



RAQUEL MARTINO BEMFEITO CARVALHO

**NANOEMULSIONS CONTAINING BLENDS OF ESSENTIAL
OILS IN THE CONTROL OF *Listeria innocua* INOCULATED
IN MORTADELLA**

**LAVRAS-MG
2022**

RAQUEL MARTINO BEMFEITO CARVALHO

**NANOEMULSIONS CONTAINING BLENDS OF ESSENTIAL OILS IN THE
CONTROL OF *Listeria innocua* INOCULATED IN MORTADELLA**

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

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

Prof. Dr. Diego Alvarenga Botrel
Coorientador

**LAVRAS–MG
2022**

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

Carvalho, Raquel Martino Bemfeito.

Nanoemulsions containing blends of essential oils in the control
of *Listeria innocua* inoculated in mortadella / Raquel Martino
Bemfeito Carvalho. - 2022.

89 p. : il.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Coorientador(a): Diego Alvarenga Botrel.

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

Bibliografia.

1. Nanoemulsões. 2. Conservantes naturais. 3. *Listeria* sp. I.
Piccoli, Roberta Hilsdorf. II. Botrel, Diego Alvarenga. III. Título.

RAQUEL MARTINO BEMFEITO CARVALHO

**NANOEMULSIONS CONTAINING BLENDS OF ESSENTIAL OILS IN THE
CONTROL OF *Listeria innocua* INOCULATED IN MORTADELLA**

**NANOELMUSÕES CONTENDO MISTURAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO
CONTROLE DE *Listeria innocua* INOCULADA EM MORTADELA**

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

APROVADA em 24 de agosto de 2022.

Dr. Diego Alvarenga Botrel UFLA

Dr. Eduardo Mendes Ramos UFLA

Dra. Monique Suela Silva UFLA

Dr. Cleube Andrade Boari UFVJM

Roberta Hilsdorf Piccoli

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS-MG
2022**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conduzir pelos melhores caminhos.

Aos meus pais Marisa e Saulo, por serem minha base, exemplo de fé, persistência, dedicação, por todo amor, apoio e incentivo.

À minha "segunda mãe" Luciana, pelas nossas conversas e pelas palavras de carinho.

Ao meu marido Thiago, pelo companheirismo e por me incentivar sempre a buscar o meu melhor.

Aos meus filhos Matheus e Marina, por serem luz, razão da minha vida, pelos sorrisos e abraços apertados e mais sinceros.

À minha irmã Carla, por todo o apoio, pelos conselhos, por ser inspiração em minha vida profissional, e aos meus irmãos, Dalvo e Joaquim, por estarem sempre presentes.

À Darlene, Beth, Milene, Carol, todos os meus familiares e amigos, pela força durante minha trajetória.

À minha orientadora Roberta Piccoli, por compartilhar experiências, pelos ensinamentos, amizade, paciência e conselhos.

Aos professores Diego Botrel e Eduardo Mendes, por estarem sempre disponíveis a ajudar.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela disponibilidade e pela amizade, por tornarem essa etapa mais leve e especial.

Ao Instituto Federal de Minas Gerais (IFMG – Campus Bambuí), à Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos (PPGCA), pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

Aos professores, membros da banca examinadora, pela contribuição.

Gratidão a todos que contribuíram para a realização desse sonho!

RESUMO

A carne e seus derivados requerem cuidados especiais no processo de manipulação e de armazenamento devido à fácil deterioração microbiana. Embora atendam às exigências do mercado, por sua grande praticidade, produtos cárneos processados são frequentemente contaminados por microrganismos patogênicos resistentes ao sal e capazes de se multiplicar durante armazenamento em refrigeração. *Listeria monocytogenes* é um patógeno de grande interesse e vem se destacando nos últimos anos no controle de qualidade na indústria de alimentos, devido às dificuldades de eliminação, assim como a possibilidade de causar doenças graves aos consumidores. Está envolvida em grande número de surtos de origem alimentar por todo o mundo, e os alimentos mais envolvidos são aqueles prontos para consumo, que são armazenados por longos períodos em refrigeração, principalmente os produtos cárneos. Atualmente, os consumidores buscam cada vez mais alimentos com vida útil longa e o mais natural possível, logo, os óleos essenciais surgem como alternativa, para substituição ou uso conjunto na redução da utilização de conservantes sintéticos em alimentos. Devido à grande instabilidade em condições ambientais, a utilização de óleos essenciais é dificultada, mas essa limitação pode ser superada pela produção de nanoemulsões de óleos essenciais, que apresentam melhores características físico-químicas e maior estabilidade, além de aumentar a atividade biológica dos óleos. O objetivo do presente estudo foi a elaboração de mortadelas com reduzida concentração de nitrito, incorporadas de emulsões e nanoemulsões de combinações de óleos essenciais, a fim de avaliar a atividade antimicrobiana em relação à *Listeria innocua*, as características físico-químicas e sensoriais. Para aplicação na mortadela, foram selecionadas duas combinações de óleos essenciais e preparados cinco tratamentos: Controle – sem óleos essenciais; Tratamento 1, contendo os óleos essenciais de orégano (0,075325%), tomilho branco (0,07925%), pimenta chinesa (0,058675%) e cravo folha (0,07925%); Tratamento 2, composto pelos óleos essenciais de orégano (0,0875%), tomilho branco (0,05%), pimenta chinesa (0,0875%) e cravo folha (0,15%); a partir dos tratamentos 1 e 2 foram desenvolvidas duas nanoemulsões que constituíram os Tratamentos 3 e 4, respectivamente. As mortadelas foram armazenadas em temperatura de 8 °C durante 21 dias. As nanoemulsões produzidas foram caracterizadas em relação ao tamanho das gotículas, índice de polidispersão e potencial zeta. Características tecnológicas das mortadelas, como pH, oxidação lipídica e cor foram analisadas. Foi realizada avaliação sensorial das mortadelas através de grupo de foco. Os tratamentos contendo óleos essenciais e nanoemulsões foram, em geral, mais eficientes que o tratamento controle em relação à atividade antimicrobiana. Não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação ao pH e oxidação lipídica, porém observou-se aumento da oxidação lipídica durante o tempo de armazenamento. A variação da cor entre os tratamentos não foi altamente perceptível. Embora a utilização de conservantes naturais incorporados nas formulações de mortadelas seja interessante e atrativa, as alterações nas características sensoriais devem ser consideradas. O presente estudo apresentou uma estratégia promissora para melhorar a segurança dos produtos cárneos, porém mais estudos devem ser realizados para otimizar as concentrações de óleos essenciais, a fim de reduzir os impactos nas características sensoriais.

Palavras-chave: Produtos cárneos. *Listeria sp.* *Origanum vulgare.* *Thymus vulgaris.* *Litsea cubeba.* *Eugenia caryophyllus.* Conservantes naturais. Nanoemulsões.

ABSTRACT

Meat and its derivatives need special treatments in the handling and storage process because they are easily contaminated foods. Although these products meet market requirements, due to their great practicality, processed meat products are often contaminated by salt-resistant pathogenic microorganisms capable of multiplying during refrigerated storage. *L. monocytogenes* is a pathogen of interest in the food industry and has been highlighted in recent years in quality control due to the difficulties of elimination, as well as the possibility of causing serious diseases to consumers. This bacterium is involved in a large number of foodborne outbreaks around the world; and the foods most involved are ready-to-eat foods that are stored for long periods in refrigeration, especially meat products. Although this bacteria is eliminated by proper heat treatment of products, there is a possibility of contamination of the processing line when standard operating procedures fail. Currently, the quality, safety and authenticity of food are concerns of consumers who are increasingly looking for foods with a long shelf life and as natural as possible, so essential oils emerge as an alternative for replacement or combined use in reducing the use of synthetic preservatives in food. Due to the great instability of essential oils under environmental conditions, there are limitations in the use of these preservatives. This difficulty can be overcome by encapsulating these oils in nanoemulsions, which have better physicochemical characteristics and greater stability, in addition to increasing the biological activity of the oils due to their better distribution on certain surfaces. The aim of this study was to prepare mortadella with reduced concentration of nitrite, incorporating emulsions and nanoemulsions containing blends of essential oils, in order to evaluate the antimicrobial activity against *Listeria innocua* and the physicochemical and sensory characteristics of the meat product. Two combinations of essential oils were applied to the mortadella. In total, five different treatments were prepared: Control - without addition of essential oils; Treatment 1 - oregano essential oil (0.075325%), white thyme (0.07925%), chinese pepper (0.058675%) and clove leaf (0.07925%); Treatment 2 - oregano essential oil (0.0875%), white thyme (0.05%), chinese pepper (0.0875%) and clove leaf (0.15%); considering Treatments 1 and 2, two nanoemulsions were developed which constituted Treatments 3 and 4, respectively. The mortadella samples were stored at 8 °C for 21 days. The nanoemulsions were characterized for droplet size, polydispersity index and zeta potential. Technological characteristics of the samples, such as pH, lipid oxidation and color were analyzed. Sensory evaluation of mortadella was conducted by focus group. In general, the antimicrobial activity of treatments containing essential oils and nanoemulsions proved to be more efficient than the control treatment. Regarding the physicochemical analyses, there was no difference between the treatments for pH, lipid oxidation and color, however, an increase in lipid oxidation was observed along the storage time. Although the use of natural preservatives incorporated in mortadella formulations is interesting and attractive, changes in sensory characteristics must be considered. The present study presented a promising strategy to improve the safety of meat products, but more studies should be carried out to optimize the concentrations and types of essential oils, in order to reduce the impacts on sensory characteristics.

