



**SILAS RODRIGO ISIDORO**

**AÇÃO DE EMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE  
ENDÓSPOROS DE *Clostridium botulinum* e *Clostridium  
sporogenes* EM MORTADELA SEM ADIÇÃO DE NITRITO**

**LAVRAS- MG**

**2021**

**SILAS RODRIGO ISIDORO**

**AÇÃO DE EMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE ENDÓSPOROS DE  
*Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes* EM MORTADELA SEM ADIÇÃO DE  
NITRITO**

Dissertação apresentada ao Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos.

**Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli**  
Orientadora

**LAVRAS – MG**  
**2021**

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

Isidoro, Silas Rodrigo.

Ação de emulsões de óleos essenciais sobre endósporos de  
*Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes* em mortadela sem  
adição de nitrito / Silas Rodrigo Isidoro. - 2021.

46 p.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Estrutura de resistência. 2. Conservante natural. 3.  
Botulismo. I. Piccoli, Roberta Hilsdorf. II. Título.

**SILAS RODRIGO ISIDORO**

**AÇÃO DE EMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE ENDÓSPOROS DE  
*Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes* EM MORTADELA SEM ADIÇÃO  
NITRITO**

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Ciência dos  
Alimentos da Universidade Federal  
de Lavras como parte das  
exigências do Curso de Mestrado  
em Ciência dos Alimentos.

**Aprovada em 22 de março de 2021**

Profª Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli	DCA/UFLA
Prof. Dr. Eduardo Mendes Ramos	DCA/UFLA
Profª Dra. Maíra Maciel Mattos de Oliveira	CTA/IFES

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2021**

*Aos meus pais, Osvandir e Durvalina.*

DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Osvandir e Durvalina, exemplos de humildade e sabedoria, pelo amor, dedicação, carinho e amizade e por não medirem esforços para realização dos meus sonhos.

À minha irmã Simone, pelo carinho e companheirismo.

A todos os meus familiares, pelo apoio, pelas orações, estímulo e cumplicidade.

À minha amada Ivana, pelo amor, apoio, dedicação e todas as experiências compartilhadas e vividas com muita alegria, para que o futuro seja ainda melhor.

À Universidade Federal de Lavras, em especial, ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, Profa. Roberta Hilsdorf Piccoli, por ser sinônimo de sabedoria, por essa orientação, pelo apoio, incentivo e principalmente, pela paciência. Obrigado pela confiança depositada em mim.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Natália, Nelma, Juliana, Angélica, Michelle, Nicholas, Bruna, Suemis e Raquel, pelo companheirismo. Em especial, a Heloisa e Eliane que foram essenciais durante a realização do projeto e por todo conhecimento transmitido, ofereço-lhes meu afeto e o mais sincero agradecimento.

Aos meus amigos Ana Paula, Rafael, Daniele e Lethicia, que me acompanharam durante esta jornada, tornando-a mais leve e prazerosa.

A todos que de alguma forma participaram deste trabalho, meus eternos agradecimentos.

## RESUMO

Os óleos essenciais de especiarias têm se destacado como uma alternativa promissora, não só na substituição, mas também, em uso conjunto com concentrações reduzidas de conservantes sintéticos em alimentos como sais de nitrito, para o controle de variados microrganismos. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a ação antimicrobiana de mistura de óleos essenciais sobre endósporos de *Clostridium botulinum* tipo A e *Clostridium sporogenes* inoculados em mortadela sem adição de nitrito, bem como, a sua influência sobre as características físico-químicas do produto. As concentrações mínimas inibitórias (CMI) e mínimas esporicidas (CME) dos óleos essenciais de alho, basilicão, pimenta chinesa, pimenta rosa, segurelha e tomilho foram determinadas utilizando Caldo *Reinforced Clostridium* (RCM), acrescido de 0,5% (v/v) de *Tween* 80, com incubação a 37°C/48 horas, em condições anaeróbicas. Todos os óleos apresentaram CMI de 0,094% sobre *C. botulinum*. Entretanto, para *C. sporogenes* houve variações entre 0,094 e 0,188% (v/v). Dentre as concentrações de óleos testada, apenas a de alho foi esporicida, com CME de 1,5% (v/v) para *C. botulinum* e 3% (v/v) para *C. sporogenes*. A partir desses resultados, foram selecionados os óleos de alho, segurelha, basilicão e pimenta rosa para o estudo de sinergismo. Utilizando-se o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), foram elaboradas e avaliadas quanto à sua atividade inibitória, 27 misturas dos óleos essenciais selecionados. A metodologia empregada foi a mesma daquela utilizada para determinação da CMI e CME. Todas as misturas inibiram o crescimento de ambas as bactérias, porém, nenhuma apresentou ação esporicida. Dessa forma, o ensaio contendo 0,019% de alho, 0,019% de basilicão, 0,019% de pimenta rosa e 0,019% de segurelha foi selecionado para avaliação da ação inibitória sobre *C. botulinum* e *C. sporogenes* inoculados em mortadelas. Essas foram inoculadas com 10<sup>4</sup> UFC/g de endósporos das bactérias, adicionadas dos óleos essenciais e mantidas a 15°C/15 dias. A quantificação das células vegetativas e de endósporos de *C. botulinum* e *C. sporogenes* foi realizada bem como a determinação do pH, da oxidação lipídica e avaliação da cor das mortadelas, nos dias 0, 3, 6 e 15 dias. *C. botulinum* apresentou maior sensibilidade quando comparado ao *C. sporogenes* aos óleos essenciais. Observou-se, durante o período de estocagem que, tanto os esporos de *C. botulinum*, quanto de *C. sporogenes* germinaram e se multiplicaram. Entretanto, as células vegetativas de *C. botulinum* se mantiveram praticamente estável e com leve diminuição ao longo do tempo, já as de *C. sporogenes* aumentaram rapidamente. A emulsão dos óleos diminui a oxidação lipídica do produto, não alterou o pH e promoveu alteração apenas na luminosidade (*L\**), deixando o produto mais escuro. Pode-se concluir que as duas cepas se comportam diferentemente quando submetidas à presença dos óleos essenciais em um produto cárneo, e que a emulsão dos óleos essenciais testada se mostrou promissora como conservante e antioxidante para ser utilizado em produtos cárneos em substituição aos sais de nitrito.

**Palavras-chave:** Estrutura de resistência, Conservante natural e Botulismo.

## ABSTRACT

Spice essential oils have stood out as a promising alternative, not only in substitution, but also in conjunction with reduced concentrations of synthetic preservatives in foods such as nitrite salts, for the control of various microorganisms. This work aimed to evaluate the antimicrobial action of a mixture of essential oils on endospores of *Clostridium botulinum* type A and *Clostridium sporogenes* inoculated in mortadella without the addition of nitrite as well as their influence on the physicochemical characteristics of the product. The minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum sporicidal concentrations (MSC) of the essential oils of garlic, basil, Chinese pepper, pink pepper, savory and thyme were determined using *Reinforced Clostridium* Broth (RCM) plus 0.5% (v/v) *Tween* 80, incubation at 37°C/48 hours under anaerobic conditions. All oils showed a MIC of 0.094% over *C. botulinum*, however, for *C. sporogenes* there were variations between 0.094 to 0.188% (v/v). Only garlic was sporicidal among the oil concentrations tested, with MSC of 1.5% (v/v) for *C. botulinum* and 3% (v/v) for *C. sporogenes*. From these results, garlic, savory, basil and pink pepper oils were selected for the study of synergism. Using the Central Rotational Composite Design (DCCR), 27 mixtures of the selected essential oils were prepared and evaluated for their inhibitory activity. The methodology used was the same as that used to determine MIC and MSC. All mixtures inhibited the growth of both bacteria, but none showed sporicidal action. Thus, the assay containing 0.019% garlic, 0.019% basil, 0.019% pink pepper and 0.019% savory was selected to evaluate the inhibitory action on *C. botulinum* and *C. sporogenes* inoculated in mortadella. These were inoculated with 10<sup>4</sup> CFU/g of bacterial endospores, added with essential oils and maintained at 15°C/15 days. The quantification of the vegetative cells and endospores of *C. botulinum* and *C. sporogenes* was performed, as well as the determination of pH, lipid oxidation and color evaluation of mortadella, on days 0, 3, 6 and 15 days. *C. botulinum* showed greater sensitivity when compared to *C. sporogenes* to essential oils. During the storage period, it was observed that both *C. botulinum* and *C. sporogenes* spores germinated and multiplied, however, the vegetative cells of *C. botulinum* remained practically stable and slightly decreased over time, whereas those of *C. sporogenes* increased rapidly. The emulsion of the oils reduces the lipid oxidation of the product, does not alter the pH and promotes changes only in the luminosity (*L*\*), making the product darker. It can be concluded that the two strains behave differently when subjected to the presence of essential oils in a meat product and that the emulsion of the essential oils tested proved to be promising as a preservative and antioxidant to be used in meat products to replace nitrite salts.

**Keywords:** Structure Strength, Natural Preservative and Botulism.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Gênero <i>Clostridium</i> .....</b>	<b>11</b>
2.1.1 <i>Clostridium botulinum</i> .....	12
2.1.2 <i>Clostridium sporogenes</i> .....	13
<b>2.2 Controle de bactérias do gênero <i>Clostridium</i> em alimentos: sais de nitrato/nitrito</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Óleos essenciais .....</b>	<b>14</b>
2.3.1. Atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais.....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Óleos essenciais e análise química .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Microrganismos, padronização e obtenção dos inóculos .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Concentração Mínima Inibitória e a Concentração Mínima Esporicida dos óleos essenciais .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4 Combinações entre os óleos essenciais .....</b>	<b>23</b>
<b>3.5 Fabricação da mortadela e inoculação.....</b>	<b>25</b>
<b>3.6 Quantificação de endósporos e células vegetativas de <i>Clostridium botulinum</i> e <i>C. sporogenes</i> na mortadela .....</b>	<b>27</b>
3.6.1 Determinação do pH .....	27
3.6.2 Cor Objetiva .....	27
3.6.3 Oxidação lipídica (índice de TBARs) .....	28
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre <i>C. sporogenes</i> e <i>C. botulinum</i> e componentes majoritários dos óleos essenciais .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2 Germinação e crescimento de <i>Clostridium botulinum</i> e <i>Clostridium sporogenes</i> inoculados em mortadela adicionada de mistura de óleos essenciais.....</b>	<b>32</b>
<b>4.3 pH, cor objetiva e oxidação lipídica .....</b>	<b>35</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de sal de cura, que é constituído por sais de nitrito e de nitrato, em produtos curados promove o desenvolvimento da cor, textura e sabores únicos; vida útil prolongada com excelente estabilidade no armazenamento e controle efetivo do ranço, os quais não são obtidos pela utilização de nenhum outro sal. Entretanto, em 2006, a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) concluiu que o nitrato ou nitrito ingeridos sob condições que resultem em formação de nitrosaminas são provavelmente carcinogênicos para seres humanos. Apesar disso, esse aditivo desempenha papel fundamental em produtos cárneos curados cozidos no controle de *Clostridium botulinum*, bactéria patogênica, e *Clostridium sporogenes*, bactéria deteriorante.

