que quando utilizada a combinação dos óleos essenciais contendo o óleo de orégano não ocorreu aumento significativo do número de UFC/g da bactéria durante todo o tempo de armazenamento.

As indústrias processadoras de produtos cárneos utilizam o nitrito com o principal objetivo de inibir o crescimento de *C. botulinum*, contudo trabalhos mostram que ele também pode inibir o crescimento de *C. perfringens* (FEINER, 2006).

A Portaria nº 1.004, de 11 de dezembro de 1998 da ANVISA estabelece o limite de 150 ppm de nitrito residual de sódio ou potássio em produtos cárneos. Portanto, foram utilizadas concentrações inferiores e superiores a esta, variando de 0 a 300 ppm, neste trabalho, com o intuito de observar o comportamento de diferentes concentrações deste aditivo químico em mortadela sobre o crescimento do *C. perfringens*, sendo que o ponto médio utilizado no DCCR foi de 150 ppm.

O nitrito reage com a enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductase (PFO) pertencente ao sistema fosforoclástico de *C. botulinum* (JAY, 2005). McMindes e Siedler (1988) demonstraram que o nitrito pode não reagir com a PFO dessa bactéria, podendo, portanto ser efetivo contra essa bactéria por outro mecanismo de ação. Como, por exemplo, a proposta de Riha e Solberg (1975) para inibição do nitrito sobre *C. perfringens*, acredita-se que esta se da na reação do nitrito e

ácido nitroso com SH-constituintes de células bacterianas. A reação do ácido nitroso com tiols pode produzir nitrosotiols, os quais podem interferir na ação de enzimas como gliceraldeído-3-fosfato de hidrogenase.

Oliveira et al. (2011) mostraram que a adição de 100ppm de nitrito em emulsão cárnea reduziu o crescimento de *C. perfringens* em relação ao produto sem adição do nitrito, após um dia de armazenamento, evidenciando a ação bacteriostática do nitrito sobre o *C. perfringens*, e em mortadelas elaboradas com 100 ppm de nitrito e 0,78% de óleo essencial de *Satureja montana*, foi proporcionado uma pequena redução sobre o *C. perfringens*, tornando possível a redução de nitrito de sódio quando associado ao óleo essencial. Entretanto também observaram aumento no número de células viáveis de *C. perfringens* nas mortadelas durante seu armazenamento, sendo atribuído a esse fato à temperatura de estocagem (25^oC) e aos fatores intrínsecos do produto.

A nisina age provocando a lise de células vegetativas através da permeabilização da membrana citoplasmática, com a formação de poros que causam efluxo de constituintes intracelulares, levando a um completo colapso da força próton motriz (MARTINIS et al., 2002).

Alguns estudos demonstram que os efeitos da nisina podem ser potencializados pela sua associação com outros antimicrobianos naturais, como por exemplo, os óleos essenciais, em baixas concentrações (BURT, 2004).

Vários estudos têm demonstrado a eficiência da utilização de óleos essenciais como antimicrobianos naturais e são considerados fontes potenciais de ingredientes para a indústria de alimentos (DIAS et al., 2011; ISMAIEL; PIERSON, 1990; MEJLHOLM; DALGAARD, 2002; OLIVEIRA, 2010).

Em sua pesquisa Si et al. (2009) avaliaram o potencial de inibição de 66 óleos essenciais e alguns de seus compostos majoritários sobre *Clostridium perfringens* Tipo A, encontrando uma inibição de mais de 80% em 33 desses componentes testados.

O mecanismo de ação dos óleos essenciais ainda é discutido, provavelmente, danificam vários sistemas enzimáticos, inclusive os envolvidos na produção de energia celular e síntese de compostos estruturais. A presença de óleos essenciais interfere também no mecanismo de reparo necessário para a divisão celular. Sugere-se, ainda, que cause danos ou lesões na membrana citoplasmática, permitindo que os componentes antimicrobianos dos óleos migrem mais rapidamente para o interior da célula, alterando o metabolismo normal (BURT, 2004).

Contudo, as aplicações de óleos essenciais em alimentos geralmente apresentam sua eficácia reduzida por certos componentes (GLASS; JOHNSON, 2004), em geral supõe-se que elevados níveis de gordura e/ou proteínas presentes nos alimentos podem proteger as bactérias da ação dos óleos essenciais, reduzindo a disponibilidade destes (MEJLHOLM; DALGAARD, 2002), já os carboidratos não parecem proteger as bactérias das ações de óleos essenciais tanto quanto a gordura e as proteínas, entretanto elevada atividade de água e altas concentrações de sal facilitam a ação destes antimicrobianos (SKANDAMIS; NYCHAS, 2000). Visto que as mortadelas apresentam um percentual de aproximadamente 9,95% de gordura, essas podem favorecer a redução do efeito inibitório dos óleos essenciais testados neste estudo. A mortadela, após o processo de cozimento, apresenta estrutura física semissólida podendo interferir na difusão do óleo e prejudicar seu efeito antimicrobiano (OLIVEIRA, 2010).

4.9 Cor

Os valores médios para os índices de cor (L^* , a^* , b^* , C^* e h^*) dos tratamentos no primeiro dia de armazenamento (tempo zero), são representados na Tabela 19. Sendo que, a luminosidade (L^*) caracteriza o grau de claridade da

cor, variando do preto para o branco, indo de 0 (escuro) a 100 (claro); o parâmetro a^* representa a variação da intensidade da cor do verde ao vermelho, valores positivos de a^* ou a^+ de 0 até +50 representam a cor vermelha da amostra, enquanto valores negativos de a^* ou a^- de 0 até -50 representam a coloração verde do produto; o índice de amarelo (b^*) representa tonalidade que vão do azul (valores negativos) ao amarelo (valores positivos); o índice de saturação (C^*) corresponde à intensidade ou quantidade de uma tonalidade, indicando o nível de mistura com o branco, preto ou cinza e 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, 2009).

Para nenhum dos índices de cor (L^* , a^* , b^* , C^* e h^*) foi possível ajustar um modelo para o primeiro dia de armazenamento. Portanto, constata-se que as variáveis, nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais não interferiram em nenhum dos índices de cor estudados neste trabalho ou não foi possível um ajuste a partir das concentrações empregadas ou, ainda, devido à grande variabilidade dos dados obtidos. No entanto, nas fotografias dos diferentes tratamentos (Figura 9) pode-se observar variações nas cores das mortadelas. O tratamento que se apresenta com maior diferença na coloração, quando comparado aos demais, é o tratamento 9, uma vez que, nessa formulação não foi adicionada o nitrito de sódio, apresentando, assim, uma coloração acinzentada.