Keywords: Meat products. *Listeria* sp. *Origanum vulgare*. *Thymus vulgaris*. *Litsea cubeba*. *Eugenia caryophyllus*. Natural preservatives. Nanoemulsions.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	8
1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	Bactérias do gênero <i>Listeria</i>	10
2.1.1	Mecanismo de ação	11
2.1.2	Persistência de <i>Listeria monocytogenes</i> no ambiente industrial	12
2.1.3	Presença nos alimentos	15
2.2	Produtos cárneos processados	17
2.3	Óleos essenciais	20
2.3.1	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais	23
2.4	Nanoemulsões	26
	REFERÊNCIAS	29
	SEGUNDA PARTE	50
	ARTIGO 1 – POTENTIAL APPLICATION OF NANOEMULSION OF ESSENTIAL OIL BLENDS FOR THE CONTROL OF <i>Listeria innocua</i> IN MORTADELLA	50
	ANEXO A - Ficha de avaliação sensorial	86

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Durante o processo de produção, transporte, armazenamento e distribuição, os alimentos estão sujeitos a contaminação por substâncias tóxicas ou por microrganismos. A carne e produtos cárneos em geral, devido à riqueza em nutrientes e demais características, constituem-se em excelente substrato para desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Alimentos prontos para consumo, como produtos à base de carne, podem ser contaminados com microrganismos patogênicos que podem entrar no ambiente de processamento de alimentos a partir de matérias-primas ou manuseio pós-processamento devido a condições higiênico-sanitárias inadequadas.

Diferente da maioria dos patógenos transmitidos por alimentos, *Listeria monocytogenes* pode crescer em condições de baixa umidade, alta concentração de sal e, o mais importante, em temperaturas de refrigeração, conferindo, assim, capacidade de persistir e se multiplicar nos alimentos. A listeriose, infecção sistêmica grave, causada pela *L. monocytogenes*, provoca sintomas que incluem septicemia, meningite, encefalite, principalmente em idosos ou pacientes imunocomprometidos, e infecção cervical ou intrauterina em gestantes, que pode provocar aborto, e outros danos ainda podem ocorrer além de sintomas gastrointestinais. Vários países consideram a identificação, o rastreamento de *L. monocytogenes* em carnes e o estabelecimento de sistemas de vigilância eficientes como base para a proteção eficaz da saúde pública e o gerenciamento da segurança alimentar (LIU *et al.*, 2020).

O uso de antibacterianos naturais, entre os quais se incluem os diversos produtos de origem vegetal com capacidade para inibir a multiplicação de microrganismos, constitui cada vez mais uma nova e promissora forma de garantir alimentos seguros, mantendo-se inalterada a qualidade nutricional e sensorial. A qualidade, segurança e autenticidade dos alimentos constituem preocupações dos consumidores atuais, que estão buscando cada vez mais alimentos com vida útil longa e o mais natural possível, ou seja, com a presença mínima de conservantes sintéticos, o que também vem sendo uma tendência da legislação mais recente de alimentos. Logo, os óleos essenciais surgem como uma alternativa, não só na substituição, mas também para uso conjunto na redução da utilização de conservantes sintéticos em alimentos.

A utilização dos óleos essenciais na forma de nanoemulsões é de interesse, devido à grande instabilidade e a alta volatilidade desses compostos, o que se torna crítico durante o período de armazenamento e transporte. Devido ao seu tamanho nanométrico, os sistemas

dessas substâncias podem interagir de modo mais eficiente com a matriz a ser conservada, possibilitando o controle da liberação dos compostos ativos do óleo essencial (MORAES *et al.*, 2013).

Diante do exposto, o presente trabalho apresenta como objetivo a elaboração de mortadelas, com reduzida concentração de nitrito, incorporadas de emulsões e nanoemulsões de combinações de óleos essenciais, a fim de avaliar as características físico-químicas e sensoriais e a atividade antimicrobiana sobre *Listeria innocua*, considerada uma variante não patogênica da *Listeria monocytogenes*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bactérias do gênero *Listeria*

O gênero *Listeria* inclui o patógeno transmitido por alimentos *L. monocytogenes* e 14 outras espécies: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. rocourtae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia* e *L. grandensis* (WELLER *et al.*, 2015). As espécies de *Listeria* são caracterizadas pelos seus antígenos, que determinam 17 sorovares. *L. monocytogenes*, a principal espécie patogênica, é representada por 13 sorovares, alguns dos quais são compartilhados com *L. innocua* e *L. seeligeri*. Embora *L. innocua* seja representada por apenas três sorovares, ela é muitas vezes considerada uma variante não patogênica de *L. monocytogenes*. A grande heterogeneidade antigênica do envelope externo das espécies citadas pode estar relacionada ao amplo número de animais hospedeiros nos quais elas podem proliferar-se (JAY, 2005).

Listeria monocytogenes é um bacilo gram-positivo, amplamente distribuído na natureza, podendo ser isolada do solo, água, silagem, plantas e outras fontes ambientais. Não produz esporos, porém é bem resistente e suporta os efeitos deletérios do congelamento, desidratação, acidez e calor. Ela pode ainda se desenvolver em ambientes com baixas tensões de oxigênio, devido à sua característica microaerófila (SAKATE, 2005). É um dos poucos patógenos de origem alimentar que pode se adaptar e crescer lentamente sob temperaturas de refrigeração (EVANS; REDMOND, 2019; LIANOU; PANAGOU; NYCHAS, 2017; RYSER; DONNELLY, 2015), embora sua faixa ótima de crescimento seja entre 30 e 37 °C e pode sobreviver em alimentos congelados. Tolerar pH de 6 a 8, considerada a faixa ótima de crescimento, embora pesquisas tenham demonstrado o seu crescimento em pH de 4,1 a 9,6, além disso, pode resistir a concentrações de NaCl de até 10% ou superiores. Possui a capacidade de crescer em atividade de água (*A_w*) de 0,93 e resiste bem aos efeitos de secagem e ao tratamento com nitrito de sódio (120 mg/Kg) (GERMANO; GERMANO, 2008; JAY, 2005).

A taxa de crescimento de *L. monocytogenes* em alimentos depende de fatores como temperatura, atmosfera, matriz alimentar, atividade de água, pH, aditivos como lactato e acetato e microrganismos interferentes (AUGUSTIN *et al.*, 2005, 2011; BEAUFORT *et al.*, 2014; CORNU *et al.*, 2011; DEVLIGHERE *et al.*, 2001; DUSSAULT; VU; LACROIX, 2016; GIMENEZ; DALGAARD, 2004; MEJLHOLM *et al.*, 2010; MELLEFONT; McMEEKIN; ROSS, 2008).

Listeria monocytogenes é endêmica em algumas instalações de processamento de alimentos, incluindo ambientes de varejo (HAMMONS *et al.*, 2017; SIMMONS *et al.*, 2014; SUNDARRAM *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2020a, 2020b). Persiste em nichos em toda a cadeia de produção e se espalha para alimentos por meio de contaminação cruzada (KIM; SILETZKY; KATHARIOU, 2008). *Listeria* spp. pode persistir devido à capacidade variável de formação de biofilme, conferindo maior resistência a estressores ambientais e protocolos de limpeza e saneamento comumente utilizados em comparação com isolados planctônicos (FAGERLUND *et al.*, 2017; RODRÍGUEZ-CAMPOS *et al.*, 2019; SADEKUZZAMAN *et al.*, 2017).

Essas características fazem com que *L. monocytogenes* seja um patógeno de grande interesse na área de alimentos e explica o destaque que esse microrganismo vem ocupando nos últimos anos no controle de qualidade na indústria de alimentos, devido às dificuldades de eliminação, assim como a possibilidade de causar doenças graves em humanos.

2.1.1 Mecanismo de ação

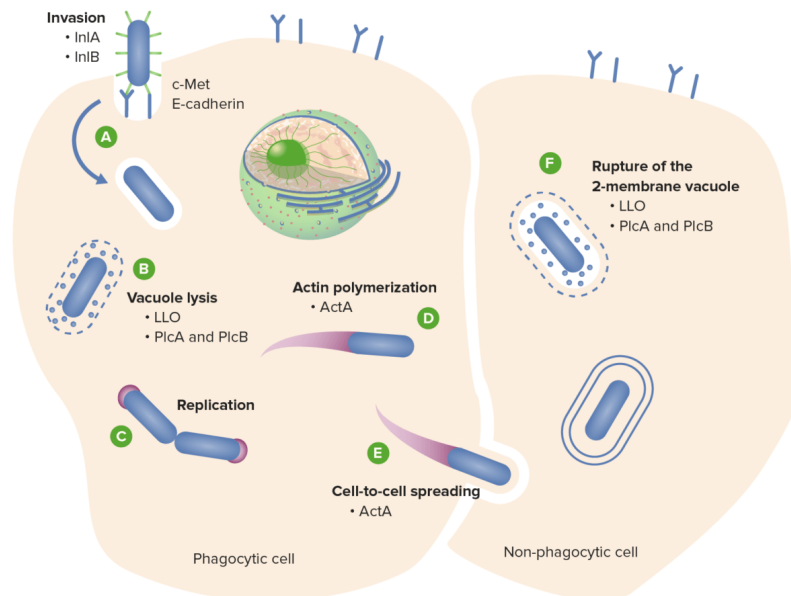
As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são causadas pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com patógenos ou toxinas, em quantidades que afetam a saúde do consumidor. A doença causada por *L. monocytogenes*, conhecida como listeriose, provoca sintomas que incluem septicemia, meningite, encefalite e infecção cervical ou intrauterina em gestantes, que pode provocar aborto. Outros danos podem ocorrer, como endocardite, abscessos, lesões cutâneas, além de sintomas gastrointestinais e outros semelhantes aos da gripe (SILVA *et al.*, 2010).

O intestino humano é o local de entrada da *L. monocytogenes* no organismo, através das células epiteliais do ápice das microvilosidades. As células microbianas difundem-se pelo interior dessas células e de uma célula para outra. Posteriormente, são ingeridas por macrófagos, onde encontram-se protegidas dos leucócitos polimorfonucleares, porém as cepas virulentas são capazes de se multiplicar, rompendo os macrófagos e produzindo septicemia. Assim, os microrganismos podem atingir outras áreas do organismo, podendo envolver o sistema nervoso central, o coração ou outros locais. Em gestantes, pode ocorrer invasão do feto, aborto, parto prematuro, nascimento de natimorto ou septicemia neonatal. Na fase entérica, os sintomas assemelham-se aos da gripe, acompanhados de diarreia e febre moderada (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Em todas as células eucarióticas, *L. monocytogenes* desenvolve um ciclo celular semelhante que pode ser dividido em três etapas: escape do fagossomo após a fagocitose,

multiplicação na célula hospedeira e invasão da célula vizinha. A invasão é decorrente da polimerização de filamentos de actina que impulsionam a bactéria em direção à célula adjacente, provocando a formação de invaginações e fagocitose, começando assim um novo ciclo (CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008) (FIGURA 1).