*Clostridium botulinum* é uma bactéria anaeróbia obrigatória, Gram-positiva, formadora de endósporos resistentes ao calor e produtor das toxinas botulínicas. Dentre essas neurotoxinas, as denominadas de A, B e E são as responsáveis pelo botulismo em seres humanos, doença com elevada mortalidade quando não tratada adequadamente. O consumo de alimentos contendo essas toxinas pode levar à síndrome clínica clássica da neuropatia craniana e paralisia flácida simétrica descendente, que necessita de suporte ventilatório mecânico em aproximadamente 60% dos pacientes.

O botulismo alimentar não é muito comum, devido principalmente, à utilização do sal de cura, contudo, é considerado doença de emergência pública, devido à sua severidade, que é demonstrada por dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde, onde entre os anos de 2001 e 2014, foram registrados 85 casos com 24 óbitos, com taxa de mortalidade de 28,24% (BRASIL, 2014). Dentre os produtos cárneos curados cozidos envolvidos em surtos de botulismo, destacam-se as mortadelas, produtos que propiciam ambiente anaeróbico ao microrganismo, pH superior a 4,5 e por serem cozidos, têm sua microbiota diminuída, restando, entretanto, endósporos de *C. botulinum*, que podem se desenvolver sem competição.

Embora não esteja associado à toxinfecções alimentares, *C. sporogenes* se destaca devido sua estreita semelhança genética a *C. botulinum* tipo A, sendo utilizado como microrganismo modelo em detrimento a *C. botulinum*, devido aos riscos que esse proporciona. A grande vantagem do emprego de *C. sporogenes* no desenvolvimento de pesquisas é que ele não produz toxinas. Além disso, na indústria de alimentos, *C. sporogenes* tem um papel importante como deteriorador de produtos cárneos. Seus endósporos apresentam elevada

resistência ao calor, tanto que são utilizados para validações de tratamentos térmicos nos alimentos, ao invés de *C. botulinum*.

O controle de *C. botulinum* pela indústria é factível. Entretanto, o consumidor, cada vez mais consciente, busca alimentos com menos aditivos, especialmente sais de nitrito. Dessa forma, buscam-se substâncias alternativas a ele que possuam atividade antimicrobiana e que mantenham os produtos cárneos com suas características próprias. Nesse contexto, destacam-se os óleos essenciais de plantas condimentares e especiarias, substâncias naturais com atividades antimicrobianas e antioxidantes conhecidas.

Os óleos essenciais são alternativas seguras e eficazes aos conservantes atualmente utilizados, podendo garantir a inocuidade dos alimentos e prolongar sua vida útil. Estudos mostram que o nitrito pode ser parcialmente substituído pelos óleos essenciais em embutidos cárneos cozidos emulsionados como a mortadela, pois, apresentaram atividades antimicrobiana sobre *Clostridium perfringens*, *C. botulinum* tipo D, *C. difficile* e *C. sporogenes*. Entretanto, as concentrações efetivas à serem utilizadas foram elevadas, descaracterizando o sabor dos produtos.

Uma vez que *C. botulinum* é considerado de elevado risco biológico, principalmente *C. botulinum* tipo A, estudos com cepas tipo A, B ou E, inoculados em embutidos cárneos cozidos emulsionados são escassos. Dessa forma, *Clostridium sporogenes* tem sido uma alternativa. Entretanto, não se sabe se a premissa da similaridade de resistência aos óleos essenciais entre endósporos de *C. sporogenes* e *C. botulinum* Tipo A é verdadeira. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana de mistura de óleos essenciais sobre endósporos de *C. botulinum* tipo A e *C. sporogenes* inoculados em mortadela.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

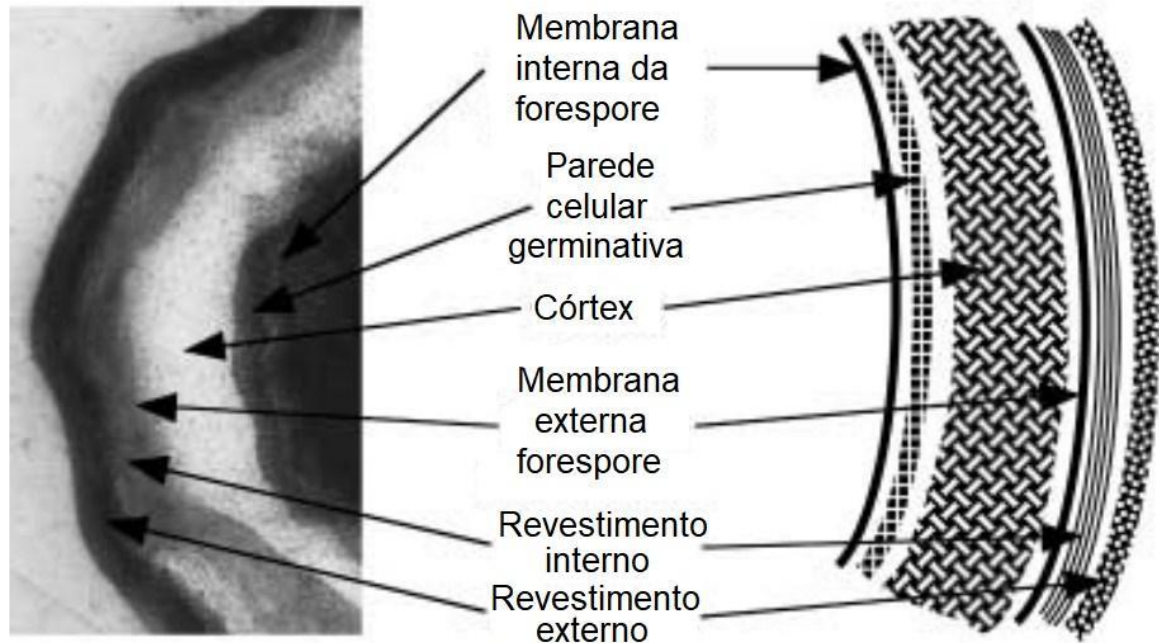
### 2.1 Gênero *Clostridium*

O gênero *Clostridium* pertence à família *Clostridiaceae*, que é composta por 11 gêneros de bactérias (WIEGEL, 2015). É um importante gênero composto por bactérias Gram-positivas, anaeróbias obrigatórias, em forma de bastonetes e formadoras de endósporos (CRUZ-MORALES *et al.*, 2019) que com o advento das análises genômicas e sequenciamento da região 16S rRNA, sua árvore filogenética tem sido constantemente mudada. Dessa forma, muitas espécies dentro desse gênero foram alocadas em novos gêneros, sendo o gênero *Clostridium* definido por relações genéticas mais estreitas (conhecido como *Clostridium strito sensu* ou grupo I) (COLLINS *et al.*, 1994; WIEGEL; TANNER; RAINEY, 2006).

Devido à sua exigência anaeróbia, espécies de *Clostridium* têm um ciclo de vida complexo e estritamente regulamentado, que leva à formação de um tipo de esporo altamente resistente (OLGUÍN-ARANEDA *et al.*, 2015).

O endósporo bacteriano é uma célula especial, na qual seu citoplasma encontra-se em estado de completa dormência. Sua viabilidade ao longo prazo é dependente da proteção de dois tipos de paredes, uma especializada e interna de peptidoglicano, o córtex e a parede de proteína externa dos esporos, esses revestimentos dos esporos são visualizados na Figura 1. O núcleo do esporo é mantido em estado relativamente desidratado, o que é essencial para a resistência ao calor, dormência a longo prazo e resistência (POPHAM, 2002).

Figura 1 – Micrografia eletrônica de seção fina e representação esquemática de camadas dos tegumentos dos endósporos bacterianos.



Legenda: No interior, lado côncavo de cada imagem está o citoplasma ou núcleo do desenvolvimento endósporo e no exterior, o lado convexo é o meio externo.

Fonte: Adaptado de Popham (2002).

### 2.1.1 *Clostridium botulinum*

*Clostridium botulinum* é uma bactéria anaeróbia obrigatória, Gram-positiva, formadora de endósporos resistentes ao calor (EDUARDO; SIKUZAWA, 2003). É patogênica, estando associada à doença denominada de botulismo.

Sete neurotoxinas sorologicamente distintas e altamente potentes são produzidas pelas cepas correspondentes de *C. botulinum* (A-G). As toxinas botulínicas interferem na liberação de acetilcolina em junções neuromusculares, gânglios autonômicos e terminações nervosas parassimpáticas, resultando em paralisia descendente e disfunção do sistema nervoso autônomo. Existem diferenças na epidemiologia e epizootologia da toxiose dos diferentes tipos de toxinas, e os tipos A, B e E causam a maioria dos casos de botulismo em seres humanos. Existem várias formas de botulismo, sendo conhecidas como botulismo alimentar, onde a toxina pré-formada no alimento é ingerida; o botulismo infantil, onde a toxina é produzida no intestino da criança e o botulismo por ferida (CHIN, 2000).

As estirpes de *C. botulinum* são divididas de acordo com suas características, nos grupos I, II, III e IV. Conforme descrito por Evans (1998), as estirpes que pertencem aos grupos I e II possuem diferentes tipos de riscos no processamento de alimentos. Nas cepas do grupo I, observa-se esporos altamente resistentes ao calor, estas cepas são frequentemente relacionadas a processos térmicos não adequados em produtos como conservas de legumes e carnes curadas. Cepas do grupo II, devido à sua capacidade de crescer em temperaturas de refrigeração, são um risco de segurança em alimentos modernos industrialmente processados. Estes alimentos são processados com tratamentos térmicos suaves que podem permitir a sobrevivência do grupo esporos II. A vedação hermética gera condições anaeróbicas e garante vida útil prolongada aos alimentos, porém, proporciona condições favoráveis para a germinação dos endósporos e crescimento de células vegetativas de *C. botulinum*.

### **2.1.2 *Clostridium sporogenes***

*Clostridium sporogenes* são bacilos Gram-positivos e anaeróbios que produzem esporos e possuem motilidade flagelar, além disso, apresentam similaridade genética com cepas proteolíticas de *C. botulinum*, porém, não produzem neurotoxinas evidenciadas nas estirpes de *C. botulinum*. Além dessa diferença, a substituição do *C. botulinum* por *C. sporogenes* apresenta algumas outras vantagens, como a fácil detecção por meio do odor ou da formação de gás; sua resistência térmica é pouco acima da de *C. botulinum*, o que o caracteriza como bom substituto para validação de processos térmicos e, além disso, há uma relativa facilidade para que culturas de esporos com alta resistência térmica sejam produzidas (BROWN; TRAN-DINH; CHAPMAN, 2012).