Tabela 19 Cor objetiva das mortadelas contendo diferentes concentrações de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 0

Ensaio	Tratamento			Índices de cor				
	NO2	Nisina	Óleo	L*	a*	b*	C*	h
1	60,7	0,101	0,355	60,13	11,555	13,245	17,575	48,885
2	239,3	0,101	0,355	56,625	11,35	11,935	16,47	46,44
3	60,7	0,398	0,355	60,865	11,1	12,04	16,375	47,33
4	239,3	0,398	0,355	63,73	10,895	14,345	18,015	52,765
5	60,7	0,101	1,395	62,795	11,375	12,75	17,09	48,275
6	239,3	0,101	1,395	62,48	12,345	12,54	17,6	45,445
7	60,7	0,398	1,395	62,76	11,17	13,445	17,485	50,31
8	239,3	0,398	1,395	63,03	11,045	13,095	17,13	49,86
9	0	0,25	0,875	61,845	11,63	12,16	16,825	46,285
10	300	0,25	0,875	64,7	10,135	14,405	17,615	54,88
11	150	0	0,875	62,415	11,49	14,39	18,42	51,385
12	150	0,5	0,875	62,675	11,685	13,02	17,495	48,09
13	150	0,25	0	64,515	10,295	14,585	17,85	54,785
14	150	0,25	1,75	63,065	11,04	14,545	18,26	52,805
15	150	0,25	0,875	65,17	3,695	17,53	17,915	78,095
16	150	0,25	0,875	63,505	11,615	12,895	17,355	47,99
17	150	0,25	0,875	61,71	10,045	12,99	16,42	52,29

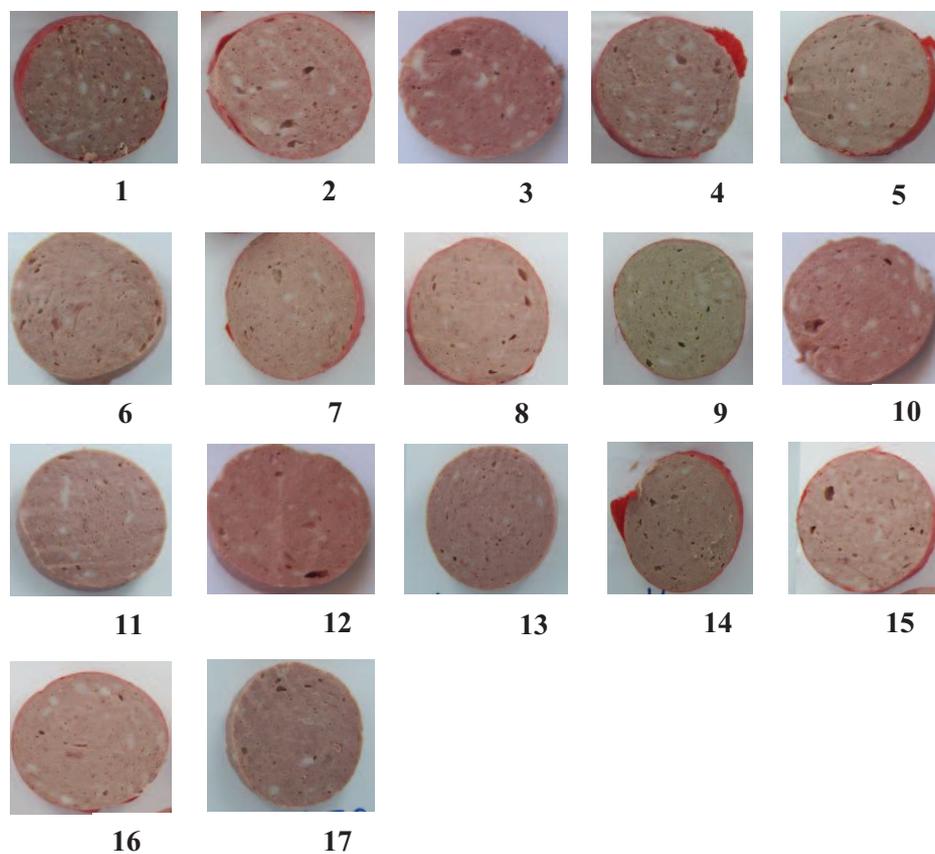


Figura 9 Mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais no primeiro dia de armazenamento a 4 °C

Os valores médios para os índices de cor (L^* , a^* , b^* , C^* e h^*) dos tratamentos no trigésimo dia de armazenamento são representados na Tabela 20.

Tabela 20 Cor objetiva das mortadelas contendo diferentes concentrações de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 30

Ensaio	Tratamento			Índices de cor				
	NO2	Nisina	Óleo	L*	a*	b*	C*	h
1	60,7	0,101	0,355	61,345	11,125	13,115	17,2	49,695
2	239,3	0,101	0,355	62,765	11,43	12,875	17,22	48,395
3	60,7	0,398	0,355	61,475	11,62	13,31	17,67	48,89
4	239,3	0,398	0,355	63,775	10,7	15,82	19,095	55,92
5	60,7	0,101	1,395	63,1	11,025	13,375	17,33	50,51
6	239,3	0,101	1,395	63,7	11,44	12,805	17,175	48,235
7	60,7	0,398	1,395	62,91	10,775	13,86	17,555	52,145
8	239,3	0,398	1,395	63,56	11,395	13,72	17,835	50,295
9	0	0,25	0,875	62,205	11,705	12,395	17,045	46,645
10	300	0,25	0,875	63,73	10,9	13,635	17,455	51,35
11	150	0	0,875	63,98	10,65	15,14	18,51	54,875
12	150	0,5	0,875	63,04	10,735	15,28	18,675	54,915
13	150	0,25	0	60,955	10,33	13,61	17,09	52,795
14	150	0,25	1,75	64,175	10,69	12,205	16,225	48,875
15	150	0,25	0,875	64,56	10,265	15,625	18,69	56,705
16	150	0,25	0,875	64,585	9,57	15,37	18,105	58,095
17	150	0,25	0,875	64,71	4,155	17,835	18,31	76,89

Também não foi possível ajustar um modelo para os índices a*, b* e h* das amostras após trinta dias de armazenamento refrigerado, o que significa que as variáveis analisadas ou não afetaram a tonalidade vermelha, a tonalidade amarela e a qualidade da cor, respectivamente, dos produtos ou não foi possível ajuste a partir dos dados obtidos.

Em contrapartida, Dias et al. (2011) concluíram em sua pesquisa que a utilização de óleos essenciais (orégano, tomilho, cravo-da-índia e capim-limão) promoveu alterações sensoriais indesejáveis no produto, fato comprovado

devido a alterações da cor objetiva das mortadelas, com redução do índice de vermelho (a^*) e aumento do índice de amarelo (b^*). Oliveira et al. (2011), também, constataram que o uso de óleo essencial em concentrações elevadas promove alterações da coloração da mortadela, descaracterizando, assim, o produto. Esse autor verificou que a utilização do óleo essencial *Satureja montana L.* em concentrações superiores a 1,56% afetou negativamente a cor do produto, com reduções do índice de vermelho (a^*), e aumento da participação da tonalidade amarelo (aumento de b^* e h^*).

O componente linear da nisina e os componentes quadráticos do nitrito e da mistura de óleos essenciais foram significativos ($p < 0,10$) para o índice de saturação (C^*) das mortadelas, porém nenhum modelo de regressão ajustado foi significativo ($p < 0,10$) para tal análise.

Para o índice de luminosidade (L^*) das mortadelas no trigésimo dia de armazenamento, apenas o componente linear da nisina foi não significativo ($p > 0,10$) (Tabela 21), sendo possível o ajuste de um modelo a partir dos coeficientes significativos (Tabela 22).