Figura 1 - Ciclo de infecção da *L. monocytogenes*.



Legenda: (A) A *L. monocytogenes* invade a célula hospedeira através da interação das internalinas de superfície A e B (InlA e InlB) com os receptores de superfície E-caderina e c-Met da célula hospedeira, respectivamente. (B) A *Listeria* escapa dos fagossomas através da ação das toxinas LLO, PlcA e PlcB. (D) A *Listeria* replica-se no citosol e dirige-se para a superfície celular via polimerização da actina, (E) promovendo a disseminação célula-a-célula. (F) A ruptura dos 2 vacúolos da membrana também é mediada pela LLO e toxinas da fosfolipase. InlA: internalina A, InlB: internalina B, LLO: listeriolisina O, PlcA: fosfolipase A, PlcB: fosfolipase B, ActA: proteína A indutora da montagem da actina.

Fonte: Oiseth, Jones e Maza (2022).

Embora a listeriose seja uma doença de baixa incidência (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007), é a segunda maior causa de patologia fatal decorrente de infecções alimentares (WIEDMANN, 2002). Trata-se de uma doença veiculada por alimento com elevada mortalidade, em torno de 20 a 30%, e a mais elevada taxa de internação hospitalar (90%) (SILVA *et al.*, 2010; ZHANG; JAYARAO; KNABEL, 2004).

2.1.2 Persistência de *Listeria monocytogenes* no ambiente industrial

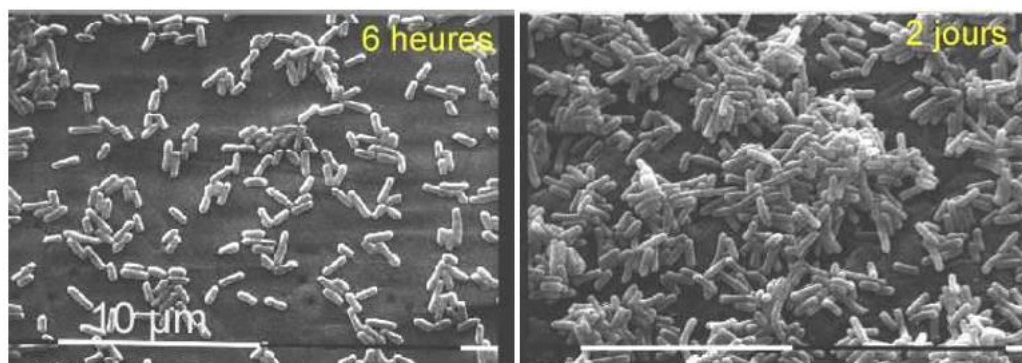
No ambiente industrial as células microbianas podem ser encontradas em suspensão, ou seja, células planctônicas ou de livre flutuação (JAY, 2005), ou podem formar biofilmes,

quando se fixam à superfície e permanecem inclusos em uma matriz composta predominantemente de material polissacarídeo (GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

Algumas cepas de *L. monocytogenes* podem persistir no ambiente de processamento durante longos períodos, havendo relatos de persistência por mais de 10 anos (KATHARIOU, 2002; TOMPKIN, 2002). Uma das causas sugeridas para a alta persistência do microrganismo está relacionada com a habilidade de algumas cepas formarem biofilmes e assim resistirem aos sanitizantes utilizados na indústria (HOLAH *et al.*, 2002). A produção de glicocálix pelas microcolônias aderidas às superfícies ocorre em torno de 48 horas e pode proteger as células da ação de substâncias inibitórias produzidas por culturas competidoras (WIRTANEN; MATTILA-SANDHOLM, 1992 citado por BARROS, 2005). Assim, superfícies inadequadamente higienizadas e a presença de resíduos orgânicos conferem proteção ao patógeno.

A dificuldade em eliminar esse microrganismo das indústrias é potencializada pelas condições de umidade, temperatura e presença de matéria orgânica nas plantas de processamento, que aliadas à habilidade da *L. monocytogenes* em produzir biofilmes podem desencadear a colonização de superfícies de equipamentos e utensílios (UHITIL *et al.*, 2004). Estudos têm demonstrado a capacidade da *L. monocytogenes* de formar biofilmes sobre materiais comumente utilizados em indústrias de alimentos, inclusive na presença de outros microrganismos (BERESFORD; ANDREW; SHAMA, 2001), conforme Figura 2.

Figura 2 - Evolução na formação de biofilmes por *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável, ocorrida entre 6 horas e 2 dias.



Fonte: Chavant, Hébraud e Martinie (2002).

O monitoramento da linha de processamento é essencial para o controle da contaminação de produtos cárneos por *L. monocytogenes* (TODD; NOTERMANS, 2011). Laer *et al.* (2009) fizeram um estudo sobre a contaminação de *L. monocytogenes* em uma linha de

processamento de linguiça mista frescal, desde a matéria-prima até o produto, e o microrganismo foi detectado em 25% das amostras investigadas. Apesar de não ter sido encontrado em nenhuma amostra da matéria-prima, a presença do microrganismo foi detectada em 21% das amostras ambientais (com e sem contato com o alimento), 20,8% dos equipamentos, 20% das amostras de mãos de manipuladores, 40% da massa pronta para ser embutida e em todas as amostras do produto final, resultado que alerta para a importância da contaminação cruzada. Também é destacado no trabalho que algumas cepas se adaptaram e persistiram no ambiente de processamento dessa indústria.

A natureza persistente de algumas cepas de *L. monocytogenes* em ambientes de processamento aumentam a chance de contaminação dos alimentos, sendo esse patógeno associado ao maior número de *recalls* de produtos alimentícios nos Estados Unidos (GORTON; STASIEWICZ, 2017).

Os patógenos transmitidos por alimentos encontram uma grande variedade de condições estressantes (aquecimento, congelamento, dessecação, estresse osmótico, pH extremo, ação de desinfetantes) durante o processamento e armazenamento dos alimentos (BEGLEY; HILL, 2015; BURGESS *et al.*, 2016; ESBELIN; SANTOS; HEBRAUD, 2018; SPECTOR; KENYON, 2012). Estudos têm mostrado que a maior persistência da *Listeria monocytogenes* em ambiente de processamento está associada à constante exposição a condições subletais de fatores estressantes, fato que induz seu desenvolvimento e crescimento condicionado ao estresse, tornando-a fisiologicamente mais tolerante a níveis aumentados ou de diferentes fatores estressantes (SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015). Portanto, os mecanismos de resposta dos patógenos ao estresse ambiental vem sendo bastante estudados (HE *et al.*, 2021).

No estudo publicado por He *et al.* (2021), que destacaram a adaptação de muitos patógenos de origem alimentar ao etanol, inclusive *Listeria monocytogenes*, observou-se que os microrganismos se tornaram mais tolerantes à ação do próprio etanol ou por proteção cruzada, tolerantes à ação de diferentes agentes estressores (BROWNE; DOWDS, 2001, 2002; CHIANG; HO; CHOU, 2006, 2008; CHIANG; CHOU, 2008; HE *et al.*, 2016, 2018; HUANG *et al.*, 2013; LOU; YOUSEF, 1997). Estudos comparativos de cepas de *L. monocytogenes* têm identificado várias características específicas de cepas persistentes, incluindo formação aprimorada de biofilme (BORUCKI *et al.*, 2003; LATORRE *et al.*, 2011; NAKAMURA *et al.*, 2013; NOWAK *et al.*, 2017) e crescimento preferencial em condições desfavoráveis (MAGALHÃES *et al.*, 2016). No trabalho desenvolvido por Ochiai *et al.* (2020) verificou-se que condições ambientais influenciaram na persistência de cepas de *Listeria monocytogenes* ao pH ácido.

Em um estudo para avaliar as respostas proteômicas globais de *L. monocytogenes*, cepa ATCC 19115, quando exposta à inativação não-térmica, em que o processo foi examinado na fase inicial de crescimento estacionário, com a cepa submetida à exposição simultânea a pH baixo (pH 3,5) e alta salinidade (a_w 0,900, 14% NaCl), observou-se que o perfil de proteoma fornece melhor compreensão das respostas fisiológicas desse patógeno para se adaptar a ambientes não térmicos letais e indica a necessidade de melhorar os métodos de processamento e armazenamento de alimentos, especialmente para alimentos não processados minimamente ou termicamente (ZHANG; BAI; BOWMAN, 2019).

2.1.3 Presença nos alimentos

A transmissão de *L. monocytogenes* por ingestão de alimentos contaminados parece ser a forma mais importante, visto que as espécies têm sido isoladas de diferentes produtos, tais como leite cru e pasteurizado, queijos, carne bovina, carne moída de diferentes animais, produtos cárneos crus e equipamentos e utensílios em plantas de processamento de carne bovina (FRANCO; LANDGRAF, 2008; KOVACEVIC; MESAK; ALLEN, 2012; MANTILLA *et al.*, 2007; MAZAHARI *et al.*, 2021; SORIANO *et al.*, 2001; YUCEL; CITAK; ONDER, 2005). Essas bactérias estão envolvidas em grande número de surtos de origem alimentar por todo o mundo; e os alimentos mais incriminados são aqueles prontos para consumo, que são armazenados por longos períodos em refrigeração, principalmente os produtos cárneos (HEO *et al.*, 2014; INGHAM *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2014). Os últimos surtos envolvendo *Listeria monocytogenes* sugerem que o consumo de doses baixas ($<10^2$ UFC/g) pode causar infecção (BUCHANAN *et al.*, 2017).

Dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2019) mostram que entre 2009 e 2018 ocorreram no Brasil mais de 6000 surtos de DTA e mais de 122 mil pessoas doentes, com 0,08% de óbitos. No Brasil, são poucas as publicações sobre a incidência de listeriose, pois não se trata de uma doença de notificação obrigatória no país, portanto os dados sobre sua ocorrência são escassos e inconsistentes (BLUM-MENEZES *et al.*, 2013; MARTINS, 2009).