## **2.2 Controle de bactérias do gênero *Clostridium* em alimentos: sais de nitrato/nitrito**

Bactérias do gênero *Clostridium* estão envolvidas em grande parte da deterioração de alimentos embalados a vácuo, tanto *in natura* e/ou processados. O ambiente anaeróbio, com baixo potencial de oxidação e redução, elevada atividade de água e pH superior a 4,5 é ideal para a germinação dos endósporos dessa bactéria e sua multiplicação celular. Alimentos que apresentam essas características e que são processados termicamente, não esterilizados, se

destacam, uma vez que o tratamento térmico elimina a microbiota contaminante, sem, entretanto, desativar os endósporos. Esses, principalmente por falta de competição, após germinarem, se desenvolvem levando à deterioração do produto ou a problemas de toxinfecções alimentares causadas pelas espécies *C. botulinum* e *C. perfringens*. Devido à elevada necessidade nutricional dessas bactérias dentre os alimentos mais envolvidos em surtos destacam-se os produtos cárneos.

A forma mais comum de controle de bactérias do gênero *Clostridium* em produtos cárneos não esterilizados é pela adição de sais de nitrato e nitrito. O principal efeito conservante atribuído ao nitrito é a sua ação bacteriostática, prevenindo a germinação dos esporos e inibindo o crescimento das células vegetativas que sobrevivem ao processamento térmico (ANDRADE, 2013), e de maneira geral, as legislações de diversos países permitem a adição de sais de nitrato.

As doenças de origem alimentar representam um problema de saúde pública cada vez mais importante em todo o mundo. Com isso, consumidores e indústria buscam produtos cada vez mais seguros ao ponto de vista microbiológico e de maior qualidade, esperando assim, a diminuição desses índices. Porém, a maioria dos conservantes sintéticos utilizados (benzoatos, sorbatos, propionatos, nitritos e parabenos) apresentam efeitos potencialmente perigosos à saúde do consumidor, como efeitos mutagênicos, carcinogênicos e genotóxicos (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015). Com isso, uma forma de garantir a qualidade do produto, sem oferecer riscos à saúde humana se dá pela utilização de conservantes naturais, destacando-se os óleos essenciais.

### **2.3 Óleos essenciais**

Óleos essenciais (OE's) são misturas de complexos compostos naturais antimicrobianos e voláteis, obtidos de células especiais ou grupos de células de plantas aromáticas, como folhas e caule, comumente concentrados em uma região particular, como cascas, flores, raízes e até mesmo, frutas. Apresentam odor característico agradável e sabor distinguível, possuindo ampla aplicação em alimentos como condimentos, além de serem muito utilizados como aromatizantes na indústria de perfumes e cosméticos, podendo ser obtidos por meio de fermentações, extração por solventes, hidrodestilação ou destilação a vapor. Apesar de receberem essa denominação, não são estritamente óleos. Porém, apresentam baixa solubilidade

em água, característica dos óleos (BURT, 2004; CALO *et al.*, 2015; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008).

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas, com aplicações farmacêuticas e medicinais, por exemplo. Estes metabólitos secundários apresentam um papel fundamental na interação entre estas plantas e o meio ambiente, tanto na defesa quanto na atração, seja com outras plantas, patógenos e polinizadores. Sua produção é afetada por condições ambientais como temperatura, disponibilidade hídrica, nutrientes, altitude, entre outros (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Possuem, em sua maioria, atividade antimicrobiana, antifúngica e antioxidante, além de apresentarem propriedades anti-inflamatórias e anticarcinogênicas, por exemplo. Cerca de 60% destes óleos presentes em plantas medicinais, ervas e condimentos apresentam propriedades antifúngicas e 35%, apresentam propriedades antibacterianas. Por isso, apresentam grande potencial para serem utilizados como conservantes naturais, principalmente, em alimentos industrializados (GUERRA *et al.*, 2012; KALEMBA; KUNICKA, 2003). Já foram produzidos cerca de 3000 óleos essenciais, utilizando pelo menos 2000 espécies de plantas, das quais 300 apresentam grande importância do ponto de vista comercial (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

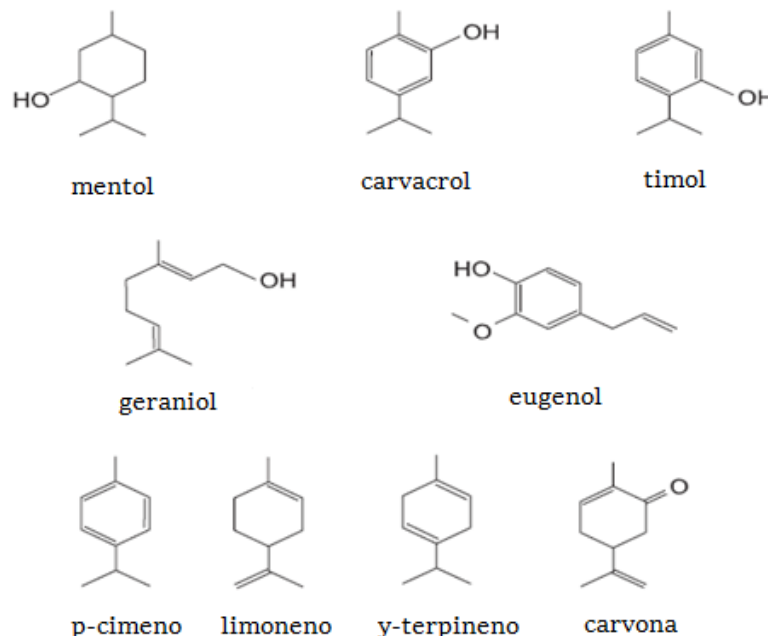
Os óleos essenciais são constituídos por diferentes componentes, sendo sua porcentagem variável de acordo com a espécie e a parte da planta na qual ele é obtido. Por exemplo, podem ser constituídos por 20 a 100 metabólitos secundários pertencentes à grande variedade de classes químicas. Terpenóides e fenilpropanóides representam os principais constituintes dos óleos essenciais. Além disso, alguns constituintes aromáticos e alifáticos também estão presentes. Monoterpenos, sesquiterpenos e derivados oxigenados desses dois representam o maior grupo de entidades químicas em OE's (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

Normalmente, a atividade antimicrobiana de um óleo essencial é atribuída pela presença de um ou dois compostos, sendo chamados de componentes majoritários, que se encontram em maiores concentrações (20-70%), enquanto os demais se encontram em menores concentrações (elementos traços). Por exemplo, o óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) apresenta como composto majoritário o eugenol (68,52%), enquanto o  $\alpha$ -cariofileno se apresenta em quantidades mínimas (1,85%) (YAP *et al.*, 2014).



Os compostos fenólicos são, em geral, os responsáveis pelas propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antialérgicas, anti-inflamatórias e cardioprotetoras, atuando como agentes redutores, doadores de hidrogênio, inibidores de oxigênio e quelantes de metais (MARIEM *et al.*, 2014). Porém, os compostos presentes em baixas concentrações podem desempenhar um papel crítico nessa atividade, possivelmente, pelo efeito sinérgico entre eles e os demais componentes (BURT, 2004). A Figura 2 apresenta a estrutura química de alguns componentes dos óleos essenciais com atividade antimicrobiana.

Figura 2 - Estrutura química de alguns componentes de óleos essenciais.



Fonte: Burt (2004) com modificações.

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

### 2.3.1. Atividades antimicrobianas e antioxidante dos óleos essenciais

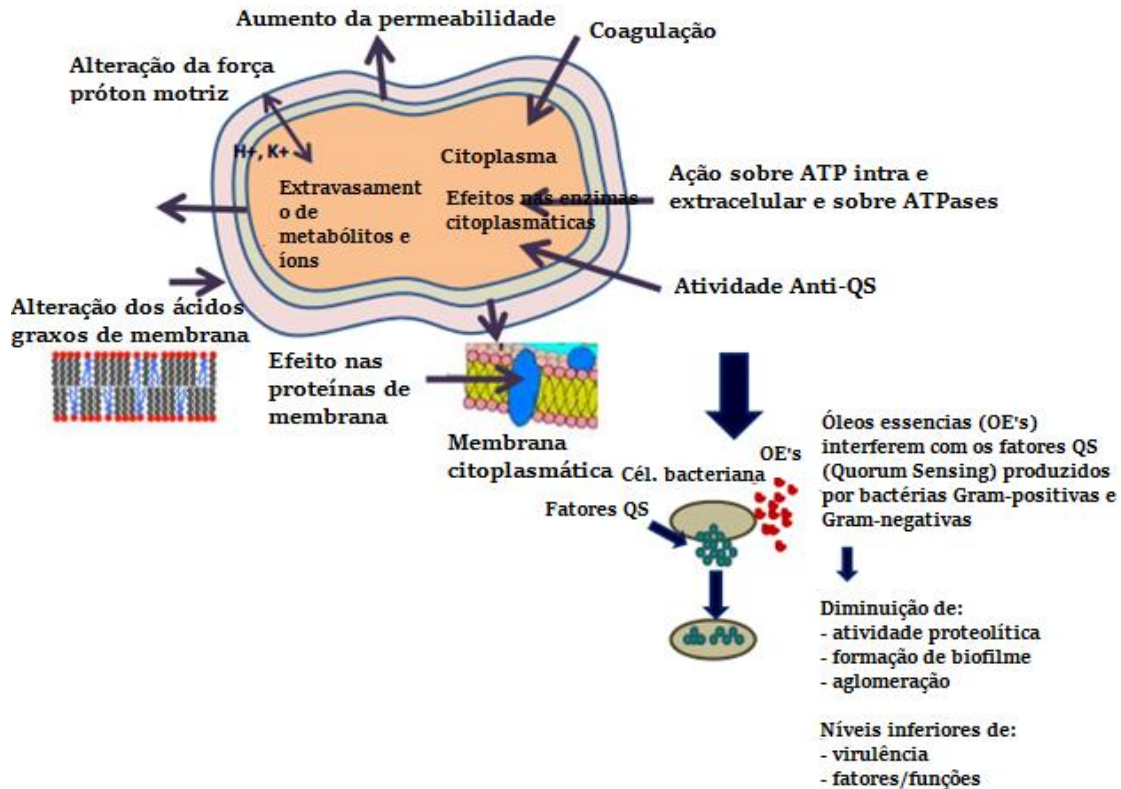
Diversos trabalhos têm avaliado a atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais contra patógenos, principalmente, de alimentos altamente perecíveis como frutas e carnes, onde a maioria dos patógenos são representados por bactérias que conseguem atuar em diversos substratos, crescem em diferentes valores de pH, temperatura e condições ambientais.

Oliveira *et al.* (2011) avaliaram o efeito do óleo essencial de segurelha (*Satureja montana* L.) sobre *C. perfringens* tipo A ATCC 3624, patógeno associado a surtos de toxinfecções alimentares por consumo de produtos cárneos contaminados, inoculado em mortadelas elaboradas com diferentes níveis de nitrito de sódio, alcançando atividade do óleo essencial sobre o microrganismo testado tanto nos ensaios *in vitro* quanto no produto cárneo (em concentrações superiores a 1,56%).

Os mecanismos de ação antibacteriana da maioria dos óleos essenciais ainda não estão totalmente elucidados e variam de óleo para óleo, uma vez que os diferentes tipos de constituintes químicos é que determinam as propriedades antimicrobianas. Diversos mecanismos de ação têm sido propostos (Figura 3).