Tabela 21 Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o Índice de luminosidade (L*) em mortadela adicionada de nitrito, nisina mistura de óleos essenciais, no Tempo 30

Variáveis	Luminosidade (L*)	
	CR	EP
Constante	64,6239*	0,046301
Nitrito (linear)	0,5520*	0,0217
Nitrito (quadrática)	-0,6037*	0,0239
Nisina (linear)	-0,0564	0,0217
Nisina (quadrática)	-0,4115*	0,0239
Óleo (linear)	0,6830*	0,0217
Óleo (quadrática)	-0,7463*	0,0239
Nitrito x Nisina	0,1162*	0,0284
Nitrito x Óleo	-0,3087*	0,0284
Nisina x óleo	-0,1837**	0,0284
R ²	0,9333	

*p<0,01 e **p<0,05.

Tabela 22 Modelo codificado da regressão para análise de índice de luminosidade (L*) no Tempo 30

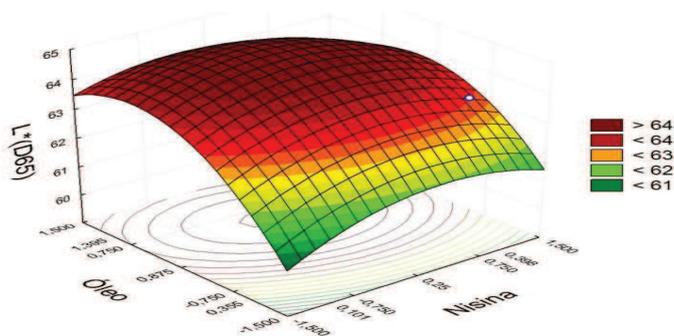
Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R ²
Índice de Luminosidade	$Y = 64,623965024747 + 0,55200515947467x_1 - 0,60375212089404x_1^2 - 0,41153981930674x_2^2 + 1,1625x_1x_2 - 0,30875x_3 - 0,18375$	0,006	0,9333

X1= variável codificada para nitrito; X2= variável codificada para nisina; X3= variável codificada para a mistura dos óleos essenciais de canela, orégano e gengibre.

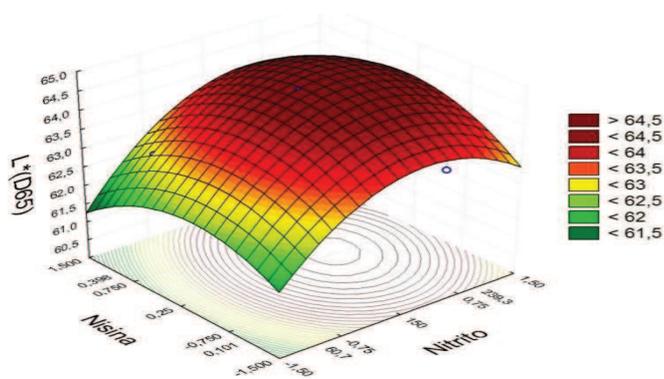
Com o modelo matemático ajustado (Tabela 22), foi possível construir a Superfície de Resposta das mortadelas em função das concentrações de nisina, nitrito e mistura dos óleos essenciais (Figura 10).

Maiores concentrações de mistura de óleos essenciais (Figura 10A), do nitrito (Figura 10B) e da mistura de óleos essenciais e nisina (Figura 10 C) induziram a diminuição na luminosidade das mortadelas. Observa-se que a adição da mistura de óleos essenciais foi favorecida por cada fator em estudo, porém com um menor efeito da nisina. Tanto a mistura de óleos quanto o nitrito aumentaram L^* , sendo que o maior aumento é na região de 150 a 200 ppm e 0,8 a 1,3% da mistura de óleos essenciais (Figura 10). A luminosidade é considerada o parâmetro de cor que governa a qualidade da carne e produtos cárneos (GARCIA-ESTEBAN et al., 2003). Scarpa et al. (2009) ao avaliarem a aceitação de produtos comerciais curados, observaram que a luminosidade foi o atributo de cor que mais influenciou quanto à aceitação do produto, sendo que amostras mais claras foram as preferidas. Para Bewer et al. (2001) a luminosidade é o parâmetro que melhor informa a intensidade visual da cor rósea.

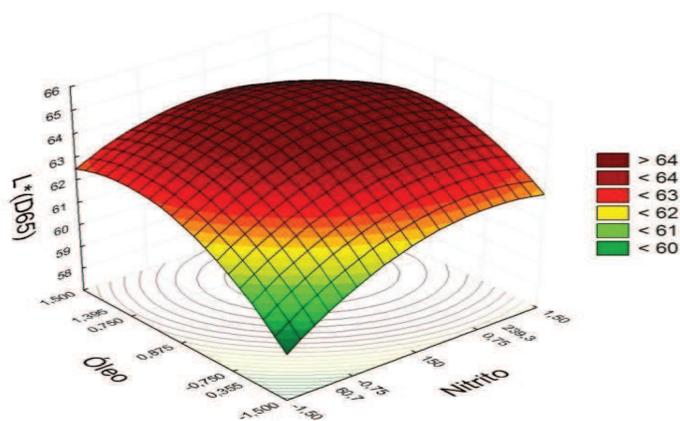
Em mortadelas formuladas com 1,56% de óleo essencial de *Satureja montana* e 100 ppm de nitrito e formuladas com 3,125% do óleo essencial e 200 ppm de nitrito foi observado aumento significativo para L^* entre o primeiro e vigésimo dia de estocagem (OLIVEIRA et al., 2011), fato não constatado neste estudo.



(A)



(B)



(C)

Figura 10 Superfície de resposta para o índice de luminosidade (L^*) das mortadelas acrescidas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 30

As principais diferenças entre os tratamentos podem ser visualizadas na Figura 11, referente ao trigésimo dia de armazenamento a 4 °C. Onde é possível observar que a principal diferença entre os tratamentos é o grau de claridade das mortadelas, sendo consistente com a análise estatística, embora um efeito significativo sobre a saturação também tenha sido observado.