Com base nos dados de incidência de 45 países, a listeriose levou a 5463 mortes em todo o mundo em 2010 (DE NOORDHOUT *et al.*, 2014). Em 2016, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA, 2017) descreveu mais de 2500 casos de listeriose, com 247 mortes. Vários surtos e *recalls* de alto perfil foram atribuídos à contaminação de produtos frescos por *L. monocytogenes* (GARNER; KATHARIOU, 2016; PAINTER *et al.*, 2013; ZHU; GOONERATNE; HUSSAIN, 2017). Em

2011 ocorreu um surto devido à contaminação de melões que resultou em 147 pessoas doentes e 33 mortes. Os produtos à base de carne representaram 18% dos surtos de listeriose registrados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2018). Em estudos realizados na Itália, *L. monocytogenes* foi detectada em 24,4% das amostras de carne bovina (PESAVENTO *et al.*, 2010), na Turquia o percentual de contaminação foi de 6,2% em carne fresca (YUCEL; CITAK; ONDER, 2005) e nas carcaças de bovinos, a detecção de patógenos variou de 6,5% a 26% (IGLESIAS *et al.*, 2017; LOIKO *et al.*, 2016). Houve mais de 30 *recalls* desde 2016 devido à contaminação por *L. monocytogenes* de produtos hortifrutigranjeiros e produtos prontos para o consumo (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2018).

O gênero *Listeria*, amplamente encontrado no meio externo, apresenta resistência variável dependendo do meio em que se encontra, podendo sobreviver até dois anos no solo e seis meses em silagem. Chega aos alimentos mediante matérias-primas contaminadas e pelo contato dessas com o ambiente em que são manipuladas (EUZÉBY, 2000), sendo praticamente impossível garantir sua ausência no ambiente de fabricação.

A alta letalidade (20 a 30%) da listeriose (MILILLO *et al.*, 2012) associada à capacidade do patógeno de se multiplicar sob refrigeração destaca a necessidade de estudos que avaliem o comportamento desse gênero bacteriano quando submetido a condições de estresse. Embora apenas *L. monocytogenes* seja patogênica para humanos, todas as espécies de *Listeria* apresentam um padrão de crescimento e de comportamento similar frente às diferentes condições de cultivo (COELHO *et al.*, 1998 citado por SILVA *et al.*, 2004), logo, a detecção de qualquer espécie em alimentos é interpretada como pré-requisito para o crescimento de *L. monocytogenes* e tem sérias implicações. Esses alimentos são considerados um possível perigo à saúde dos consumidores (KOPPEL; SCHADE; PEIER, 2021).

Sakate (2005), ao avaliar matadouros frigoríficos no Brasil, assim como Chiarini (2007) que avaliou matadouros frigoríficos de aves, verificaram que a presença de *L. monocytogenes* apresentou maior frequência nas seções limpas e com ambiente refrigerado, locais em que foi encontrada maior diversidade genética do patógeno. *L. monocytogenes* presente no ambiente representa um risco de contaminação, pois o patógeno pode ser transferido para o produto a qualquer momento do processo, quando houver falha na higienização ou o acúmulo de produtos na linha de processamento (BERRANG *et al.*, 2002).

Em um trabalho para avaliar a ocorrência de *Listeria* sp. em 48 amostras de presunto cozido sem capa de gordura, mantido sob temperatura de refrigeração, comercializado em 26 supermercados de Fortaleza (CE), foi constatado que 42,5%, 22,5% e 2,5% das amostras

estavam contaminadas por *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. welshimeri*, respectivamente. Considerando que o processo de cozimento do presunto é suficiente para destruir *L. monocytogenes*, a contaminação desse alimento ocorreu em etapas pós-processamento ou resultou de subprocessamento. A presença do microrganismo pode ser atribuída ainda a contaminações cruzadas durante manuseio e fatiamento (FAI *et al.*, 2011).

2.2 Produtos cárneos processados

A crescente demanda de produtos industrializados de conveniência, como minimamente processados, refrigerados e alimentos prontos para o consumo (*ready-to-eat*), tem contribuído para aumentar o risco de doenças transmitidas por alimentos (SAMUEL *et al.*, 2007). Embora atendam às exigências do mercado, por sua grande praticidade, produtos como presunto, mortadela, salame e outros são frequentemente contaminados por microrganismos patogênicos resistentes ao sal e capazes de se multiplicar durante armazenamento em refrigeração (CAMARGO, 2011). Muitos desses produtos são armazenados sobre refrigeração e consumidos sem tratamento térmico (BERSOT *et al.*, 2008). A embalagem em atmosfera modificada não inibe o crescimento de *L. monocytogenes* (HOELZER; POUILLOT; DENNIS, 2012).

Galvez *et al.* (2007) ressaltam que a falta de microrganismos competidores, devido ao cozimento, favorece a multiplicação de microrganismos decorrente da contaminação pós-processamento. O cozimento de carne crua geralmente inativa as bactérias, razão pela qual as contaminações de produtos cárneos cozidos prontos para consumo são principalmente resultado de contaminações secundárias devido a etapas de processamento adicionais, como corte e reembalagem (LIANOU; SOFOS, 2007).

A etapa de fatiamento desses produtos aumenta o risco de contaminação devido à manipulação e ao contato com superfícies inadequadamente higienizadas, o que pode agravar pela manutenção dos produtos e fatiadores em temperatura ambiente. Além disso, o uso prolongado e as repetidas limpezas dos fatiadores podem causar danos mecânicos às máquinas, com o aparecimento de microrrachaduras, nas quais fragmentos de produtos podem se acumular e, pela dificuldade de limpeza, tornarem-se locais de adesão e multiplicação microbiana (FDA, 2022; MUÑOZ *et al.*, 2013; SHEEN; HWANG, 2008, 2010; UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2013).

A Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos,

determina que alimentos prontos para o consumo devem atender aos padrões microbiológicos para *Listeria monocytogenes*. De acordo com a legislação, alimentos com prazo de validade menor que 5 dias; pH menor ou igual a 4,4; atividade de água menor ou igual a 0,92 ou alimentos com pH menor ou igual a 5,0 e atividade de água menor ou igual a 0,94, que tenham recebido tratamento térmico efetivo ou outro processo equivalente para eliminação de *L. monocytogenes*, cuja recontaminação após esse tratamento não seja possível, tais como os produtos tratados termicamente em sua embalagem final, não necessitam da realização de pesquisa regular de *L. monocytogenes*, portanto os produtos comercializados fatiados, por apresentarem possibilidade de contaminação pós-processamento, deverão atender aos padrões preconizados pela legislação (BRASIL, 2022).

A contaminação cruzada com microrganismos patogênicos representa importante desafio para as indústrias de alimentos e para os sistemas de saúde pública mundiais, especialmente quando ocorre com alimentos prontos para o consumo, nos quais não há nenhuma intervenção que possa reduzir ou eliminar esses contaminantes causadores de enfermidades antes do seu consumo. A ocorrência de surtos de DTA foi relatada por diversos autores que estudaram a contaminação cruzada de produtos cárneos *ready-to-eat* (CDC, 2000, 2002, 2016; GARRIDO; VITAS; GARCÍA-JALÓN, 2009; GREEN BROWN; KHARGONEKAR; BUSHNELL, 2013; HÄCHLER *et al.*, 2013; WINTER *et al.*, 2009).

A Instrução Normativa nº 9, de 8 de abril de 2009, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), instruiu os procedimentos de controle da *L. monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo, com o objetivo de monitorar e assegurar a inocuidade desses produtos em relação ao patógeno, e esses procedimentos se aplicam aos estabelecimentos que fabricam produtos de origem animal (BRASIL, 2009). É preocupante a presença de *Listeria* no ambiente de processamento de carnes, pois são capazes de proliferar sob condições de frio em produtos embalados em atmosfera de vácuo ou gás modificado. Isso é de especial interesse em produtos embalados com um prazo de validade longo, em que o crescimento de *Listeria monocytogenes* pode ocorrer durante o armazenamento (SAGOO *et al.*, 2007). Para Luber *et al.* (2011), os produtos cárneos fatiados, especialmente aqueles fatiados nos estabelecimentos de venda, são os alimentos com maior risco de contaminação por *L. monocytogenes*.

É importante garantir as características de identidade e qualidade do produto (BRASIL, 2000) mediante os cuidados nas etapas de elaboração, distribuição e conservação, pois os produtos cárneos são alimentos perecíveis e devem ser devidamente conservados e armazenados em condições que retardem a atividade microbiológica deteriorante (LIDON;

SILVESTRE, 2007). O controle dos parâmetros técnicos de processo garante um produto seguro, como por exemplo a etapa de cozimento da mortadela, um tratamento térmico eficiente que reduz a níveis aceitáveis a presença de microrganismos contaminantes e deteriorantes de interesse da saúde pública (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

De acordo com Silva *et al.* (2004), os alimentos com muita manipulação, como no caso dos embutidos, são frequentemente responsáveis pela veiculação de agentes de enfermidades transmitidas por alimentos. Dessa forma, as condições de higiene do meio ambiente, dos manipuladores e dos objetos e utensílios são fatores determinantes à presença desses agentes bacterianos nos alimentos (CHAVES *et al.*, 2006). A temperatura de armazenamento também é considerada um ponto crítico para a qualidade dos produtos cárneos.

Os produtos à base de carne são comumente considerados uma das principais fontes de infecção humana causada por *L. monocytogenes* (LI *et al.*, 2018a; LIU *et al.*, 2020). O nitrito, conservante utilizado em produtos cárneos curados, contribui para a segurança microbiológica, para a cor rósea dos produtos, para o desenvolvimento de sabor e extensão da vida útil (HONIKEL *et al.*, 2014). Muitos estudos mostram que o nitrito exerce efeito sobre o crescimento de *L. monocytogenes* (KING *et al.*, 2016; XI *et al.*, 2012).

No Brasil é permitida a utilização de nitrato de sódio ou potássio, associados ou não a nitrito de sódio ou potássio, com quantidade residual máxima de 300 mg/kg de produtos cárneos curados. O nitrito de sódio ou potássio, utilizados de forma isolada ou combinados, possuem como limite residual máximo permitido 150 mg/kg em produtos cárneos curados (BRASIL, 2006). Apesar da utilização de sais de cura em embutidos cárneos, a estabilidade microbiológica e a segurança desses produtos são resultado da ação combinada de vários fatores de conservação (LEISTNER, GOULD, 2002). Os principais fatores, que atuam de forma sinérgica e controlam o desenvolvimento microbiológico nos embutidos, são a concentração da salmoura; o pH do produto; o nitrito adicionado ou residual; a severidade do tratamento pelo calor; a temperatura de estocagem; a natureza da microbiota competitiva e outros aditivos (SANTOS, 2008).