Os óleos essenciais desestabilizam principalmente a arquitetura celular, levando à quebra da integridade da membrana e ao aumento da permeabilidade, o que leva à interrupção de muitas atividades celulares, incluindo a produção de energia (acoplada à membrana), o transporte pela membrana e outras funções metabólicas regulatórias. Podem afetar tanto o envelope externo da célula quanto o citoplasma. Devido à sua natureza lipofílica, eles são facilmente penetráveis através das membranas das células bacterianas. Ainda são capazes de causar aumento da permeabilidade da membrana celular bacteriana, levando ao extravasamento de componentes celulares e perda de íons. O efeito antibacteriano dos óleos essenciais também pode estar relacionado à redução dos potenciais de membrana, interrupção das bombas de prótons e consequente síntese de ATP. Essa alteração na organização celular pode causar um efeito cascata, afetando outras organelas celulares (SWAMY; AKHTAR; SINNIH, 2016).

Figura 3 - Mecanismo de ação e sítios alvos dos óleos essenciais em células microbianas.



Fonte: Nazzaro *et al.* (2013) com modificações.

Alguns estudos sugerem que os mecanismos de ação destes óleos variam de acordo com o tipo de bactéria. Bactérias Gram-positivas costumam ser mais sensíveis a esses agentes antimicrobianos do que bactérias Gram-negativas. Estas últimas são geralmente menos suscetíveis à ação destes óleos, uma vez que possuem em sua membrana externa lipopolissacarídeos hidrofílicos (LPS), que criam uma barreira contra macromoléculas e compostos hidrofóbicos, fornecendo às bactérias Gram-negativas, maior tolerância a compostos antimicrobianos hidrofóbicos como aqueles encontrados em óleos essenciais (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Além de atividade antimicrobiana, muitos óleos essenciais comumente utilizados também possuem ação antioxidante. Antioxidantes são compostos capazes de retardar ou diminuir a oxidação de um material oxidável, mesmo quando usados em concentrações muito baixas (<1%; normalmente entre 1-1000 mg/L) em comparação com a quantidade de material

que é protegido por eles (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013). A oxidação lipídica, que pode ocorrer em produtos que contenham óleos ou gorduras em sua composição e que reagem com o oxigênio atmosférico, formando peróxidos e hidroperóxidos, além de compostos carbonila que são produzidos como produtos de oxidação secundária, é uma das principais causas da formação de ranço nos alimentos (devido à formação de aldeídos, ácidos, cetonas e álcoois) que leva a alterações nas características sensoriais e nutricionais destes, causando uma deterioração no produto. Ela pode acontecer em uma série de etapas de produção do alimento, como armazenamento das matérias-primas, processamento, tratamento térmico e armazenamento dos produtos (EMBUSCADO, 2015; TOMAINO *et al.*, 2005).

A ação antioxidante dos óleos essenciais se deve, principalmente, pela presença de compostos fenólicos que atuam interferindo no processo de oxidação como terminadores de radicais livres e, às vezes, também como quelantes de metais. Além disso, apresentam muitos benefícios à saúde humana, como redução do risco de câncer, doenças cardíacas e diabetes; inibição da agregação plaquetária plasmática, ação na atividade da ciclo-oxigenase (COX) e liberação de histamina, e ainda, apresentam atividades antibacterianas, antivirais, anti-inflamatórias e antialérgicas. Outros compostos como flavonoides e terpenóides (como timol, carvacrol e eugenol) também apresentam essa atividade antioxidante (DEL RÉ; JORGE, 2012; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Martins (2016) avaliou a atividade antioxidante de diferentes combinações de óleos essenciais (orégano, pimenta-chinesa, pimenta preta, manjerição, noz moscada, limão Taiti, tomilho e cravo-da-índia) e nitrito de sódio (150 ppm e 75 ppm) em fiambres de peito de frango armazenados a 7°C e 14°C por 30 dias, não sendo o índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) afetado de forma significativa pelos tratamentos contendo os óleos essenciais e nitrito de sódio e nem pela temperatura de armazenamento, provavelmente, devido ao fato de que os óleos essenciais testados apresentam propriedades antioxidantes comprovadas, assim como o nitrito de sódio.

PINELLI *et al.* (2021) avaliaram atividade antioxidante de diferentes combinações de óleos essenciais (canela, limão Taiti, orégano, cardamomo e pimenta-chinesa) e de nanoemulsões, baseadas nestas combinações e nitrito de sódio (75 ppm) em mortadelas armazenadas por 30 dias, observando que tanto os óleos essenciais utilizados, quanto o nitrito de sódio apresentaram efeitos antioxidantes, sendo o tratamento controle (contendo apenas 75

ppm de nitrito de sódio) o que apresentou maior índice de TBARS, sendo o tratamento com menor atividade antioxidante.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

As análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de Microbiologia de Alimentos, já as análises físico-químicas e a elaboração do produto cárneo foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Carnes e Derivados.

#### 3.1 Óleos essenciais e análise química

Os óleos essenciais de alho (*Allium sativum*), basilicão (*Ocimum basilicum*), pimenta chinesa (*Litsea cubeba*), pimenta rosa (*Schinus molle*), segurelha (*Satureja montana*) e tomilho branco (*Thymus vulgaris*) foram adquiridos da empresa FERQUIMA®, LASZLO® e FLORA FIORA®.

As análises químicas dos óleos essenciais foram realizadas por Cromatografia de Fase Gasosa, empregando-se Cromatógrafo Agilent® 7890A, operado com sistema de processamento de dados HP GC ChemStation Ver. A.01.14, equipado com injetor/amostrador automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) e Detector de Ionização em Chama (DIC). Alíquotas dos óleos essenciais foram diluídas em acetato de etila (1%, v/v) e 1,0 µL foram injetados, no modo split, na razão de 50:1. Empregou-se a coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 250 µm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). O gás de arraste foi Hélio e o fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 240°C. Empregou-se uma rampa de temperatura de 3°C/min de 60°C a 200°C, seguido de outra de 10°C/min até 270°C, mantendo-se em condição isotérmica por 1 minuto. As concentrações dos constituintes foram expressas pela média da porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos ± o desvio padrão de 3 amostras analisadas.

As análises qualitativas foram realizadas em Cromatógrafo Agilent® 7890A, acoplado ao detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, em velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições operacionais foram as mesmas empregadas nas análises por CG-DIC. Os constituintes químicos foram identificados por comparação de seus índices de retenção relativos à coinjeção de solução

padrão de n-alcenos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007).

### 3.2 Microrganismos, padronização e obtenção dos inóculos

*Clostridium sporogenes* ATCC 11437 (*American Type Culture Collection*) e *Clostridium botulinum* INCQS 00054, cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) foram utilizadas nesse trabalho.

As cepas foram ativadas em caldo *Reinforced Clostridial Base* (RCB) (1 g de protease peptona; 1 g de extrato de carne; 0,15 g de extrato de levedura; 0,1 g de amido; 0,5 g de acetato de sódio; 0,1 g de glicose; 0,05 g de cloridrato de L-cisteína e 100 mL de água destilada) a 37°C/24 horas, em anaerobiose, utilizando 1,5 mL de óleo mineral por tubo. Posteriormente, transferiu-se alíquotas de 0,1 mL para tubos contendo o mesmo meio de cultura que foram incubados da mesma forma por mais 24 horas.

Os endósporos foram obtidos por transferência de alíquotas de 0,1 mL das culturas para placas de Petri, contendo ágar AK nº 2 (Himedia®) e incubadas a 37°C/120 horas em anaerobiose, gerada por gerador de anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil®).

A obtenção de endósporos foi verificada após a lavagem da superfície do ágar com 10 mL de solução salina (0,9%, m/v), e a observação ao microscópico óptico dos endósporos corados pela técnica de *Wirtz-ConKlin*, utilizando solução corante de Verde Malaquita 5% (m/v) e contra corante safranina 0,5% (m/v). Após verificação da presença de endósporos, submeteu-se a suspensão ao choque térmico (70°C/15 min.) e rápido resfriamento em banho de gelo, visando eliminar todas as células vegetativas ainda presentes. Alíquotas de 1 mL da suspensão de endósporos foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 2380 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL do meio de congelamento com dupla concentração de glicerol (30 mL de glicerol; 0,5 g de peptona bacteriológica; 0,3 g de

extrato de levedura; 0,5 g de NaCl e 100 mL de água destilada). O inóculo foi mantido a -18°C até a utilização.

Os inóculos foram padronizados, realizando diluições seriadas em água peptonada 0,1% (m/v) e plaqueamento em profundidade em ágar RCB. As placas foram incubadas em anaerobiose a 37°C/48 horas, com posterior contagem do número de colônias nas placas e a padronização da suspensão em  $3,05 \times 10^6$  UFC/mL para a cepa de *Clostridium botulinum* INCQS 00054 e de  $2,05 \times 10^6$  UFC/mL para a cepa de *Clostridium sporogenes* ATCC 11437.

### **3.3 Concentração Mínima Inibitória e a Concentração Mínima Esporicida dos óleos essenciais**

As Concentrações Mínima Inibitória (CMI) e Mínima Esporicida (CME) foram determinadas empregando-se a técnica de macro diluição (CLSI, 2019) com modificações. Caldo RCM acrescido de 0,5% (v/v) de *Tween* 80 como agente tensoativo foi utilizado para a diluição dos óleos essenciais nas concentrações de 3; 1,5; 0,75; 0,375; 0,1875 e 0,09375 (%).

Alíquotas das suspensões de endósporos padronizadas de 16,4 uL para *C. botulinum* e de 24,4 uL para *C. sporogenes* foram transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo RCB, contendo as diferentes concentrações de óleos essenciais e incubados a 37°C/48 horas, em condições anaeróbicas, gerada pela adição de óleo mineral esterilizado. A CMI foi considerada aquela onde não se observou a turvação do meio de cultura após 48h de incubação.

Para determinação da CME, alíquotas de 0,1 mL das culturas dos tubos onde não foi observado crescimento foram transferidas para novos tubos, contendo 5 mL de caldo RCB, que foram incubados a 37°C/48 horas, em condições anaeróbicas. A CME foi considerada aquela onde não houve turvação do meio de cultura.

### **3.4 Combinações entre os óleos essenciais**

Os óleos selecionados para a continuação do trabalho foram de alho, basilicão, pimenta rosa e segurelha. Esses foram selecionadas baseando-se em suas CMI e no possível impacto sobre o sabor e aroma da mortadela.



Os diferentes ensaios foram gerados utilizando delineamento DCCR, no programa *Chemoface versão 1.5*, utilizando “*Experimental design*”, com variáveis +2 e -2 calculadas de acordo com a CMI de cada óleo sobre *C. botulinum*.

Na Tabela 1, encontram-se as variáveis codificadas e reais utilizadas e, na Tabela 2, encontram-se as proporções dos 27 ensaios gerados.

Tabela 1 – Variáveis reais e codificadas utilizadas nos DCCR.

Variável codificada	-2	-1	0	+1	+2
Variável real (%)	0,010	0,019	0,028	0,037	0,046

Fonte: Do autor (2021).