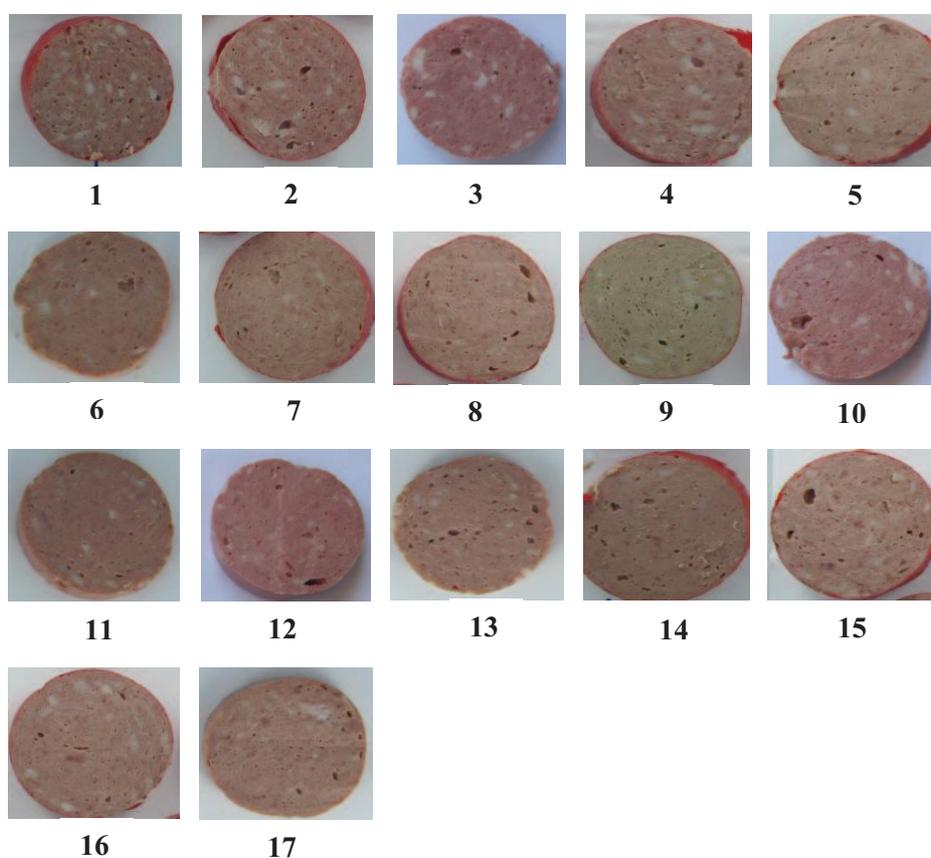


Figura 11 Mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais no primeiro dia de armazenamento

4.10 Oxidação lipídica (Índice de TBARS)

O efeito das variáveis, nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais sobre a oxidação lipídica das mortadelas foi avaliado medindo-se as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (índice de TBARS). Os valores médios para o índice de TBARS para os tratamentos no tempo zero e no trigésimo dia de armazenamento são representados na Tabela 23, não sendo possível ajustar o modelo para o tempo zero. Portanto, não foi possível verificar a influência das variáveis sobre oxidação lipídica das mortadelas.

Tabela 23 Valores médios de Oxidação lipídica (Índice de TBARS), mg de malonaldeído/kg, das mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 0 e Tempo 30

Trat	Tratamentos			Índice de TBARS (mg MAD/Kg)	
	NO2 (ppm)	Nisina (%)	Óleo (%)	0 dias	30 dias
1	60,7	0,101	0,355	0,3112	0,4069
2	239,3	0,101	0,355	0,4508	0,1436
3	60,7	0,398	0,355	0,3950	0,3551
4	239,3	0,398	0,355	0,3591	0,3710
5	60,7	0,101	1,395	0,6703	0,4149
6	239,3	0,101	1,395	0,5346	0,6384
7	60,7	0,398	1,395	0,3431	0,2713
8	239,3	0,398	1,395	0,3311	0,1675
9	0	0,25	0,875	0,3192	0,3271
10	300	0,25	0,875	0,2394	0,3431
11	150	0	0,875	0,3790	0,2194
12	150	0,5	0,875	0,1955	0,2194

“Tabela 23, conclusão”

Trat	Tratamentos			Índice de TBARS (mg MAD/Kg)	
	NO2 (ppm)	Nisina (%)	Óleo (%)	0 dias	30 dias
13	150	0,25	0	0,6423	0,4189
14	150	0,25	1,75	0,2832	0,2912
15	150	0,25	0,875	0,2872	0,1157
16	150	0,25	0,875	0,2753	0,1635
17	150	0,25	0,875	0,5027	0,2234

É importante destacar que a maioria dos valores obtidos nas análises se situou abaixo de 0,5 mg de malonaldeído/kg, a partir do qual os consumidores podem detectar a rancidez (SHEARD et al., 2000). Vale ressaltar, ainda, que mesmo os maiores valores obtidos no tratamento com 30 dias, situam-se em níveis seguros quanto à detecção da rancidez. Isso pode ser creditado ao conteúdo de antioxidantes naturais dos óleos essenciais e, também, ao nitrito, bem como a qualidade das embalagens utilizadas, as quais possuem baixa permeabilidade ao oxigênio.

Os componentes quadráticos do nitrito e da mistura de óleos essenciais, bem como a interação entre o nitrito e da mistura de óleos essenciais foram significativos ($p < 0,10$) para o índice de TBARS das mortadelas para o trigésimo dia de armazenamento (Tabela 24).

Tabela 24 Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o Índice de TBARS em mortadela adicionada de nitrito, nisina mistura de óleos essenciais, no Tempo 30

Variáveis	Índice de TBARS	
	CR	EP
Constante	0,1653**	0,0310
Nitrito (linear)	-0,0074	0,0146
Nitrito (quadrática)	0,0670***	0,0160
Nisina (linear)	-0,0321	0,0146
Nisina (quadrática)	0,0260	0,0160
Óleo (linear)	0,0001	0,0146
Óleo (quadrática)	0,0741**	0,0160
Nitrito x Nisina	-0,0059	0,0190
Nitrito x Óleo	0,0458	0,0190
Nisina x óleo	-0,0987**	0,0190
R ²	0,7093	

p<0,05 e *p<0,10

Com o modelo matemático ajustado para os coeficientes significativos (Tabela 25) foi possível construir a superfície de resposta das mortadelas em função das concentrações de nisina, nitrito e mistura dos óleos essenciais.

Tabela 25 Modelo codificado da regressão para análise de índice de TBARS no Tempo 30

Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R ²
Índice de TBARS	Y= 0,1984+0,059374734049783x ₁ ² +0,066443186430735x ₃ ² -0,0987525x ₁ x ₂	0,002	0,7093

X1= variável codificada para nitrito; X2= variável codificada para nisina; X3= variável codificada para a mistura dos óleos essenciais de canela, orégano e gengibre.

O nitrito e a mistura dos óleos essenciais apresentaram-se altamente efetivos na redução da oxidação lipídica quando encontravam-se próximos às regiões centrais das concentrações utilizadas desses compostos, sendo 150 ppm para o nitrito e 0,875 para a mistura dos óleos essenciais de canela, orégano e gengibre (Figura 12A e 12B). Constatando-se, ainda, que menores concentrações de nisina e mistura dos óleos essenciais, quando o nitrito apresentava-se fixo em 150 ppm, apresentaram melhor resultado, ou seja, maior poder antioxidante (Figura 12C).

O nitrito possui efeito antioxidante por meio da formação de compostos estáveis com a mioglobina indisponibilizando íon férrico (Fe^{+3}), para atuar como catalisador ativo das reações de oxidação (KARL-OTTO, 2208). Al-Shuibi e Al-Abdullah (2002) analisaram mortadelas elaboradas contendo diferentes níveis de nitrito e armazenadas durante 14 semanas a 4 e 25 °C, o resultado do experimento demonstrou índices de TBARS inferiores para as amostras que continham nitrito e índices superiores em amostras estocadas a 25 °C.