Produtos cárneos curados cozidos embutidos ou não, *ready-to-eat*, como presuntos cozidos, apresuntados e mortadelas, são consumidos sem nenhum tratamento adicional para descontaminação. Trata-se de alimentos caracterizados por uma intensa manipulação durante o processo de produção, com alta probabilidade de contaminação cruzada no varejo ou na casa dos consumidores, o que aumenta o risco de contaminação por microrganismos, como a *Listeria sp.* (FARBER; PAGOTTO; SCHERF, 2007; ZHANG *et al.*, 2018).

Em um estudo realizado na China, para avaliar presença ou ausência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos cozidos, verificou-se contaminação em 4,23% das

amostras analisadas no ano de 2017 e 4,17% das amostras avaliadas em 2018 (SUN *et al.*, 2020). Entre 2011 e 2016, estima-se que a prevalência geral de *L. monocytogenes* em produtos de carne e aves (incluindo produtos crus e prontos para consumo) foi a mais alta na China (8,9%) entre os diferentes produtos alimentícios avaliados (LI *et al.*, 2018b). Muitos trabalhos evidenciam os esforços de pesquisadores na busca de soluções para inibir o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em produtos cárneos fatiados. Lubber *et al.* (2011) são de opinião que muitas pesquisas ainda são necessárias para aumentar o número e a variedade de opções tecnológicas para prevenção e controle do microrganismo em alimentos prontos para o consumo.

2.3 Óleos essenciais

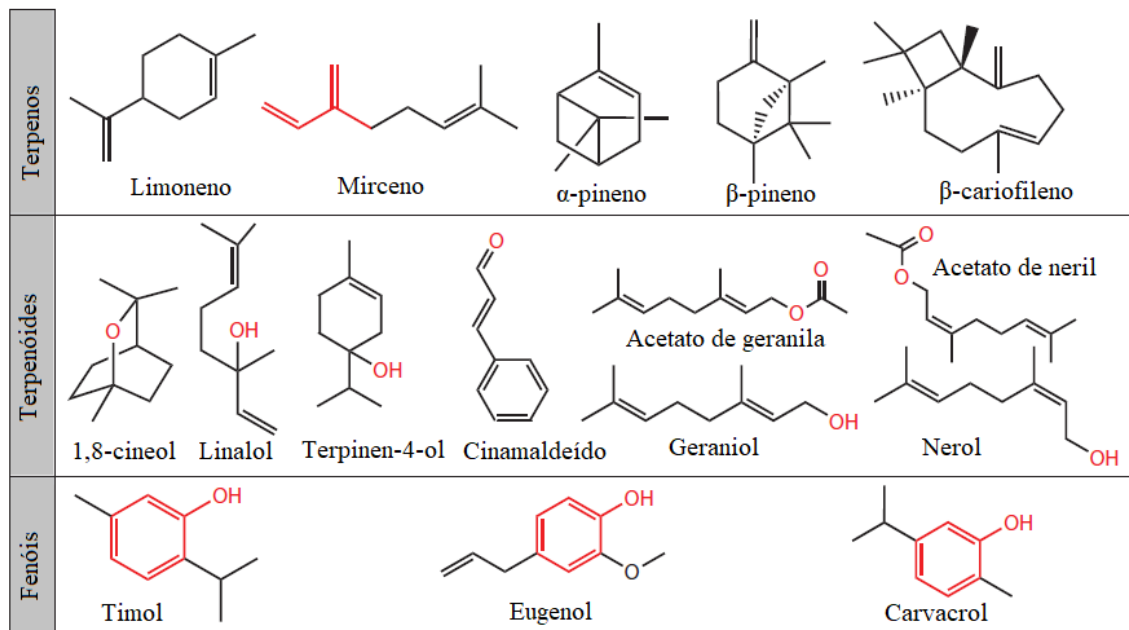
Óleos essenciais são metabólitos secundários das plantas, obtidos a partir da glicose, formados por uma mistura complexa de substâncias orgânicas lipofílicas e voláteis. Nessas misturas encontram-se de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações, geralmente havendo dois a três constituintes em maior concentração (componentes majoritários), que em geral determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais, e outros em concentrações traço (BALDWIN, 2010).

São produzidos por todos os órgãos dos vegetais e armazenados em células secretoras especializadas e são constituídos principalmente por terpenos, terpenoides (terpenos oxigenados) e fenóis (RAO; CHEN; McCLEMENTS, 2019) (FIGURA 3). Além disso, vários compostos contendo nitrogênio e enxofre, que conferem atributos sensoriais característicos, são também constituintes importantes de muitos óleos essenciais (LAWAL; OGUNWANDE, 2013).

Os terpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais. Derivam de numerosas unidades de isoprenos (C_5H_8) ligadas em uma cadeia cíclica ou acíclica. Com base no número de unidades de isopreno na molécula, os terpenos podem ser classificados como monoterpenos, sesquiterpenos ou diterpenos. Os monoterpenos consistem em duas unidades de isopreno e têm a fórmula $C_{10}H_{16}$. Exemplos de monoterpenos incluem limoneno, mirceno, α -pineno e β -pineno, que podem ser encontrados principalmente em óleos cítricos, alecrim, sálvia e capim-limão. Os terpenoides correspondem a uma classe grande e diversificada de compostos naturais em óleos essenciais que também são derivados da unidade de isopreno. Mas, ao contrário dos terpenos, as unidades de isopreno nos terpenoides são montadas e modificadas de muitas maneiras, como a adição ou remoção de grupos metil ou a adição de átomos de oxigênio para

a unidade de isopreno (BAKKALI *et al.*, 2008). Da mesma forma, os terpenoides podem ser classificados como monoterpênicos, sesquiterpênicos ou diterpênicos, com base no número de unidades de isopreno presentes. Eles também podem ser classificados de acordo com o número de estruturas cíclicas que contêm. Exemplos de terpenoides antimicrobianos comuns são 1,8-cineol, linalol, cânfora, acetato de geranyl, acetato de neril, geraniol, nerol, terpinen-4-ol e cinamaldeído. Os fenóis referem-se a um grupo de compostos químicos que consistem em um grupo hidroxila (-OH) ligado diretamente a um anel aromático (C₆). Exemplos de fenóis incluem timol, eugenol e carvacrol, que podem ser encontrados no tomilho, cravo, canela e orégano (RAO; CHEN; McCLEMENTS, 2019).

Figura 3 - Estrutura química dos principais constituintes antimicrobianos (terpenos, terpenoides e fenóis) em óleos essenciais.



Fonte: Adaptado de Rao, Chen e McClements (2019).

Os óleos essenciais podem ser extraídos por diferentes técnicas, sendo a hidrodestilação e destilação por arraste à vapor as técnicas mais utilizadas na indústria de alimentos. São substâncias não necessariamente essenciais à vida das plantas, mas garantem vantagens de sobrevivência e perpetuação da espécie em seu ecossistema. No Quadro 1 encontra-se exemplos de plantas produtoras de óleos essenciais com seus componentes principais.

Quadro 1 - Componentes principais de alguns óleos essenciais.

Componentes	Exemplos	Plantas
Terpenos	Pineno, canfeno, felandreno, limoneno, Mirceno	Coníferas, umbelíferas, frutas cítricas
Sesquiterpenos	Cardineno, selineno, cariofileno, cedrene, camazuleno	Aipo, camomila verdadeira
Fenóis aromáticos	Carvacrol, eugenol, timol, guaiacol	Canela, alecrim, hortelã, funcho, orégano, tomilho, cravo
Álcoois aromáticos	Terpineol, mentol, cedrol, carotol	Limão, lavanda, sândalo
Óxidos aromáticos	1,8-cineol (eucaliptol), óxido de linalol, mentofurano, ascaridol, safrol	Cardamomo, hortelã, eucalipto
Éter aromático	Metil chavicol, salicilato de metila, cinamato de metila, metileugenol, transanetol	Manjeriço, cravo, louro
Ésteres terpenoides e não terpenoides	Acetato de linalila, acetato de bornil, acetato de cinamila, acetato de terpenila, acetato de nerila	Hortelã-pimenta, cravo, canela
Aldeídos terpenoides e aromáticos	Benzaldeído, vanilina, neral, citral	Cominho, anis, funcho, pimenta chinesa
Cetonas aromáticas	Carvona, tujona, cânfora, verbena, fenchone	Alecrim, artemísia, endro (<i>Anethum graveolens</i>)

Fonte: Adaptado de Reyes-Jurado *et al.* (2015).

Nas plantas, o conjunto de metabólitos secundários é resultado do balanço entre a formação e eliminação desses compostos durante o crescimento. A composição química de amostras de um óleo essencial extraído da mesma espécie vegetal pode ser altamente variável, pois depende de fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores intrínsecos que podem influenciar a produção dos óleos essenciais pelas plantas e a variabilidade da composição desses óleos verificam-se variabilidade genética, parte da planta que produz o óleo essencial, estágio de desenvolvimento e idade da planta. Em relação aos fatores extrínsecos cita-se localização

geográfica e tipo de solo, mês de colheita e horário do dia, precipitação e quantidade de água disponibilizada à planta, interações bióticas, irradiação luminosa, temperatura, tratamento pós-colheita e técnica de extração utilizada (GONÇALVES, 2015).

Os óleos essenciais possuem diversas propriedades, como atividade antimicrobiana, anticâncer, inseticida, antiparasitária, antioxidante, dentre outras, que os tornam de grande importância para as indústrias alimentícia, farmacêutica e agropecuária. Óleos essenciais ou seus constituintes possuem largo espectro farmacológico, sendo utilizados como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, antiespasmódicos e remédios para anestesia local, funcionando também como antihelmínticos e antiprotozoários (BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

2.3.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Carne e produtos à base de carne, devido ao alto nível de nutrientes, pH (5,5-7,0) e alta atividade de água, oferecem um ambiente propício para o crescimento de bactérias (DAVE; GHALY, 2011), portanto esses produtos devem ser manuseados e preservados corretamente.