Tabela 2 – Proporções em percentagem utilizadas nos ensaios da combinação dos óleos essenciais de pimenta rosa, alho, basilicão e segurelha. (continua)

Ensaio	Óleo A (%)	Óleo B (%)	Óleo C (%)	Óleo D (%)	Total (%)
1	0,019	0,019	0,019	0,019	0,076
2	0,019	0,019	0,019	0,037	0,095
3	0,019	0,019	0,037	0,019	0,095
4	0,019	0,019	0,037	0,037	0,113
5	0,019	0,037	0,019	0,019	0,095
6	0,019	0,037	0,019	0,037	0,113
7	0,019	0,037	0,037	0,019	0,113
8	0,019	0,037	0,037	0,037	0,132
9	0,037	0,019	0,019	0,019	0,095
10	0,037	0,019	0,019	0,037	0,113
11	0,037	0,019	0,037	0,019	0,113
12	0,037	0,019	0,037	0,037	0,132
13	0,037	0,037	0,019	0,019	0,113
14	0,037	0,037	0,019	0,037	0,132
15	0,037	0,037	0,037	0,019	0,132
16	0,037	0,037	0,037	0,037	0,150
17	0,010	0,028	0,028	0,028	0,095
18	0,046	0,028	0,028	0,028	0,132

Tabela 2 – Proporções em percentagem utilizadas nos ensaios da combinação dos óleos essenciais de pimenta rosa, alho, basilicão e segurelha. (conclusão)

<b>19</b>	0,028	0,010	0,028	0,028	0,095
<b>20</b>	0,028	0,046	0,028	0,028	0,132
<b>21</b>	0,028	0,028	0,010	0,028	0,095
<b>22</b>	0,028	0,028	0,046	0,028	0,132
<b>23</b>	0,028	0,028	0,028	0,010	0,095
<b>24</b>	0,028	0,028	0,028	0,046	0,132
<b>25</b>	0,028	0,028	0,028	0,028	0,113
<b>26</b>	0,028	0,028	0,028	0,028	0,113
<b>27</b>	0,028	0,028	0,028	0,028	0,113

Fonte: Do autor (2021).

As vinte e sete combinações do experimento foram avaliadas quanto à sua ação inibitória e esporicida sobre os endósporos de ambas as bactérias estudadas. Alíquotas de 16,4 uL para *C. botulinum* e de 24,4 uL para *C. sporogenes* do inóculo padronizado foram transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo RCB e 0,5% (v/v) de Tween 80, contendo as diferentes concentrações de óleos essenciais (Tabela 1) e incubados a 37°C/48 horas, em condições anaeróbicas, gerada pela adição de óleo mineral esterilizado. Após 24 e 48h de incubação, a turbidez das diferentes culturas foram visualmente analisadas e alíquotas de 0,1 mL de cada cultura, onde não foi observado aumento da turbidez, foram transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo RCB e incubadas a 37°C/48h, para a verificação de ação inibitória e/ou esporicida das misturas.

### 3.5 Fabricação da mortadela e inoculação

As mortadelas foram fabricadas sem adição de sais de nitrito, de acordo com a formulação descrita na Tabela 3. Foi realizado um tratamento, baseando-se no ensaio 1 da Tabela 2, contendo os óleos essenciais de alho, basilicão, pimenta rosa e segurelha, todos em concentração igual a 0,019% (v/m) e o controle, sem adição de óleos essenciais. O ensaio 1 foi selecionado, uma vez que continha a menor concentração total de óleos essenciais e apresentou ação inibitória sobre ambos os microrganismos.

Tabela 3 – Formulação utilizada para a elaboração das mortadelas.

Ingredientes	Quantidade (%)	Quantidade (%)
	Controle	Tratamento
Carne bovina	42,2	42,2
Carne Suína	16,35	16,35
Toucinho	14,0	14,0
Sal	1,9	1,9
Tripolifosfato de Sódio	0,5	0,5
Ácido Ascórbico	0,05	0,05
Gelo	16	16
Fécula de mandioca	5	5
Água	4	3,9
<i>Tween 80</i>	-	0,02
Óleo essencial de alho	-	0,02
Óleo essencial de basilicão	-	0,02
Óleo essencial de pimenta rosa	-	0,02
Óleo essencial de segurelha	-	0,02

Fonte: Do autor (2021).

As carnes bovinas e suínas foram trituradas em processador, em alta velocidade, sendo em seguida, adicionado o toucinho e o gelo. Após completa homogeneização, foram adicionados nesta ordem: tripolifosfato, sal e ácido ascórbico. A seguir, a velocidade do processador foi reduzida, sendo acrescentada 4 mL/100 g de massa de emulsão de óleos essenciais (0,019% de alho, 0,019% de basilicão, 0,019% de pimenta rosa e 0,019% de segurelha), elaborada em água destilada, contendo 0,5% (v/v) de *Tween 80* e, por último, a fécula de mandioca. A massa obtida foi separada em sacos de *Nylon Poly* gofrado de 10x15 centímetros, de forma a se obter mortadelas com 25 g.

Cada mortadela foi inoculada com  $10^4$  UFC/g endósporos de *C. botulinum* e, ou *C. sporogenes*, homogeneizada e os sacos selados a vácuo. Após inoculação, as mortadelas foram submetidas à cocção por imersão em banho-maria, de acordo com a seguinte programação: 50°C à temperatura inicial do banho, sendo reajustada para 80°C, assim que adicionadas as mortadelas, mantendo a cocção até a temperatura interna atingir 72 – 72,5°C (medida com termopar). Todo o processo de cozimento foi monitorado com uso de termômetro, com

mensuração da temperatura do banho-maria. Após o cozimento, as mortadelas foram imersas em banho de gelo por 15 min e armazenadas à 15°C por 15 dias, devido à temperatura mínima de crescimento dos microrganismos testados. As mortadelas destinadas às análises físico-químicas não foram inoculadas com endósporos. As análises foram realizadas em triplicata e três repetições.

### **3.6 Quantificação de endósporos e células vegetativas de *Clostridium botulinum* e *C. sporogenes* na mortadela**

As embalagens, contendo 25 g de mortadela, foram abertas de forma asséptica, adicionadas de 225 mL de água peptonada 0,1% (m/v) e homogeneizadas em Stomacher Metroterm® (490 golpes/min) por 3 min.

As células vegetativas foram quantificadas pelo plaqueamento de alíquotas de 1 mL das diluições adequadas em ágar RCB.

Os endósporos foram quantificados após a aplicação do choque térmico ao homogenato, (75°C por 15 min. seguido de banho de gelo) para inativação das células viáveis. Alíquotas de 1 mL das diluições adequadas foram plaqueadas em ágar RCB.

As condições de incubação foram iguais para ambas as análises: 37°C/48h em anaerobiose, gerada com auxílio de gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac do Brasil®). As análises foram realizadas em triplicata.

#### **3.6.1 Determinação do pH**

O pH foi mensurado, utilizando o pHmetro portátil HI 99163 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EUA) com eletrodo de penetração inserido em três pontos da amostra.

#### **3.6.2 Cor objetiva**

A avaliação instrumental da cor foi conduzida através do uso de um colorímetro espectrofotômetro CM-700d (Konica Minolta Inc, Tokyo, Japão), com porta de abertura de 8 mm, considerando-se o valor médio de cinco leituras realizadas em diferentes pontos nas superfícies das amostras. Os índices de cor, luminosidade ( $L^*$ ), índice de vermelho ( $a^*$ ) e índice

de amarelo ( $b^*$ ) foram obtidos no sistema CIELAB, com o iluminante D65, ângulo do observador a  $10^\circ$  e luz especular excluída (SCE). A partir dos índices de cor, também foram calculados a saturação ( $C^*$ ), o ângulo de tonalidade ( $h^*$ ) e a diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ), onde a amostra padrão entre o mesmo tratamento foi o tempo de 0 dia e, entre os tratamentos, foi o tratamento controle. (RAMOS; GOMIDE, 2017):  $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ ;  $h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*)$ ; e  $\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$ .

### 3.6.3 Oxidação lipídica (índice de TBARS)

A oxidação lipídica foi determinada pelo índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo a metodologia proposta por Pikul, Leszczynski e Kummerow (1989), com modificações. Cerca de 5 g de amostra foram homogeneizadas em 15 mL de ácido perclórico 3,86% e 1 mL do antioxidante hidroxibutiltolueno (BHT) 0,15% (p/v). A mistura foi homogeneizada (Turratec TE 102; TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil), seguido pelo processo de filtração. Uma alíquota de 5 mL foi, então, adicionada de 5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,02 M, incubada em banho-maria fervente por 30 minutos. Depois de resfriada à temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 532 nm. A concentração de malonaldeído (MAD) foi determinada, a partir de curva analítica com 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) e os resultados expressos em miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra (mg de MDA/kg).

### 3.6.4 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos na enumeração das células totais e dos endósporos foram submetidos à análise de homogeneidade (Teste Bartlett) e distribuição normal (Shapiro–Wilk normality test). Para os dados paramétricos foi utilizado o teste de Scott-Knott para a comparação entre as médias dos tratamentos e, para os não paramétricos, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis.

Foi realizado, também, uma comparação entre os dois microrganismos testados, sendo utilizado para os dados paramétricos, o teste F e, para os não paramétricos, o teste Wilcoxon.

As médias dos dados obtidos nas análises de pH, cor objetiva e oxidação lipídica foram submetidos à análise de homogeneidade (Teste Bartlett) e distribuição normal (Shapiro–Wilk

normality test). Para os dados paramétricos, foi utilizado o teste de Scott-Knott para a comparação entre as médias dos tratamentos e, para os não paramétricos, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. Sendo realizado a comparação entre os tratamentos, no mesmo dia e entre os dias de um mesmo tratamento.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre *C. sporogenes* e *C. botulinum*, e componentes majoritários dos óleos essenciais

As concentrações mínimas inibitórias (CMI) e mínimas esporicidas (CME) dos óleos essenciais sobre endósporos de *C. botulinum* e *C. sporogenes* são mostradas na Tabela 4

Tabela 4 – Concentrações mínimas inibitórias (CMI) e mínima esporicida (CME) de diferentes óleos essenciais sobre endósporos de *Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes*.

Óleo Essencial	<i>C. botulinum</i>		<i>C. sporogenes</i>	
	CMI (%)	CME (%)	CMI (%)	CME (%)
<b>Alho</b>	0,094	1,5	0,094	3
<b>Basilicão</b>	0,094	>3	0,188	>3
<b>Pimenta Chinesa</b>	0,094	>3	0,094	>3
<b>Pimenta Rosa</b>	0,094	>3	0,188	>3
<b>Segurelha</b>	0,094	>3	0,094	>3
<b>Tomilho Branco</b>	0,094	>3	0,188	>3

Fonte: Do autor (2021).