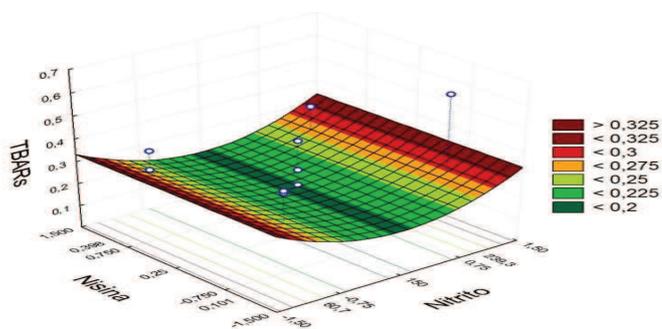
Os óleos essenciais utilizados no experimento foram os óleos de canela, orégano e gengibre e apresentam como constituintes majoritários o cinamaldeído, carvacrol e zingibereno, respectivamente. A atividade antioxidante desses compostos está relacionada com a presença do radical hidroxil ligados ao anel aromático, que são capazes de doar átomos de hidrogênio, estabilizando os radicais livres (CARVALHO, 2004).

O presente trabalho confirma a teoria de que o óleo essencial possui ação pró-oxidante ao invés de antioxidante, quando adicionado a altas concentrações.

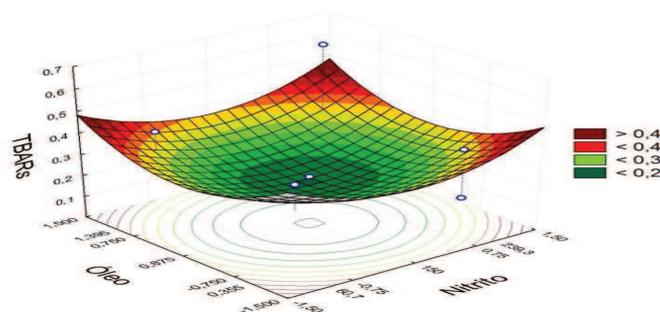
Dias et al. (2011) demonstraram em seu estudo que os valores de índice TBARs foram menores quando adicionadas concentração de nitrito de 150 ppm sem adição de óleo essencial e, também, uma maior oxidação lipídica quando

adicionadas altas concentrações da mistura de óleos essenciais contendo: tomilho, cravo da índia e capim-limão.

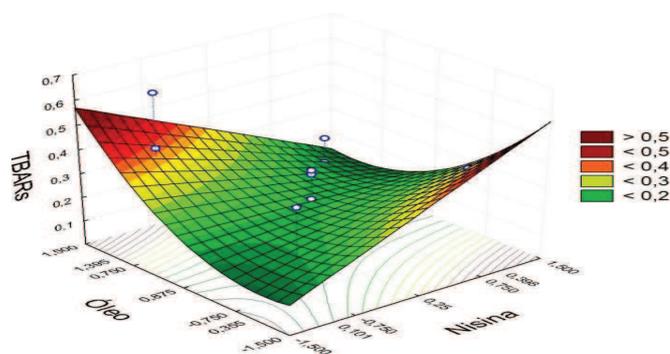
Oliveira et al. (2011), analisaram um modelo alimentar cárneo do tipo mortadela adicionado de óleo essencial de *S. montana* L. (0; 0,78; 1,56; 3,125%) e nitrito (0, 100, 100, 200 ppm), observando em mortadelas fabricadas sem adição de nitrito e sem óleo essencial índices de TBARS, significativamente, superiores aos encontrados para os demais tratamentos. Entretanto neste mesmo estudo foram observados índices de TBARS superiores, em maiores concentrações do óleo essencial (3,12%), ao final do armazenamento, tanto para 100 ppm quanto 200 ppm de nitrito, corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa (Figura 12B).



(A)



(B)



(C)

Figura 12 Superfície de resposta para o índice de TBARS das mortadelas acrescidas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 30

4.11 Textura

Os valores médios para os índices de textura dos tratamentos no primeiro dia de armazenamento são representados na Tabela 26. No tempo zero, os parâmetros dureza, adesividade, flexibilidade e mastigabilidade não se ajustaram ($p < 0,10$) a nenhum modelo. Portanto, não foi possível verificar a influência das variáveis sobre a textura sobre o ponto de vista desses parâmetros ou, possivelmente, os tratamentos não diferiram muito entre si e, com isso, os resultados não foram significativos.

Tabela 26 Valores médios para os índices de textura das mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 0

Tratamento	Parâmetros de Textura									
	Tratamento					Parâmetros de Textura				
	NO2	Nisina	Óleo	Dureza (N)	Coesividade	Adesividade (N.mm)	Flexibilidade (mm)	Mastigabilidade (N.mm)		
1	60,7	0,101	0,355	13,2340	0,5955	-0,0991	4,5625	35,9573		
2	239,3	0,101	0,355	16,0411	0,6847	-0,0858	5,0275	55,2198		
3	60,7	0,398	0,355	24,5850	0,6837	-0,1319	4,2850	72,0306		
4	239,3	0,398	0,355	14,7142	0,6598	-0,0785	4,6100	44,7594		
5	60,7	0,101	1,395	12,0527	0,5490	-0,1082	4,8400	32,0281		
6	239,3	0,101	1,395	23,7208	0,6192	-0,1178	5,1825	76,1273		
7	60,7	0,398	1,395	19,1742	0,6107	-0,0363	4,3775	51,2618		
8	239,3	0,398	1,395	20,4256	0,7064	-0,0624	4,6950	67,7493		
9	0	0,25	0,875	21,1292	0,7112	-0,0940	4,8425	72,7751		
10	300	0,25	0,875	24,4137	0,7081	-0,1596	4,0400	69,8487		
11	150	0	0,875	25,3582	0,5836	-0,1212	5,4425	80,5458		
12	150	0,5	0,875	23,0638	0,6762	-0,1583	4,1550	64,8031		
13	150	0,25	0	29,2938	0,7021	-0,2200	5,5250	113,6364		
14	150	0,25	1,75	14,0192	0,5420	-0,0839	4,5025	34,2148		

“Tabela 26, conclusão”

Tratamento				Parâmetros de Textura			
Tratamento	NO2	Nisina	Óleo	Dureza (N)	Coabilidade	Adesividade (N.mm)	Flexibilidade (mm)
15	150	0,25	0,875	16,0629	0,6767	-0,0716	4,7450
16	150	0,25	0,875	16,8838	0,6140	-0,0778	4,6550
17	150	0,25	0,875	25,2827	0,6458	-0,1510	5,4950

Os componentes lineares da nisina e da mistura de óleos essenciais foram significativos ($p < 0,10$) para o parâmetro coesividade das mortadelas para o primeiro dia de armazenamento (Tabela 27). A partir dos modelos ajustados para os coeficientes significativos (Tabela 28) foi possível construir as superfícies de resposta em função das concentrações de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais (Figura 13).