O uso de antimicrobianos sintéticos em alimentos tem recebido muitas críticas devido à sua toxicidade, efeitos colaterais e segurança (BAHURMIZ *et al.*, 2020). Nos últimos anos, a demanda por antimicrobianos naturais tem aumentado constantemente, no intuito de substituir completa ou parcialmente aditivos sintéticos (JAYASENA; JO, 2013; PISOSCHI *et al.*, 2018). Os produtos de origem vegetal utilizados tradicionalmente como conservantes de alimentos ganharam atenção devido ao potencial benéfico à saúde e à segurança em comparação com agentes sintéticos (PANDEY *et al.*, 2017; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Muitas substâncias de origem vegetal, particularmente óleos essenciais e seus compostos ativos, derivados de ervas e especiarias, inibiram com sucesso o crescimento de microrganismos importantes associados à deterioração e segurança dos alimentos (EL-BAROTY *et al.*, 2010; FAYYAZ; SANI; NAJAFI, 2015; JU *et al.*, 2018; TREMONTE *et al.*, 2016).

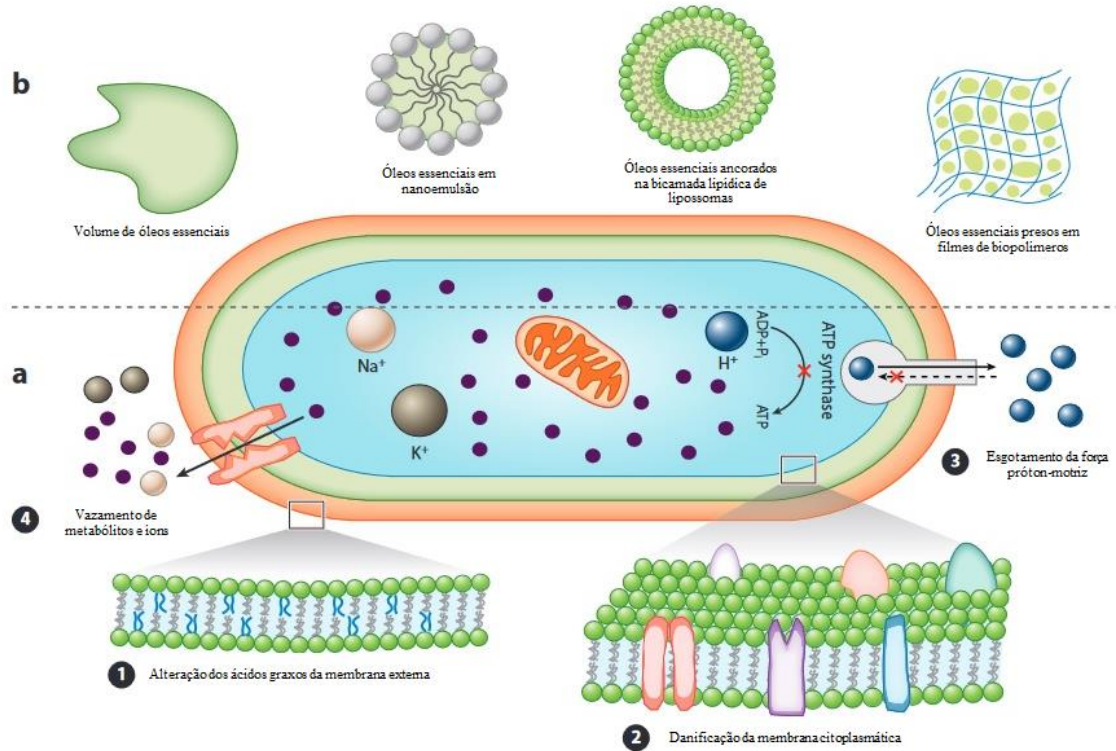
Estudos recentes demonstraram que alguns óleos essenciais como os de alho, canela, tomilho, orégano, cravo, manjeriço, coentro, cítricos, eucalipto, gengibre, alecrim e hortelã-pimenta, entre outros, têm atividade antimicrobiana contra bactérias, leveduras e fungos (DÁVILA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2020). Os óleos essenciais da maioria das plantas são ricos em fenóis de reconhecida atividade antimicrobiana, como carvacrol, eugenol e timol, que ajudam a aumentar o prazo de validade de uma grande variedade de alimentos (MURIEL-GALET *et al.*, 2015), devido ao fato de alterar a bicamada de fosfolipídios da membrana celular e afetar

negativamente os sistemas enzimáticos e o material genético dos microrganismos (BEZIC; DUNKIC; VUKO, 2013).

Os óleos essenciais são constituídos por muitos compostos voláteis diferentes, sendo difícil correlacionar a atividade antimicrobiana com um único composto ou classes de compostos (RAMOS *et al.*, 2013). A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode estar relacionada com a composição dos óleos voláteis de cada planta, com a configuração estrutural dos compostos constituintes dos óleos, com seus grupos funcionais e com possíveis interações sinérgicas entre seus componentes (DORMAN; DEANS, 2000; HINNEBURG; DAMIEN DORMAN; HILTUNEN, 2006), logo, a atividade antimicrobiana não é atribuível a um mecanismo específico, podendo haver vários alvos na célula (FIGURA 4).

Segundo Burt (2004), compostos naturais podem agir sobre a célula bacteriana desintegrando a membrana citoplasmática, desestabilizando a força próton-motriz, fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulando o conteúdo da célula. O caráter hidrofílico ou hidrofóbico dos óleos essenciais e a proporção dos principais componentes em cada um deles (terpenoides, fenólicos e compostos aldeídos) relacionam-se com o tipo de microrganismo que eles podem inibir ou inativar (BAKKALI *et al.*, 2008; FISHER; PHILLIPS, 2008). A estrutura química dos componentes dos óleos essenciais afeta seu modo de ação como antimicrobianos. Os óleos essenciais podem alterar os lipídios da membrana citoplasmática microbiana, produzindo perda de sua impermeabilidade a prótons e íons de maior tamanho causando distúrbios no transporte de elétrons, desnaturação de proteínas, desidratação e lise celular (BORGES *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2011; DÁVILA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2020).

Figura 4 - a. Mecanismos comuns propostos de ação e locais alvo de óleos essenciais ou sistemas de entrega de óleos essenciais em células bacterianas. b. Óleos essenciais e diferentes tipos de sistemas de entrega de óleos essenciais, incluindo nanoemulsão, lipossomas e filmes de biopolímero.



Legenda: 1. Alteração dos ácidos graxos da membrana externa; 2. Danos à membrana citoplasmática; 3. Depleção da força próton-motriz; 4. Vazamento de metabólitos e íons.

Fonte: Adaptado de Rao, Chen e McClements (2019).

Alguns autores (DOLÇA *et al.*, 2015; YEON-JI *et al.*, 2015) sugerem a adição de óleos essenciais em alimentos para atuarem como conservantes naturais. O maior interesse na área de aplicação de extratos e óleos essenciais de plantas está na inibição do desenvolvimento e redução do número de patógenos mais importantes de origem alimentar, tais como *Salmonella* sp., *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* (BURT, 2004). Segundo Duarte (2006), extratos e óleos essenciais de plantas mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microrganismos. O direcionamento para uma utilização adequada do óleo essencial pode estar intimamente relacionado com a sua composição (RIBEIRO, 2011). Por isso, determinar a composição química do óleo essencial é importante para aproveitar suas potencialidades e valorizá-lo comercialmente, visto que a caracterização está diretamente ligada com o seu potencial antimicrobiano (PORTE; GODOY, 2001).

2.4 Nanoemulsões

Estratégias visando aperfeiçoar as características físico-químicas de substâncias bioativas envolvem também inovações tecnológicas, dentre as quais destaca-se a nanotecnologia. As nanoemulsões são dispersões de óleo em água, estando as gotículas do óleo estabilizadas por tensoativos na fase aquosa externa. As gotículas apresentam normalmente tamanhos de 10 a 100 nm (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; GUPTA *et al.*, 2016; MEI *et al.*, 2003; SHAFIQ *et al.*, 2007). Alguns estudos relatam variações diferentes para o tamanho das nanoemulsões, como por exemplo em torno de 20 a 500 nm, sendo translúcidas quando o tamanho das gotículas é inferior a 200 nm ou leitosa quando o tamanho está entre 200 e 500 nm. Também são referidas na literatura como miniemulsões, emulsões ultrafinas, microemulsões instáveis e submicroemulsões (OLIVEIRA, 2008).

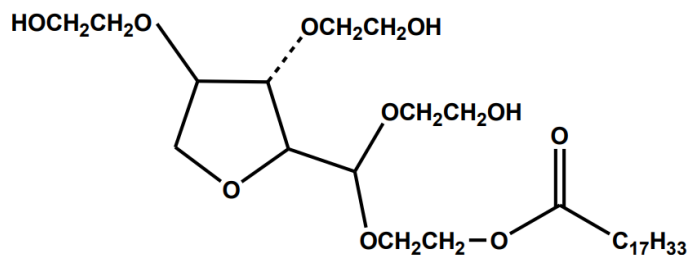
Recentemente, as pesquisas realizadas com nanoemulsões estão aumentando, devido ao fato de existirem poucos trabalhos em que óleos essenciais tenham sido utilizados, por sua baixa solubilidade em água. De acordo com Tian *et al.* (2015), as aplicações de óleos essenciais naturais como aditivo alimentar e conservante verde são limitadas nos sistemas alimentares, devido à sua grande instabilidade contra condições ambientais, incluindo temperatura, luz, ar e estabilidade contra a sedimentação. Além disso, outra desvantagem na utilização de óleos essenciais é a modificação das características sensoriais do alimento, como aroma e sabor. Essa limitação pode ser superada pela produção de emulsões ou nanoemulsões (CHANG; McSBOROUGH; McCLEMENTS, 2012; ZIANI *et al.*, 2011). As nanoemulsões apresentam alta retenção de compostos voláteis, aumentam a solubilidade e a biodisponibilidade dos óleos essenciais e limitam sua oxidação durante o armazenamento (MAHFOUDHI; KSOURI; HAMDI, 2016), apresentam melhores características físico-químicas e estabilidade, além de aumentar suas atividades biológicas, devido à melhor distribuição dos óleos em determinadas superfícies (AHMAD *et al.*, 2014; MOGHIMI *et al.*, 2016; VALIZADEH *et al.*, 2018).