Os seis óleos inibiram o crescimento de ambas as bactérias durante as 48h de incubação, sendo a CMI, iguais a 0,094% de todos os óleos para *C. botulinum*. Já para *C. sporogenes*, houve variações entre as CMI, onde os óleos de basilicão, pimenta rosa e tomilho apresentaram menor atividade esporostática, com CMI de 0,188%, valor duas vezes maior que as CMI dos óleos de alho, pimenta chinesa e segurelha. A CME foi obtida apenas para o óleo de alho, sendo sua atividade antimicrobiana, duas vezes maior sobre esporos de *C. botulinum* (CME de 1,5%) do que sobre *C. sporogenes* (CME de 3%). Os outros óleos estudados não apresentaram CME na faixa de concentração estudada. Como não houve ação esporicida efetiva dos óleos estudados, optou-se por desenvolver esse trabalho baseando-se na ação inibitória.

Vários estudos mostram a ação dos óleos essenciais sobre as mais diversas bactérias, sendo bem definida, a relação entre a atividade antimicrobiana do óleo essencial e seus componentes, principalmente, dos majoritários.

A Tabela 5 mostra os componentes majoritários dos óleos essenciais utilizados nesse estudo.

Tabela 5 – Nomes populares, componentes majoritários e sua porcentagem nos óleos essenciais.

<b>Óleo Essencial</b>	<b>Componente majoritário</b>	<b>Área (%)</b>
<b>Alho</b>	Trissulfeto de dialila	27,33
	Dialil dissulfeto	24,67
	Trissulfeto de metil-alilo	19,11
<b>Basilicão</b>	Metil Chavicol	86,74
<b>Pimenta Chinesa</b>	Geranial	40,9
	Neral	31,34
<b>Pimenta Rosa</b>	$\alpha$ -Pino	19,56
	Limoneno	16,15
<b>Segurelha</b>	Timol	28,99
	$\rho$ -Cimeno	12
<b>Tomilho Branco</b>	Timol	43,84
	$\rho$ -Cimeno	29,41

Fonte: Do autor (2021).

Observa-se que os óleos possuem diferentes componentes majoritários e em diferentes proporções, exceto os óleos de segurelha e tomilho, que continham os mesmos componentes majoritários, entretanto, em proporções diferentes.

A elevada atividade antimicrobiana, tanto sobre bactérias quanto fungos filamentosos e leveduras, do óleo essencial de alho está associada à presença de concentrações semelhantes de dialil dissulfeto e trissulfeto de dialila (AVATO *et al.*, 2000), componentes presentes e em concentrações semelhantes no óleo utilizado nesse trabalho. Os componentes majoritários dos demais óleos como o metil chavicol, um fenilpropanóide, no óleo de basilicão, neral e geraniol, terpenóides, presentes no óleo de pimenta chinesa,  $\alpha$ - pino e limoneno, na pimenta rosa e o timol e  $\rho$ -cimeno componente majoritários da segurelha e tomilho já têm sua ação antimicrobiana bem conhecida sobre células vegetativas. Entretanto, poucos trabalhos foram



realizados com endósporos de *Clostridium botulinum* (ISMAIEL; PIERSON, 1990a, 1990b, 1990c), mostrando que, provavelmente, os óleos atuam inibindo a germinação dos endósporos, sem, no entanto, danificá-los, permitindo que esses, em ausência e/ou presença em menores concentrações de óleos, os esporos germinem e as células vegetativas se multipliquem.

Comparando a ação inibitória entre os óleos sobre as duas espécies, *C. sporogenes* apresentou-se mais resistente, pois as CMI de alguns deles foram duas vezes maiores do que aquelas obtidas para *C. botulinum*. O mesmo ocorreu para a CME, onde apenas o óleo essencial de alho foi efetivo contra ambas as espécies. Baseando-se nesses resultados, optou-se por utilizar as CMI dos óleos para a continuidade dos estudos.

Dos seis óleos essenciais testados, foram selecionados quatro para a realização do estudo da atividade sinérgica/aditiva entre eles. Nessa seleção, além de se considerar a CMI de cada óleo, também foi levado em conta, o possível impacto sobre o sabor do produto. Dessa forma, foram selecionados os óleos essenciais de alho, basilicão, pimenta rosa e segurelha. Um dos motivos que levou a não utilizar o óleo essencial de tomilho foi o sabor residual nada agradável que ele promove na mortadela, mesmo em baixas concentrações, levando a rejeição do produto (comunicação pessoal).

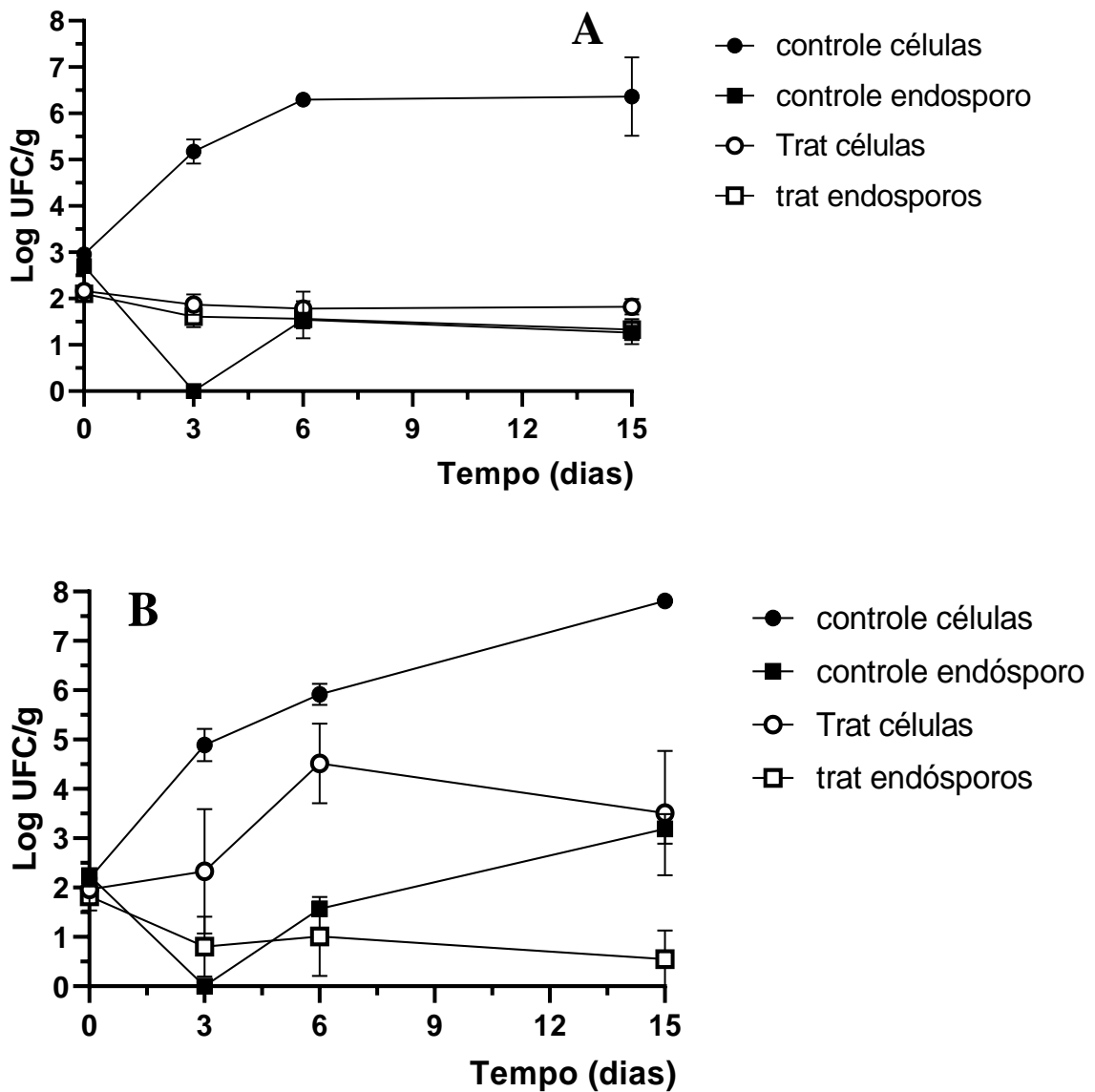
O DCCR montado, empregando-se quatro óleos, gerou 27 ensaios com diferentes combinações de concentrações dos quatro óleos, e em todas as combinações testadas, para ambas as espécies, houve ação inibitória, não sendo observado crescimento em tubo durante os cinco dias de incubação a 37°C. Contudo, não se observou ação esporicida em todos os ensaios.

Pensando no impacto dos óleos essenciais sobre o sabor e odor da mortadela, a combinação selecionada para a o teste no produto foi a do ensaio 1, contendo 0,019 % de cada um dos quatro óleos, totalizando 0,0769% de óleo essencial no produto final, a mortadela.

#### **4.2 Germinação e crescimento de *Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes* inoculados em mortadela adicionada de mistura de óleos essenciais**

Na Figura 4, encontra-se o efeito dos óleos essenciais sobre *C. botulinum* e *C. sporogenes* inoculados na mortadela

Figura 4 – Eficácia da combinação dos óleos essenciais de alho, pimenta rosa, basilicão e segurelha (0,019%) sobre endósporos de (A) *Clostridium botulinum* e (B) *Clostridium sporogenes* inoculados em mortadela armazenada a 15°C por 15 dias.



Fonte: Do autor (2021).

Nota-se, que o cozimento das mortadelas induziu a germinação de parte dos endósporos inoculados de ambas as espécies, uma vez que, logo após ao cozimento, foram quantificadas células vegetativas e endósporos.

Na Figura 4A, encontram-se os resultados da ação dos óleos sobre *C. botulinum*. Observa-se que, embora tenham sido inoculados cerca de  $10^4$  esporos/g no produto, imediatamente após o cozimento, cerca de 50% do número de endósporos se encontrava na forma vegetativa. Esse fato ocorreu em ambos os tratamentos, mortadelas controle (sem adição de óleos essenciais) e com óleos. Contudo, nas amostras contendo os óleos, foram observada uma redução significativa do número de células viáveis e endósporos (tempo 0) após o cozimento, quando comparada às mortadelas controle.

Nas mortadelas controle, houve aumento exponencial do número de células viáveis até o 6º dia de armazenamento (6,3 Log UFC/g), sendo encontrado, praticamente, o mesmo valor de células (6,36 Log UFC/g) no décimo quinto dia de armazenamento.

Sabe-se que os endósporos germinam em condições ambientais favoráveis ao crescimento bacteriano, sendo esse comportamento, observado nesse estudo. Pois, no 3º dia de armazenamento não foram detectados endósporos na mortadela. Observando o número de células viáveis quantificado nesse mesmo tempo, pode-se dizer que todos os endósporos germinaram, uma vez que aquele foi de 5,18 Log UFC/g, valor semelhante à soma de células viáveis e endósporos obtidos logo após o cozimento (5,67 Log UFC/g), tempo 0.