Tabela 27 Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o parâmetro coesividade em mortadela adicionada de nitrito, nisina mistura de óleos essenciais, no Tempo 0

Variáveis	Coesividade	
	CR	EP
Constante	0,646598*	0,018050
Nitrito (linear)	0,016569	0,008481
Nitrito (quadrática)	0,019219	0,009344
Nisina (linear)	0,026961***	0,008481
Nisina (quadrática)	-0,009055	0,009344
Óleo (linear)	-0,029846***	0,008481
Óleo (quadrática)	-0,011832	0,009344
Nitrito x Nisina	-0,010946	0,011077
Nitrito x Óleo	0,012583	0,011077
Nisina x óleo	0,010692	0,011077
R ²	0,7748	

* $p < 0,01$ e *** $p < 0,10$

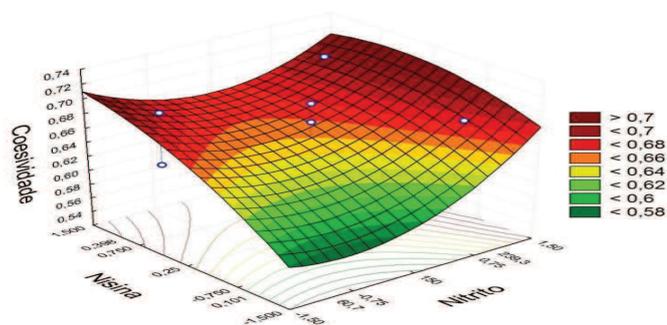
Tabela 28 Modelo codificado da regressão para análise da coesividade no Tempo 0

Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R ²
Coesividade	$Y=0,6465+0,01656x_1+0,01921x_2$	0,001	0,7748

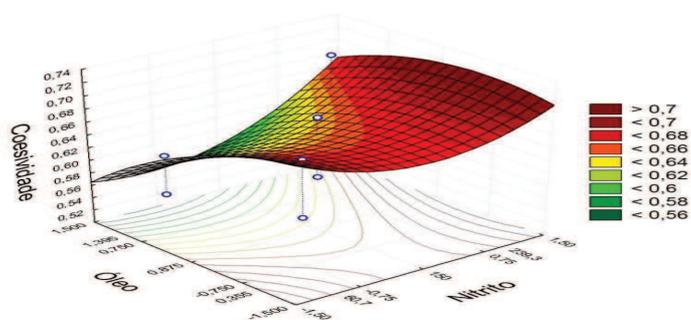
X1= variável codificada para nitrito; X2= variável codificada para nisina.

A variável que provocou uma maior alteração, ou seja, uma redução da coesividade foi a mistura de óleos essenciais (Figura 13B e Figura 13C). Quando comparados aos efeitos das combinações entre nitrito e nisina, com a variável mistura de óleos essenciais fixa em 0,875 pode-se constatar que maiores concentrações de nitrito e nisina provocaram um aumento da coesividade das mortadelas (Figura 13A). Diferente desse estudo, Dutra (2009) observou um efeito negativo do nitrito para coesividade em mortadelas. E em concordância com esta pesquisa, em relação à coesividade, Dong et al. (2007) que, estudando salsichas cozidas com diferentes adições do nitrito de sódio (0, 50, 100 e 150 ppm) e armazenadas sob refrigeração, observaram que o índice do nitrito foi correlacionado negativamente com a dureza e a adesividade e correlacionado positivamente com coesividade, flexibilidade e fraturabilidade.

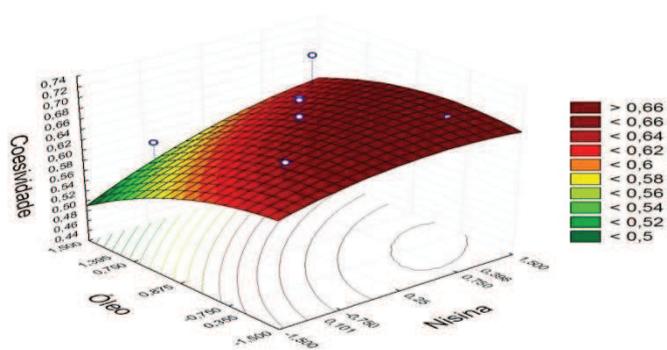
A coesividade é definida como a força das ligações internas, que determina a extensão que o alimento é deformado antes da ruptura. Representa como o alimento responde à segunda compressão, após suportar a primeira (RAMOS; GOMIDE, 2009).



(A)



(B)



(C)

Figura 13 Superfície de resposta para o índice de coesividade das mortadelas acrescidas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 30

Os valores médios para os índices de textura dos tratamentos no trigésimo dia de armazenamento são representados na Tabela 29. Não foi possível ajustar um modelo matemático ($p < 0,10$) para os parâmetros adesividade, flexibilidade e mastigabilidade. Portanto, não foi possível verificar a influência das variáveis sobre a textura sobre o ponto de vista desses parâmetros ou, possivelmente, os tratamentos não diferiram muito entre si e, com isso, os resultados não foram significativos.

Tabela 29 Valores médios para os índices de textura das mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais, no Tempo 30

Tratamento	Tempo 30									
	NO2	Nisina	Óleo	Dureza (N)	Coesividade	Adesividade (N.mm)	Flexibilidade (mm)	Mastigabilidade (N.mm)		
1	60,7	0,101	0,355	8,611678911	0,605716	-0,070955754	4,98	25,97681615		
2	239,3	0,101	0,355	13,84138532	0,697154	-0,030011116	4,5175	43,59197143		
3	60,7	0,398	0,355	20,56546036	0,714769	-0,057934843	4,73	69,5289048		
4	239,3	0,398	0,355	15,20703665	0,585937	-0,050979531	4,6075	41,05448947		
5	60,7	0,101	1,395	12,13602712	0,516414	-0,052475443	5,1	31,96278778		
6	239,3	0,101	1,395	17,24214451	0,631138	-0,02909128	4,765	51,85353498		
7	60,7	0,398	1,395	21,94740648	0,658966	-0,076378765	4,565	66,02173974		
8	239,3	0,398	1,395	21,5042799	0,659727	-0,065570971	4,7725	67,70724018		
9	0	0,25	0,875	15,84034129	0,623321	-0,077441903	5,0075	49,44214437		
10	300	0,25	0,875	22,31533125	0,71077	-0,042656395	4,81	76,29178738		
11	150	0	0,875	19,70759051	0,674657	-0,083428712	4,5975	61,12777595		
12	150	0,5	0,875	19,04139059	0,674731	-0,053362634	5,0575	64,97784933		
13	150	0,25	0	16,77177492	0,727455	-0,084687596	4,595	56,06225371		

“Tabela 29, conclusão”

Tratamento						Tempo 30		
Tratamento	NO2	Nisina	Óleo	Dureza (N)	Coesividade	Adesividade (N.mm)	Flexibilidade (mm)	Ma
14	150	0,25	1,75	12,67223792	0,513022	-0,066112474	4,84	3
15	150	0,25	0,875	15,49310279	0,696385	-0,061947305	4,75	5
16	150	0,25	0,875	18,2097988	0,663056	-0,078727828	4,6725	5
17	150	0,25	0,875	20,23572479	0,730173	-0,154118467	5,0725	7

Após trinta dias de armazenamento apenas o coeficiente linear da nisina foi significativo ($p < 0,10$) para a dureza das mortadelas (Tabela 30).