Segundo Oliveira *et al.* (2014), os óleos essenciais bioativos que são voláteis e sensíveis à degradação são adequados para a formação de nanoemulsões. Esse sistema apresenta vantagens em relação às emulsões convencionais por se tratar de um sistema de distribuição coloidal devido ao seu menor tamanho de partícula, grande área superficial e liberação lenta de compostos (WANG *et al.*, 2007). As nanoemulsões podem apresentar transparência óptica, funcionalidade aprimorada e estabilidade física, o que as tornaria muito atraentes para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia (ASSIS *et al.*, 2012).

As nanoemulsões são categorizadas como metaestáveis, ou seja, estáveis por um longo período de tempo. A inerente estabilidade das nanoemulsões está diretamente relacionada ao processo de preparo que confere estabilização estérica, quando se emprega tensoativos não-iônicos e/ou polímeros; e ao diminuto tamanho dos glóbulos, cujo movimento browniano diminui a atuação das forças gravitacionais prevenindo assim fenômenos de instabilidade (ASSIS *et al.*, 2012; OLIVEIRA, 2008).

Um tipo de tensoativo muito utilizado é o tween 80 (polissorbato 80), devido ao baixo custo e toxicidade reduzida. É um tensoativo não-iônico, proveniente do sorbitano polietoxilato e ácido oleico (FIGURA 5). A característica hidrofílica da cadeia de polioxiétileno faz do tween, tensoativo hidrofílico, geralmente solúvel ou dispersivo em água, empregado na obtenção de nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A) (BRAUN *et al.*, 2015; WEISZHÁR *et al.*, 2012).

Figura 5 - Estrutura química do tensoativo Tween 80.



Fonte: Hillgren, Lindgren e Aldén (2002).

Para obtenção de condições ótimas em que os sistemas de emulsão estáveis são formados, a nanoemulsão pode ser fabricada usando abordagens de alta ou baixa energia. As abordagens de alta energia estão associadas a equipamentos especializados para interromper e intercalar as fases de óleo e água, formando pequenas gotículas (ABBAS *et al.*, 2013). As técnicas mais utilizadas são homogeneização de alta pressão, microfluidização de alta pressão, homogeneização-evaporação e ultrassom (ANARJAN *et al.*, 2010; CHEONG *et al.*, 2008; HUANG; YU; RU, 2010; KENTISH *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2011; WEISS; TAKHISTOV; McCLEMENTS, 2006). Em contrapartida, abordagens de baixa energia não requerem equipamentos especiais, pois as propriedades do óleo e do surfactante formam espontaneamente nanoemulsões alterando as condições do sistema, como temperatura ou outras condições (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; SOLANS *et al.*, 2005). Dentre os métodos de baixa energia

destacam-se emulsificação espontânea, emulsificação por inversão de fases e emulsificação por temperatura de inversão de fases (LANDRY *et al.*, 2014).

A técnica de ultrassom tem sido bastante utilizada na produção de emulsões (ABBAS *et al.*, 2013; ABISMAÏL *et al.*, 1999; BECHER, 1965; BROWN; GOODMAN, 1965; SILVA; ROSA; MEIRELES, 2015) com diversos benefícios em relação aos métodos convencionais de emulsificação, dentre eles: a formação de gotas com tamanho reduzido e estreita distribuição de tamanho, maior estabilidade cinética, baixo custo de produção, facilidade de operação, limpeza e controle do dispositivo (ABBAS *et al.*, 2013).

A energia ultrassônica tem sido descrita como um eficiente modo para melhorar o desempenho de diferentes processos, como extração de compostos orgânicos e inorgânicos, homogeneização, dispersão de suspensões, dentre outros (NASCENTES *et al.*, 2001). Um aparato ultrassônico comum usado na produção de emulsões é constituído de um gerador, um transdutor, um amplificador e uma sonda. O gerador produz energia elétrica que é convertida pelo transdutor em vibrações mecânicas em uma frequência similar à da corrente elétrica. Essas vibrações mecânicas são amplificadas e propagadas através de uma sonda, na forma de ondas acústicas.

O processo de emulsificação por ultrassom ocorre em dois estágios. No primeiro estágio ocorre a geração de gotas primárias, devido a um campo acústico que produz ondas interfaciais, gerando uma instabilidade que causa a erupção da fase oleosa na fase aquosa na forma de gotas. O segundo estágio envolve a quebra das gotas primárias através da cavitação acústica, que exerce uma alta turbulência e força cisalhante local, produzindo violentas e assimétricas implosões das bolhas, que por consequência formam microjatos que também auxiliam na quebra das gotas primárias produzindo gotas de tamanho nanométrico (LI; FOGLER, 1978).

O ultrassom de baixa frequência e alta potência, comumente conhecido como ultrassom de potência, ganhou um interesse significativo ao longo da última década, pois possui uma ampla gama de usos dentro de uma grande variedade de setores, tornando-se uma tecnologia de processamento versátil, para a alteração, geração e modificação de microestruturas. Como consequência, devido à cavitação ultrassônica, é possível aumentar a área superficial específica em sistemas de emulsão para a geração de gotículas de tamanho nanométrico (McCLEMENTS, 1995; O'BRIEN JÚNIOR, 2007).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, S. *et al.* An overview of ultrasound-assisted food-grade nanoemulsions. **Food Engineering Reviews**, [New York], v. 5, p. 139–157, May 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12393-013-9066-3>. Acesso em: 10 jun. 2020.
- ABISMAÏL, B. *et al.* Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, [Amsterdam], v. 6, n. 1–2, p. 75-83, Mar. 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1350417798000273>. Acesso em: 10 jun. 2020.
- AHMAD, N. *et al.* Influence of nonionic branched-chain alkyl glycosides on a model nano-emulsion for drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [Amsterdam], v. 115, p. 267-274, Mar. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24384142/>. Acesso em: 12 jun. 2020.
- ANARJAN, N. *et al.* Effect of processing conditions on physicochemical properties of astaxanthin nano dispersions. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 123, n. 2, p. 477-483, Nov. 2010. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103222046>. Acesso em: 13 jun. 2020.
- ANTON, N.; BENOIT, J.-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nanoemulsion templates, a review. **Journal of Controlled Release**, [Amsterdam], v. 128, n. 3, p. 185-199, June 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18374443/>. Acesso em: 20 jun. 2020.
- ASSIS, L. M. *et al.* Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, abr./jun. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjft/a/LKt5hYRHMhgQrzHZ4WdWxCp/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 18 de jun. de 2021.
- AUGUSTIN, J.-C. *et al.* Design of challenge testing experiments to assess the variability of *Listeria monocytogenes* growth in foods. **Food Microbiology**, [London], v. 28, n. 4, p. 746-754, June 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21511135/>. Acesso em: 10 set. 2020.
- AUGUSTIN, J.-C. *et al.* Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. **Journal of Applied Microbiology**, [Malden], v. 99, n. 5, p. 1019-1042, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16238733/>. Acesso em: 20 ago. 2020.
- BAHURMIZ, O. M. *et al.* Antimicrobial activity of selected essential oils on *Pseudomonas* species associated with spoilage of fish with emphasis on cinnamon essential oil. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, [Binghamton], v. 29, n. 8, p. 789-800, Aug. 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10498850.2020.1800882>. Acesso em: 16 de jan. 2021.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, [Kidlington], v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691507004541>. Acesso em: 30 set. 2020.

BALDWIN, I. T. Plant volatiles. **Current Biology**, [Cambridge], v. 20, n. 9, p. 392-397, May 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20462477/>. Acesso em: 02 de out. 2020.

BARROS, M. de A. F. ***Listeria monocytogenes***: Ocorrência na carne bovina, identificação dos principais pontos de contaminação em plantas de processamento e relação com a microbiota acompanhante. 2005. 152 p. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, [Basel], v. 17, n. 4, p. 3989-4006, Apr. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22469594/>. Acesso em: 03 nov. 2020.

BEAUFORT, A. *et al.* EURL ***Lm Technical Guidance Document for conducting shelf-life studies on Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods***. France: Maisons-Alfort, 2014. 46 v. Disponível em: [https://www.fsai.ie/uploadedFiles/EURL%20Lm_Technical%20Guidance%20Document%20Lm%20shelf-life%20studies_V3_2014-06-06%20\(2\).pdf](https://www.fsai.ie/uploadedFiles/EURL%20Lm_Technical%20Guidance%20Document%20Lm%20shelf-life%20studies_V3_2014-06-06%20(2).pdf). Acesso em: 13 nov. 2020.

BECHER, P. **Emulsions, theory and practice**. 2nd ed. New York: Reinhold Publishing, 1965.

BEGLEY, M.; HILL, C. Stress adaptation in foodborne pathogens. **Annual Review of Food Science and Technology**, [Palo Alto], v. 6, p. 191-210, Feb. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25665171/>. Acesso em: 23 fev. 2021.

BERRANG, M. E. *et al.* Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a poultry further processing facility and from fully cooked product. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 65, n. 10, p. 1574-1579, Oct. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12380741/>. Acesso em: 10 mar. 2021.

BERESFORD, M. R.; ANDREW, P. W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, [Malden], v. 90, n. 6, p. 1000-1005, June 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11412331/>. Acesso em: 10 mar. 2021.

BERSOT, L. dos S. *et al.* Behaviour of *L. monocytogenes* in sliced, vacuum-packed mortadella. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 514-516, Aug. 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/8M7pwpXVkg9ywt4K8fNhJPf/?lang=en&format=pdf>. Acesso em: 12 mar. 2021.

BEZIC, N.; DUNKIC, V.; VUKO, E. **Antiphytoviral activity of essential oils of some lamiaceae species and there most important compounds on CMV and TMV in:** microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. *In:* MÉNDEZ-VILAS, A. (ed.). 2nd ed. Badajoz: Formatex Research Center, 2013. p. 982–988.

BLUM-MENEZES, D. *et al.* Listeriosis in the far South of Brazil: neglected infection? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 46, n. 3, p. 381-383, May/June 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/dWvrcGRG5ShmkjLZ493TWv/?lang=en>. Acesso em: 07 abr. 2021.

BORGES, A. R. *et al.* Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, [San Diego], v. 132, n. 2, p. 123-128, Oct. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22771867/>. Acesso em: 03 jul. 2021.

BORUCKI, M. K. *et al.* Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, [Washington], v. 69, n. 12, p. 7336–7342, Dec. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14660383/>. Acesso em: 13 ago. 2020.