O número de células viáveis de *C. botulinum* nas mortadelas adicionadas de óleos essenciais foi, significativamente, menor do que nas mortadelas controle durante todo o período de armazenamento, ocorrendo pequena diminuição de seu número até o 15º de armazenamento. Pode-se dizer que os óleos essenciais influenciaram negativamente sobre a germinação dos esporos de *C. botulinum*, pois, em todo o período de análise foram encontrados, tanto endósporos, quanto células vegetativas nas mortadelas em baixas concentrações. A inibição da germinação de endósporos de *C. botulinum* pelos óleos essenciais de tomilho, pimenta preta, e alho, em meio de cultura, também foi observada por Ismaiel e Pierson (1990b). Entretanto, em outro trabalho realizado pelos mesmos autores, foi observado que a adição de óleo essencial de orégano na concentração de até 0,4% em carne de porco moída não apresentou ação inibitória sobre os endósporos (ISMAIEL; PIERSON, 1990a). Nesse ponto, destacam-se os resultados deste trabalho, pois, quando em sinergismo foi conseguida a redução, tanto de endósporos,

quanto de células vegetativas de *C. botulinum* em mortadela, ressaltando que não foram utilizados sais de nitrato/nitrito, apenas os óleos essenciais.

Analisando o número total de *C. botulinum* (células viáveis + endósporos) presentes nas mortadelas, observa-se que ele sempre foi menor nas mortadelas com óleos essenciais do que nas controle. O número total de *C. botulinum* nas mortadelas com óleos foi de 4,26 Log UFC/g logo após o cozimento para 3,48; 3,34 e 3,15 Log UFC/g, e sem óleos de 5,67; 5,18; 7,84 e 7,62 Log UFC/g no 3°, 6° e 15° dia de armazenamento, respectivamente. Calculando-se a proporção entre células vegetativas e endósporos em presença de óleos, observou-se os valores de 1:0,97; 1:0,86; 1:0,87 e 1:0,73, respectivamente, para os tempos de 0, 3, 6 e 15 dias de armazenamento.

Em contrapartida, nas mortadelas controle, houve muito mais células vegetativas do que endósporos, com as proporções de 1:0,92; 1:0; 1:0,24 e 1:0,2 para os tempos de 0, 3, 6 e 15 dias, respectivamente. Esse fato mostra que os óleos essenciais apresentam ação sobre a germinação dos endósporos. Assim, pode-se dizer que, embora as concentrações de óleos essenciais não tenham eliminado as células vegetativas e os endósporos de *C. botulinum*, eles inibiram sua multiplicação e/ou germinação.

*Clostridium sporogenes* (Figura 4B) apresentou comportamento inicial semelhante ao de *C. botulinum*. Entretanto, mesmo em presença de óleos essenciais, o número de células vegetativas aumentou, de forma significativamente maior do que aquela observada para *C. botulinum*. As proporções entre células vegetativas e endósporos foram, respectivamente, de 1:1,03 (tempo 0); 1:0 (tempo 3); 1:0,27 (tempo 6) e 1:0,41 (tempo 15) nas mortadelas controle. Já em presença de óleos, foram de 1:0,93; 1:0,34; 1:0,22 e 1:0,16 para os tempos 0, 3, 6 e 15 dias de armazenamento, respectivamente.

Avaliando-se o comportamento dos dois microrganismos em relação aos óleos essenciais em mortadela, de modo geral, pode-se dizer que, embora *C. sporogenes* seja filogeneticamente semelhante a *C. botulinum*, sendo até dito, que é um “*C. botulinum* sem toxina”, ele se apresentou mais resistente à emulsão dos óleos essenciais do que *C. botulinum*, bem como *in vitro*, demonstrado nas CMI dos óleos separados.

#### **4.3 pH, cor objetiva e oxidação lipídica**

A média do pH das mortadelas, com ou sem óleos, não apresentaram variação significativa, bem como entre os tempos de zero a quinze dias de armazenamento, tendo como valor médio de 6,15.

A diferença da oxidação lipídica entre o tratamento e o controle pode ser observada na Tabela 6, sendo o tratamento com os óleos essenciais, eficiente na redução da oxidação lipídica quando comparada ao controle. O tempo de armazenamento promoveu um aumento da oxidação em ambos os tratamentos. Esse aumento pôde ser diferenciado a partir do terceiro dia de armazenamento. A diferença de oxidação está, diretamente, associada às propriedades antioxidante dos óleos essenciais utilizados nas amostras do tratamento.

Tabela 6 – Médias do índice de TBARS (mg de MAD/ kg).

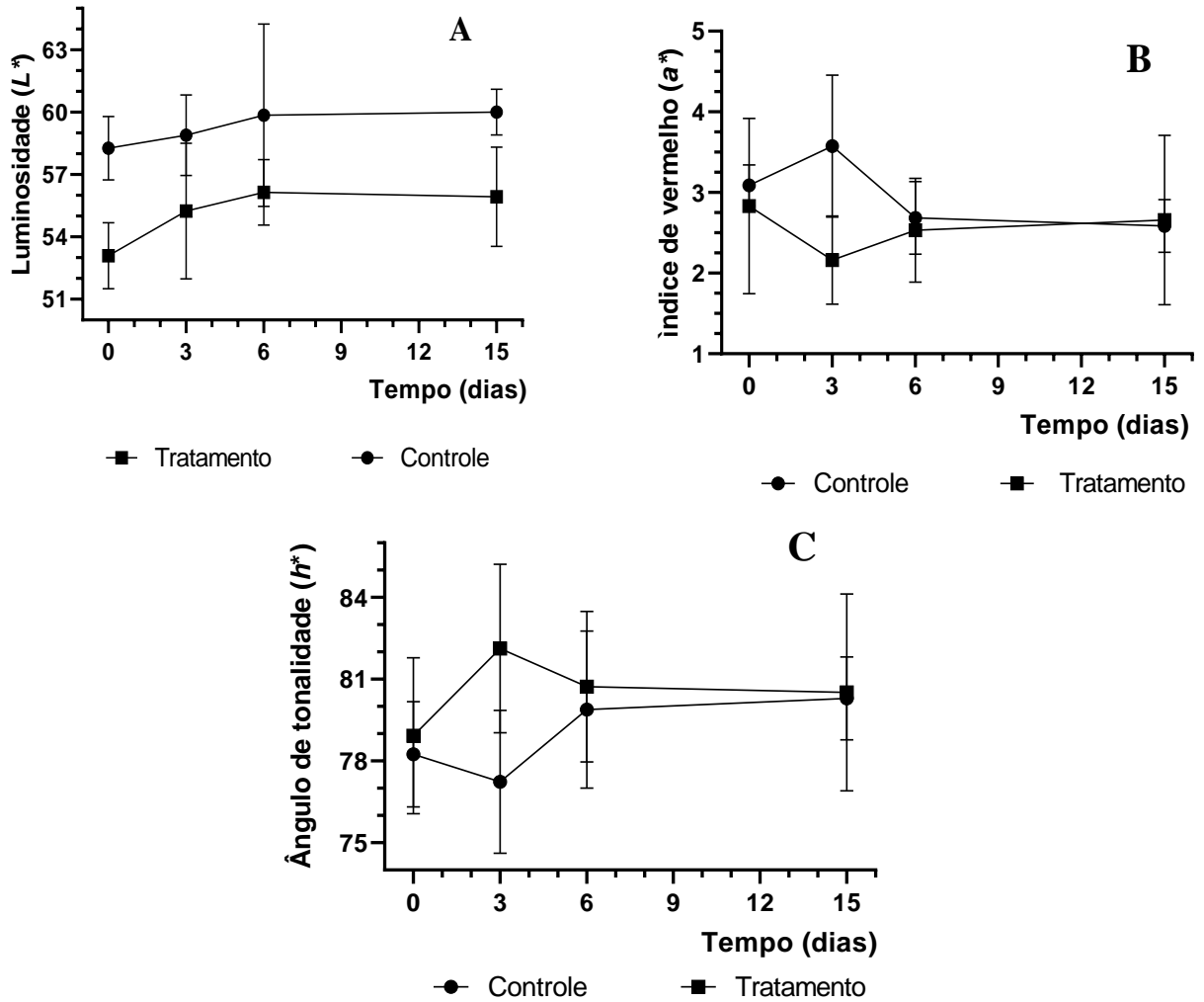
Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)			
	0	3	6	15
<b>Controle</b>	0,487 ± 0,027 aA	0,521 ± 0,128 aA	1,143 ± 0,346 bA	0,910 ± 0,254 bA
<b>Tratamento</b>	0,346 ± 0,341 aB	0,377 ± 0,495 aB	0,715 ± 0,165 bB	0,575 ± 0,056 cB

Legenda: Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas na mesma coluna e letras minúsculas na mesma linha não diferem entre si após os respectivos testes estatísticos ( $p > 0,05$ ).

Fonte: Do autor (2021).

As médias do índice de cor, luminosidade ( $L^*$ ), índice de vermelho ( $a^*$ ) e ângulo de tonalidade ( $h^*$ ), são apresentadas na Figura 5. As médias do índice de amarelo ( $b^*$ ) e da saturação ( $C^*$ ) não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as amostras controle e as do tratamento, bem como entre os tempos testados. Sendo a média do índice de amarelo de  $15,37 \pm 0,54$  e da saturação de  $15,63 \pm 0,52$ .

Figura 5 – Média dos índices de cor (A) luminosidade  $L^*$ , (B) índice de vermelho  $a^*$ , e (C) ângulo de tonalidade  $h^*$ .



Fonte: Do autor (2021).

O efeito da adição dos óleos essenciais nas mortadelas sobre a luminosidade ( $L^*$ ), durante o tempo de armazenamento a  $15^\circ\text{C}$ , pode ser observado na Figura 5A. A luminosidade ( $L^*$ ) caracteriza o grau de claridade da cor, variando do preto ao branco, indo de 0 (escuro) a 100 (claro) (RAMOS; GOMIDE, 2017). Houve uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o controle e o tratamento em quase todos os dias, com exceção do sexto dia de armazenamento, onde as médias foram iguais. Porém, o tempo de armazenamento não influenciou significativamente nesse parâmetro ( $p > 0,05$ ), tanto para o controle, quanto para o tratamento.

Os valores do parâmetro  $a^*$  representam 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. Já o ângulo de tonalidade ( $h^*$ ) é representado como a grandeza que caracteriza a qualidade da cor (vermelho, verde, amarelo, azul), permitindo diferenciá-la (FEINER, 2006)

Nas médias do índice de vermelho ( $a^*$ ) e do ângulo de tonalidade ( $h^*$ ), demonstradas nas figuras 5B e 5C, respectivamente, o tratamento diferiu ( $p > 0,05$ ) apenas no dia 3 do controle, sendo iguais em todos os outros dias testados e quanto ao tempo de armazenamento.

O índice de amarelo ( $b^*$ ) representa tonalidades que vão do azul (valores negativos) ao amarelo (valores positivos). O índice de saturação ( $C^*$ ) corresponde à intensidade, ou quantidade de uma tonalidade, indicando o nível de mistura com o branco, preto ou cinza.

Os valores de índice de amarelo ( $b^*$ ) são influenciados, principalmente, pelas características dos alimentos. Porém, alterações no pH, oxidação, atividade de água, e tipo de óleo essencial utilizado, também podem afetar esse parâmetro (COFRADES *et al.*, 2004). Já o índice de saturação ( $C^*$ ) permite determinar a intensidade da cor, sendo obtido em função de  $a^*$  e  $b^*$ . As cores que apresentam altos valores de índice de saturação são denominadas saturadas. Já as que apresentam baixos valores, são chamadas pálidas ou acinzentadas (ANDRADE, 2013; RAMOS; GOMIDE, 2017).