Tabela 30 Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para dureza em mortadela adicionada de nitrito, nisina mistura de óleos essenciais, no Tempo 30

Variáveis	Dureza	
	CR	EP
Constante	18,06800*	1,371024
Nitrito (linear)	1,12953	0,644221
Nitrito (quadrática)	0,09309	0,709724
Nisina (linear)	1,92555***	0,644221
Nisina (quadrática)	0,19820	0,709724
Óleo (linear)	0,56557	0,644221
Óleo (quadrática)	-1,45021	0,709724
Nitrito x Nisina	-2,01717	0,841344
Nitrito x Óleo	0,59896	0,841344
Nisina x óleo	0,09426	0,841344
R ²	0,60	

* $p < 0,01$ e *** $p < 0,10$

Não foi encontrada uma possível explicação para a relação direta entre o aumento das concentrações de nisina e sua influência na dureza das mortadelas, uma vez que as quantidades adicionadas foram muito baixas para interferir no produto.

Para o Tempo 30, nenhum modelo de regressão ajustado foi significativo ($p > 0,10$) para a análise do parâmetro coesividade em mortadelas. Esse fato não permitiu verificar quanto à interferência da adição das diferentes

concentrações de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais na alteração da coesividade após 30 dias de armazenamento.

5 CONCLUSÃO

Os endósporos *Clostridium perfringens* Tipo A foram mais susceptível ao óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), que promoveu melhor resposta antimicrobiana com uma concentração mínima inibitória (MIC) de 0,4%, seguida dos óleos de *Zingiber officinale* (gengibre), *Origanum vulgare* (orégano), *Cymbopogon citratus* (capim limão), *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) com MIC de 3,1%. Já os óleos de *Litsea cubeba* (pimenta chinesa), *Citrus limon* (limão siciliano), *Citrus paradisi* (grapefruit), *Syzygium aromaticum* (cravo da índia), *Ocimum basilicum* (manjerição/basilcão) e *Thymus vulgaris* (tomilho branco) apresentaram MIC de 6,3%. Enquanto que na utilização de *Syzygium officinalis* (sálvia) e *Citrus reticulata v.tangerine* (tangerina) constatou-se a necessidade de 12,5% desses óleos para a inibição da germinação do endósporo dessa bactéria. Enquanto a nisina apresentou um MIC de 0,25%.

Ao analisar as combinações entre os óleos essenciais de canela, orégano, gengibre e cardamomo contra o *Clostridium perfringens* Tipo A constatou-se maior eficiência na redução da população do micro-organismo pelo gengibre, seguido dos óleos essenciais de canela e orégano e menor eficiência do cardamomo.

Observou-se efeito positivo entre as três variáveis em estudo, nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais (canela, orégano e gengibre), adicionadas às mortadelas, quanto à redução da população inicial, 10^5 UFC/g, de endósporos do *Clostridium perfringens* e ainda contra as células vegetativas do mesmo micro-organismo em todos os tratamentos.

Foi observado efeito pró-oxidante de altas concentrações de óleos essenciais sobre as mortadelas adicionadas de nitrito, nisina e mistura de óleos essenciais (canela, orégano e gengibre).

A utilização de óleos essenciais promoveu alterações na cor e na textura das mortadelas.

A adição de nitrito, independentemente das demais variáveis, apresentou-se diretamente relacionada às concentrações do nitrito residual durante todo o período de armazenamento das mortadelas.

Portanto, observa-se que o uso de compostos naturais, desde que não seja em altas concentrações, poderia figurar como uma alternativa para a redução da quantidade de aditivos artificiais utilizados em alimentos, particularmente em produtos cárneos, reduzindo os potenciais riscos à saúde do consumidor.

REFERÊNCIAS

AHN, D. U.; OLSON, D. G. Effect of muscle type, packaging, and irradiation on lipid oxidation, volatile production, and color in raw pork pat. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Oxford, v. 6, n. 2, p.135-141, June 2005.

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

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2001. 416 p.

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

AURELI, P.; COSTANTINI, A.; ZOLEA, S. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 5, p. 344-348, 1992.

BADI, H. N. et al. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 19, p. 231–236, 2004.

BAILEY, A. E. **Bailey's industrial oil and fat products**. 5th ed. New York: J. Wiley, 1996. v. 3.

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

BASSOLE, I. H. N. et al. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**, New York, v. 62, n. 2, p. 209-212, 2003.

BAYER, A. S. et al. In vitro resistance of *Staphylococcus aureus* to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with alterations in cytoplasmic membrane fluidity. **Infection Immunity**, Washington, v. 68, p. 3548-3553, 2000.

BOURNE, M. C. Texture profile analysis. **Food Technology**, Chicago, v. 32, n. 7, p. 62-66, 1978.

BRASIL. Ministério da Saúde. 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”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 dez. 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Mortadela. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2000. Seção I, p. 6-10.

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

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.

BRYNESTAD, S.; GRANUM, P. E. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74, n. 3, p. 195-202, 2002.

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

CALLUCCI, L. et al. Effects of gamma-irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Aston, v. 51, n. 4, p. 927-934, 2003.

CAMMACK, R. et al. Review nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1411, n. 2/3, p.475-488, 1999.

CARDOSO, M. G. et al. **Plantas aromáticas e condimentos**. Lavras: UFLA, 2005. 83 p.

CARMAN, R. J. et al. *Clostridium perfringens* toxin genotypes in the faces of healthy North Americans. **Anaerobe**, Blacksburg, v. 14, n. 2, p. 102-108, Apr. 2008.

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 tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480 p.

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

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

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

CIMANGA, K. et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 79, n. 2, p. 213-220, 2002.

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.

CUTTER, C. N. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 5, p. 601-607, May 2000.

DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, 1997. p. 520-556.

DAVIDSON, P. M.; NAIDU, A. S. Phyto-phenols. In: NAIDU, A. S. (Ed.). **Natural food antimicrobial systems**. Boca Raton: CRC, 2000. p. 265-294.

DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. **Food Technology**, Chicago, v. 43, n. 1, p. 148-155, Jan. 1989.

DENYER, S. P.; HUGO, W. B. Mechanisms of antibacterial action - A summary. In: _____. (Ed.). Mechanisms of action of chemical biocides. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, v. 63, p. 331-334, 1991.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, p. 273-285, 2004.

DIAS, N. A. A. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre *Clostridium perfringens* tipo A. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO, 5., e CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 11., 2011, Salvador. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 25, p. 194-195, 2011.

DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, p. 2745-2749, 2006.

DI PASQUA, R. et al. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 12, p. 4863-4870, 2007.

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

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, 2000.

DUNCAN, C. L, STRONG, D. H. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 82-89, Jan. 1968.

DUTRA, M. P. et al. Efeito da radiação gama na cor objetiva de mortadelas elaboradas com diferentes concentrações de nitrito. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 5., 2009, São Paulo. **Anais...**Campinas: ITAL/CTC, 2009. 1 CD ROM.

FARMER, E. H. et al. The course and mechanism of autoxidation reaction in olefinic and polyolefinic substances, including rubber. **Transactions of the Faraday Society**, London, v. 38, p. 348-356, 1942.

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

FORSYTHE, J. S. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 423 p.

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

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, p. 1545-1560, 2002.

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.

GLASS, K. A.; JOHNSON, E. A. Antagonistic effect of fat on the antibotulinal activity of food preservatives and fatty acids. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 675-682, 2004.

GLÓRIA, M. B. A.; BARBOUR, J. F.; SCALAN, R. A. Volatile nitrosamines in fried bacon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, p.1816-1818, 1997.

GOMES, A. M. et al. Genotipificação de *Clostridium perfringens* isolados de frangos de corte através da PCR múltipla. **Ciência Rural**, Santa Maria v. 38, n.7, p. 1943-1947, out. 2008.

GUINANE, C. M. et al. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food (Review). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, p. 1316-1325, 2005.

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

HARPAZ, S. et al. Effects of herbal essential oils used to exten the shelf life of freshwaterrearedd Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 3, p. 410-417, 2003.

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

HELANDER, I. M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 3590-3595, 1998.

ISMAIEL, A. A.; PIERSON, M. D. Effect of sodium nitrite end origanum oil on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in TYG broth and ground pork. **Journal of Food protection**, Des Moines, v. 53, n. 11, p. 958-960, 1990.

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

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 347.

JUNEJA, V. K. et al. Increased thermotolerance of *Clostridium perfringens* spores following sublethal heat shock. **Food Control**, Vurrey, v.14, p.163–168, 2003.

KARATZAS, A. K. et al. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 3, p. 463-469, 2001.

KARL-OTTO, H. The use and control of nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, Barking, v. 78, n. 1/2, p. 68-76, 2008.

KOEDAM, A. **Antimikrobielle wirksamkeit ätherischer öle: eine literaturarbeit 1960-1976 - fortsetzung und schluss**. Riechstoffe: Aromen, Kosmetika, 1977. p. 36-41.

LABBÉ, R. G. *Clostridium perfringens*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American public Health, 2001. p. 325-330.

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

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.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal Food Microbiology**, Oxford, v. 55, n. 1/3, p. 181-186, 2000.

LI, J.; MCCLANE, B. A. Comparative effects of osmotic, sodium nitrite-induced, and pH-induced stress on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 7620–7625, 2006.

LIU, D. C. et al. Effect of various levels of rosemary or Chinese mahogany on the quality of fresh chicken sausage during refrigerated storage. **Food Chemistry**, Oxford, v.117, n.1, p.106-113, Nov. 2009.

MARRIOT, N. G.; LECHOWICH, R. V.; PIRSON, M. D. Use of nitrite and nitrite-sparing agents in meats: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 44, n. 11, p. 881-885, 1981.

MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, New York, v. 18, n. 2, 191-208, 2002.

McMINDERS, M. K.; SIDLERS, A. J. Nitrite mode of action: inhibition of yeast pyruvate decarboxylase (E. C. 4.1.1.1) and clostridial pyruvate-ferredoxin oxidoreductase (E. C. 1.2.7.1) by nitric oxide. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 35, n. 3, p. 917-919, May 1988.

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

MENDOZA-YEPES, M. J. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 17, n. 1, p. 47-55, 1997.

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

MORAIS, M. S. V. et al. Isolamento de esporos de equipamentos de abatedouros avícolas e avaliação de sua resistência a sanificantes químicos. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 325-329, 1997.

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

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

OLIVEIRA, T. L. C. **Atividade do óleo essencial de segurelha (*Satureja montana* L.) sobre *Clostridium perfringens* em sistemas de emulsões cárneas elaboradas com diferentes níveis de nitrito**. 2010. 152 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

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

OLIVO, R. **O mundo do frango**: cadeia produtiva da carne de frango. Criciúma: Do Autor, 2006. 680 p.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Emulsões Cárneas. In: SHIMOKOMAKI, M. et al. (Ed.). **Atualidades em ciência e tecnologia de carnes**. São Paulo: Varela, 2006. cap. 9.

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* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Vurrey, v. 18 p. 414–420, 2007.

PAREDES-SABJA, D. et al. Combined effects of hydrostatic pressure, temperature and pH on the inactivation of spores of *Clostridium perfringens* type A and *Clostridium sporogenes* in buffer solutions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, p. 202–206, 2007.

PASTER, N. et al. Inibitory effect of oregano and thyme essential oils moulds and foodborne bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 33-37, July 1990.

PEGG, R.B.; SHAHIDI, F.S. **Nitrite curing of meat: the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives**. Trumbull: Food & Nutrition, 2000.

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, 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.

PINTORE, G. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavour and Fragrance Journal**, Sassari, v. 17, n. 1, p. 15-19, 2002.

PIZZALE, L. et al. Antioxidant activity of sage and oregano extracts related to their phenolic compound content. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 82, p. 1645–1651, 2002.

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: V CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E

TECNOLOGIA DE CARNES, 1., 2009, São Paulo. **Anais...** Campinas: ITAL/CTC, 2009. 1 CD ROM.

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

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

RIHA, J. W. E.; SOLBERG, M. *Clostridium perfringens* inhibition by sodium nitrite as a function of pH, inoculum size and heat. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 40, n. 3, p. 439-442, May 1975.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocin diversity ecological and evolutionary perspectives. **Biochemie**, Paris, v. 84, p. 357-364, 2002.

RODRIGES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processo: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326 p.

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.

SANTOS, R. E. V. **Avaliação física, química e microbiológica e nutricional de mortadelas formuladas com misturas de sangue suíno e concentrado protéico de soro de leite**. 2007. 113 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

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.

SHARIF ALI, S. et al. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants: review. **Food Research International**, Barking, v. 41, n. 1, p. 1-15, 2008.

SHEARD, P. R. et al. Shelf life and quality of pork products with raised n-3 PUFA. **Meat Science**, Barking, v. 55, n. 2, p. 213-221, June 2000.

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

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. 96-103, 1999.

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

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

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. E. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, p. 1646-1653, Apr. 2000.

SZCZESNIAK, A.S. Texture Profile Analysis: methodology interpretation clarified. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, n. 6, vii (Letters), 1998.

TAORMINA, P. J.; BARTHOLOMEW, G. W.; DORSA, W. J. Incidence of *Clostridium perfringens* in commercially produced cured raw meat product mixtures and behavior in cooked products during chilling and refrigerated storage. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, p. 72-81, 2003.

TASSOU, C.; DROSINOS, E. H.; NYCHAS, G. J. E.; Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 °C and 10 °C. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 78, p. 593-600, 1995.

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

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

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

VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 56, p. 395-411, 1992.

WALTERS, C. L. Reactions of nitrate and nitrite in foods with special reference to the determination of N-nitroso compounds. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 9, n. 5, p. 441-447, 1992.

WAN, J.; WILCOCK, A.; COVENTRY, M. J. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, p. 152-158, 1998.

WILSON, C. L.; DROBY, S. **Microbial Food Contamination**. Boca Raton: CRC, 2000.

YUNES, J. F. F. **Avaliação dos efeitos da adição de óleos vegetais como substitutos de gordura animal em mortadela**. 2010. 103 f. Tese (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

ZHANG, G.; HOLLEY, R.A. Development and PFGE monitoring of dominance among spoilage lactic acid bacteria from cured meats. **Food Microbiology**, London, v. 16, n. 6, p. 633-644, Dec. 1999.