Segundo Brewer *et al.* (2001), o parâmetro que traz mais informações a respeito da intensidade visual da cor rósea característica de produtos cárneos curados é a luminosidade, sendo o parâmetro de maior influência na qualidade de produtos cárneos.

A Tabela 7 apresenta os valores de diferença total da cor entre os tempos de análises de um mesmo tratamento e entre os tratamentos.

Tabela 7 – Diferença total da cor ( $\Delta E^*$ ).

Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)			
	0	3	6	15
Controle	-	1,2	1,7	1,8
Tratamento	-	2,8	3,3	3,2
Controle X Tratamento	5,2	3,9	3,7	4,1

Legenda: Para o cálculo do  $\Delta E^*$  entre os tratamentos foram utilizados os valores do controle do respectivo dia como  $L^*_0$ ,  $a^*_0$  e  $b^*_0$ .

Fonte: Do autor (2021).

Valores encontrados para a diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) entre 0,5 e 1,5 são considerados muito baixos e o olho humano é incapaz de detectar essas diferenças. Porém, acima de 1,5, as diferenças já são detectáveis ao olho humano; e acima de 5,00 são evidentemente perceptíveis (OBÓN *et al.*, 2009). Podendo assim, afirmar que o tratamento com emulsão de óleos essenciais apresentou diferenças detectáveis, quando comparadas ao tempo de zero dia, bem como ao tratamento controle.



## 6 CONCLUSÃO

Todos os óleos testados apresentaram ação inibitória sobre as duas cepas testadas, mas não apresentaram ação esporicida. A combinação gerada entre os óleos de alho, basilicão, pimenta rosa e segurelha promoveram ação inibitória idênticas sobre as duas cepas quando testadas *in vitro*. Porém, quando inoculadas em mortadela, a cepa de *Clostridium botulinum* apresentou maior sensibilidade, quando comparado com a de *C. sporogenes*.

A emulsão dos óleos diminui a oxidação lipídica do produto, não alterou o pH e promoveu alteração na luminosidade ( $L^*$ ), deixando o produto mais escuro e com diferenças detectáveis, segundo a diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ).

A mistura de óleos testada se mostrou promissora como conservante e antioxidante para ser utilizado em produtos cárneos.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007. 804 p.

AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [Washington], v. 61, n. 46, p. 10835-10847, Oct. 2013. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf403496k>. Acesso em: 23 ago. 2020.

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

AVATO, P. *et al.* Allylsulfide constituents of garlic volatile oil as antimicrobial agents. **Phytomedicine**, [Jena], v. 7, n. 3, p. 239–243, June 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711300800100>. Acesso em: 17 set. 2020.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, [Basiléia], v. 17, n. 4, p. 3989-4006, Apr. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22469594/>. Acesso em: 15 out. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos de Botulismo no Brasil**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/30/Gr--ficos---Botulismo---2.pdf>. Acesso em: 13 out. 2020.

BREWER, M. S. *et al.* Measuring pork color: effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. **Meat Science**, [Oxford], v. 57, n. 2, p. 169–176, Feb. 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0309174000000899>. Acesso em: 22 nov. 2020.

BROWN, J. L.; TRAN-DINH, N.; CHAPMAN, B. *Clostridium sporogenes* PA 3679 and its uses in the derivation of thermal processing schedules for low-acid shelf-stable foods and as a research model for proteolytic *Clostridium botulinum*. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 75, n. 4, p. 779-792, Apr. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22488072/>. Acesso em: 13 dez. 2020.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15246235/>. Acesso em: 15 jan. 2021.

CALO, J. R. *et al.* Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, [Oxford], v. 54, p. 111-119, Aug. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713515000456>. Acesso em: 12 ago. 2020.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Natural food additives: *Quo vadis?* **Trends in Food Science & Technology**, [London], v. 45, n. 2, p. 284-295, Oct. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224415001508>. Acesso em: 13 set. 2020.

CHIN, J. *et al.* **Control of communicable diseases manual**. 17th ed. Washington: American Public Health Association, 2000. 624 p.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria**. 9th ed. Wayne: CLSI document M100, 2019.

COFRADES, S. *et al.* Restructured beef with different proportions of walnut as affected by meat particle size. **European Food Research and Technology**, [New York], v. 218, n. 3, p. 230–236, Feb. 2004. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-003-0808-y>. Acesso em: 17 out. 2020.

COLLINS, M. D. *et al.* The phylogeny of the genus *Clostridium*: Proposal of five new genera and eleven new species combinations. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [New York], v. 44, n. 4, p. 812–826, Oct. 1994. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-44-4-812>. Acesso em: 22 nov. 2020.

CRUZ-MORALES, P. *et al.* Revisiting the evolution and taxonomy of Clostridia, a phylogenomic update. **Genome Biology and Evolution**, [Oxford], v. 11, n. 7, p. 2035–2044, July 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31076745/>. Acesso em: 11 dez. 2020.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicações na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 389-399, abr. 2012. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722012000200021](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000200021). Acesso em: 22 ago. 2020.

DE OLIVEIRA, T. L. C. *et al.* Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 144, n. 3, p. 546-555, Jan. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510006525>. Acesso em: 17 jan. 2021.

EDUARDO, M. B. P.; SIKUZAWA, S. O botulismo no Brasil e o trabalho desenvolvido pelo Centro de Referência do Botulismo. *In*: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 1., 2003. **Anais [...]**. 2003. p. 60.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods**, [Netherlands], v. 18, p. 811-819, Oct. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615001127>. Acesso em: 19 set. 2020.

EVANS, J. Consumer perceptions and practice in the handling of chilled foods. **Sous vide and cook-chill processing for the food industry**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1998. p. 1-24.

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

FIGUEIREDO, A. C. *et al.* Factors affecting secondary metabolite production in plants: Volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, [Chichester], v. 23, n. 4, p. 213-226, May 2008. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ffj.1875>. Acesso em: 11 out. 2020.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar./abr. 2007. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422007000200026](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000200026). Acesso em: 17 nov. 2020.

GUERRA, F. Q. S. *et al.* Atividade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre cepas de *Acinetobacter* spp. multidrogas-resistentes. **Revista de Biologia e Farmácia**, [Paraíba], v. 7, n. 1, p. 1-10, dez. 2012. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/337843890\\_ATIVIDADE\\_ANTIBACTERIANA\\_D\\_E\\_OLEOS\\_ESSENCIAIS\\_DE\\_ESPECIARIAS\\_SOBRE\\_CEPAS\\_DE\\_ACINETOBACTER\\_SPP\\_MULTIDROGAS-RESISTENTES](https://www.researchgate.net/publication/337843890_ATIVIDADE_ANTIBACTERIANA_D_E_OLEOS_ESSENCIAIS_DE_ESPECIARIAS_SOBRE_CEPAS_DE_ACINETOBACTER_SPP_MULTIDROGAS-RESISTENTES). Acesso em: 19 dez. 2020.

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. 91-97, May 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18378032/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, [Switzerland], v. 3, n. 12, p. 1-24, Jan. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22291693/>. Acesso em: 14 ago. 2020.

ISMAIEL, A. A.; PIERSON, M. D. Effect of sodium nitrite and 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, Nov. 1990a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31022781/>. Acesso em: 13 set. 2020.

ISMAIEL, A. A.; PIERSON, M. D. Inhibition of germination, outgrowth, and vegetative growth of *Clostridium botulinum* 67B by spice oils. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 53, n. 9, p. 755–758, Sept. 1990b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31018318/>. Acesso em: 14 out. 2020.

ISMAIEL, A. A.; PIERSON, M. D. Inhibition of growth and germination of *C. botulinum* 33A, 40B, and 1623E by essential oil of spices. **Journal of Food Science**, [Malden], v. 55, n. 6, p. 1676–1678, Nov. 1990c. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.1990.tb03598.x>. Acesso em: 15 nov. 2020.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, [Sharjah], v. 10, n. 10, p. 813-829, May 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12678685/>. Acesso em: 11 dez. 2020.

MARIEM, C. *et al.* Antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from *Nitraria retusa* fruits and their applications to meat product preservation. **Industrial Crops and Products**, [Amsterdam], v. 55, p. 295-303, Apr. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669014000430>. Acesso em: 14 jan. 2021.

MARTINS, H. H. A. **Sinergismo antimicrobiano de óleos essenciais e nitrito sobre *Clostridium sporogenes* inoculado em fiambre de peito de frango**. 2016. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

NAZZARO, F. *et al.* Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, [Basiléia], v. 6, n. 12, p. 1451-1474, Nov. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3873673/>. Acesso em: 15 ago. 2020.

NIST - NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version 2.0 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library**. Gaithersburg: NIST, 2008.

OBÓN, J. M. *et al.* Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 90, n. 4, p. 471–479, Feb. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877408003610>. Acesso em: 11 ago. 2020.

OLGUÍN-ARANEDA, V. *et al.* Recent advances in germination of *Clostridium* spores. **Research in Microbiology**, [Amsterdam], v. 166, n. 4, p. 236-243, May 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0923250814001193>. Acesso em: 18 set. 2020.

PIKUL, J.; LESZCZYNSKI, D. E.; KUMMEROW, F. A. Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [Washington], v. 37, n. 5, p. 1309-1313, Sept. 1989. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00089a022>. Acesso em: 14 nov. 2020.

PINELLI, J. J. *et al.* Essential oil nanoemulsions for the control of *Clostridium sporogenes* in cooked meat product: An alternative? **LWT – Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 143, p. 111-123, May 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643821002760>. Acesso em: 22 jan. 2021.

POPHAM, D. L. Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore: the inner wall of the lockbox. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [Basileia], v. 59, n. 3, p. 426-433, Mar. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11964121/>. Acesso em: 15 jan. 2021.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: Fundamentos e metodologias**. Viçosa: Editora UFV, 2017.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, [Amsterdam], v. 62, p. 250-264, Dec. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669014005196>. Acesso em: 17 ago. 2020.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, [Netherlands], v. 18, p. 820-897, Oct. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615003023>. Acesso em: 15 set. 2020.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, [London], v. 23, n. 2, p. 136-141, Apr. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21903378/>. Acesso em: 19 out. 2020.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [Oxford], v. 2016, p. 1-22, Dec. 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2016/3012462/>. Acesso em: 29 nov. 2020.

TOMAINO, A. *et al.* Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 89, n. 4, p. 549-554, Mar. 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814604002407>. Acesso em: 15 dez. 2020.

WIEGEL, J. Clostridiaceae. *In: Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2015. p. 1–5.

WIEGEL, J.; TANNER, R.; RAINEY, F. A. An introduction to the family Clostridiaceae. *In: The Prokaryotes*. New York: Springer US, 2006. p. 654–678.

YAP, P. S. X. *et al.* Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The Open Microbiology Journal**, [Netherlands], v. 8, p. 6-14, Feb. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3950955/>. Acesso em: 28 jan. 2021.