BOUCHEMAL, K. *et al.* Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, [Amsterdam], v. 280, n. 1-2, p. 241–251, Aug. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15265563/>. Acesso em: 21 jun. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2000. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>. Acesso em: 31 jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa Nº 51 de 29 de dezembro de 2006**. Adota o Regulamento Técnico de Atribuições de Aditivos e seus Limites de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos. Brasília, 2006. Disponível em: https://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-51-2006_76049.html. Acesso em: 22 set. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 9, de 8 de abril de 2009**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/control-de-patogenos/arquivos-control-de-patogenos/in_09-_de_8_de_abril_de_2009.pdf. Acesso em: 11 jul. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa nº 161, de 01 de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. **Diário Oficial [da] União**, nº 126, Ministério da Saúde, Brasília, DF, 06 jul. 2022. Seção 1. Disponível em: <https://www.jusbrasil.com.br/diarios/1191461858/dou-secao-1-06-07-2022-pg-235>. Acesso em: 13 jul. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 15 fev. 2019. Disponível em:

<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>. Acesso em: 04 maio 2020.

BRAUN, A. C. *et al.* Predicting critical micelle concentration and micelle molecular weight of polysorbate 80 using compendial methods. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [Amsterdam], v. 94, p. 559-568, Aug. 2015. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0939641114003701>. Acesso em: 18 ago. 2021.

BROWN, B.; GOODMAN, J. E. **High-intensity ultrasonics**. London: Iliffe Books Ltd, 1965.

BROWNE, N.; DOWDS, B. C. A. Acid stress in the food pathogen *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, [Malden], v. 92, n. 3, p. 404–414, Mar. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11872115/>. Acesso em: 13 mar. 2021.

BROWNE, N.; DOWDS, B. C. A. Heat and salt stress in the food pathogen *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, [Malden], v. 91, n. 6, p. 1085–1094, Dec. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11851817/>. Acesso em: 13 mar. 2021.

BUCHANAN, R. L. *et al.* A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, [Amsterdam], v. 75, p. 1–13, May 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516306892>. Acesso em: 11 maio 2022.

BURGESS, C. M. *et al.* The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 221, p. 37–53, Mar. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816051530194X>. Acesso em: 10 maio 2022.

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: 03 abr. 2021.

CAMARGO, R. J. **Ação de bacteriocinas de bactérias lácticas no controle de *Listeria monocytogenes* e no aumento da vida de prateleira de mortadela fatiada**. 2011. 94 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Listeria outbreaks**. 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>. Acesso em: 03 jul. 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Multistate outbreak of listeriosis linked to packaged salads produced at Springfield, Ohio dole processing facility (Final Update)**. 2016. Disponível em: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html>. Acesso em: 03 jul. 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Multistate outbreak of listeriosis**. MMWR Morbidity and mortality weekly report, 2000. 49 v. p. 1129–1130. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4950a1.htm>. Acesso em 03 jul. 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Public health dispatch: Outbreak of listeriosis—northern United States**. MMWR Morbidity and mortality weekly report, 2002. 51 v. p. 950–951. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5142a3.htm>. Acesso em: 03 jul. 2020.

CHANG, Y.; McSBOROUGH, L.; McCLEMENTS, D. J. Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nano emulsions: influence of ripening inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [Washington], v. 60, n. 48, p. 12056–12063, Nov. 2012. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf304045a>. Acesso em: 22 fev. 2022.

CHAVANT, P.; HÉBRAUD, M.; MARTINIE, B. **Formation d'un biofilm de *Listeria monocytogenes* à 20°C sur de l'acier inoxydable**. American Society of Microbiology - Microbe Library Visual Resources. INRA, site de Theix, 2002.

CHAVES, J. B. P. *et al.* **Boas Práticas de Fabricação (BPF) para restaurantes, lanchonetes e outros serviços de alimentação**. Viçosa: Editora UFV, 2006. 68 p.

CHEONG, J. N. *et al.* α -Tocopherol nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 89, n. 2, p. 204-209, Nov. 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877408001982>. Acesso em: 04 jun. 2020.

CHIANG, M.-L.; CHOU, C.-C. Expression of superoxide dismutase, catalase and thermostable direct hemolysin by, and growth in the presence of various nitrogen and carbon sources of heat-shocked and ethanol-shocked *Vibrio parahaemolyticus*. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 121, n. 3, p. 268–74, Feb. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18158197/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

CHIANG, M.-L.; HO, W.-L.; CHOU, C.-C. Ethanol shock changes the fatty acid profile and survival behavior of *Vibrio parahaemolyticus* in various stress conditions. **Food Microbiology**, [London], v. 25, n. 2, p. 359–365, Apr. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18206778/>. Acesso em: 12 nov. 2020.

CHIANG, M.-L.; HO, W.-L.; CHOU, C.-C. Response of *Vibrio parahaemolyticus* to ethanol shock. **Food Microbiology**, [London], v. 23, n. 5, p. 461–467, Aug. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16943038/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

- CHIARINI, E. *Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: Marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação. 2007. 141 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- CORNU, M. *et al.* Modeling microbial competition in food: application to the behaviour of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. **Food Microbiology**, [London], v. 28, n. 4, p. 639-647, June 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21511123/>. Acesso em: 12 mar. 2021.
- COSTA, A. R. T. *et al.* Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 240-245, jan. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/qnJd5sDFvnHS6yv5nGWRf4g/?lang=pt>. Acesso em: 04 abr. 2021.
- CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 2, p. 195-206, abr./jun. 2008. Disponível em: Acesso em: 20 mar. 2021.
- DAVE, D.; GHALY, A. E. Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, [Dubai], v. 6, n. 4, p. 486-510, Nov. 2011. Disponível em: <https://thescipub.com/abstract/ajabssp.2011.486.510>. Acesso em: 12 fev. 2022.
- DÁVILA-RODRÍGUEZ, M. *et al.* Essential oils microemulsions prepared with high-frequency ultrasound: physical properties and antimicrobial activity. **Journal of Food Science and Technology**, [Malden], v. 57, n. 11, p. 4133–4142, Apr. 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-020-04449-8>. Acesso em: 04 abr. 2021.
- DE NOORDHOUT, C. M. *et al.* The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, [New York], v. 14, n. 11, p. 1073–1082, Nov. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25241232/>. Acesso em: 12 mar. 2021.
- DEVLIGHERE, F. *et al.* Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. **Food Microbiology**, [London], v. 18, n. 1, p. 53-66, Feb. 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002000903782>. Acesso em: 12 mar. 2021.
- DOLÇA, C. *et al.* Microencapsulation of rosemary essential oil by co-extrusion/gelling using alginate as a wall material. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, [China], v. 5, n. 3, p. 121–130, Sept. 2015. Disponível em: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=59051>. Acesso em: 04 abr. 2021.
- DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, [Malden], v. 88, n. 2, p. 308-316, Feb. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10736000/>. Acesso em: 03 nov. 2020.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**, Campinas, n. 7, p. 1-16, out. 2006. Disponível em: <https://www.ufpb.br/nepfhf/contents/documentos/artigos/fitoterapia/atividade-antimicrobiana-de-plantas>. Acesso em: 03 nov. 2020.

DUSSAULT, D.; VU, K. D.; LACROIX, M. Development of a model describing the inhibitory effect of selected preservatives on the growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. **Food Microbiology**, [London], v. 53, p. 115-121, Feb. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26678138/>. Acesso em: 12 mar. 2021.

EL-BAROTY, G. S. *et al.* Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. **African Journal of Biochemistry Research**, [Lagos], v. 4, n. 6, p. 167–174, June 2010. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJBR/article-full-text-pdf/8D4DEA111465>. Acesso em: 06 jun. 2021.

ESBELIN, J.; SANTOS, T.; HEBRAUD, M. Desiccation: An environmental and food industry stress that bacteria commonly face. **Food Microbiology**, [London], v. 69, p. 82–88, Feb. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002017300631>. Acesso em: 06 jul. 2022.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **EFSA Journal**, [Parma], v. 15, n. 12, p. 5077, Dec. 2017. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/pt/efsajournal/pub/5077>. Acesso em: 16 jun. 2021.

EUZÉBY, J. P. **Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire**. 2000. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/html>. Acesso em: 28 fev. 2018.

EVANS, E. W.; REDMOND, E. C. Laboratory re-enactment of storage practices of older adults to determine potential implications for growth of *Listeria monocytogenes*. **Food Protection Trends**, [Des Moines], v. 39, n. 2, p. 225-236, May 2019. Disponível em: <https://www.foodprotection.org/publications/food-protection-trends/archive/2019-05-laboratory-re-enactment-of-storage-practices-of-older-adults-to-determine-potential-implicat/>. Acesso em: 06 jul. 2022.

FAGERLUND, A. *et al.* Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, [Washington], v. 83, n. 17, Aug. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28667108/>. Acesso em: 26 jun. 2022.

FAI, A. E. C. *et al.* *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 657-662, fev. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/ZDG8WySTmPzv67vyqrSjsnC/?lang=pt>. Acesso em: 12 maio 2020.

FARBER, J.; PAGOTTO, F.; SCHERF, C. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. (eds.). **Listeria, Listeriosis, and Food Safety**. New York: Marcel Dekker, 2007. p. 503–570.

FAYYAZ, N.; SANI, M. A.; NAJAFI, N. M. Antimicrobial activity and composition of essential oil from *Echinophora platyloba*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, [United Kingdom], v. 18, n. 5, p. 1157–1164, Oct. 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2014.971064>. Acesso em: 04 abr. 2021.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends in Food Science & Technology**, [London], v. 19, n. 3, p. 156–164, Mar. 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224407003548>. Acesso em: 04 abr. 2021.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Commercial Deli Slicer Inspection Tips for Food Safety Professionals**. 2022. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/retail-food-industryregulatory-assistance-training/commercial-deli-slicer-inspection-tips-food-safety-professionals>. Acesso: 10 jul. 2022.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Recalls, market withdrawals, and safety alerts**. 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/safety/recalls/>. Acesso em: 14 jul. 2022.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

GALVEZ, A. *et al.* Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 120, n. 1-2, p. 51-70, Nov. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17614151/>. Acesso em: 15 ago. 2020.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 113, n. 1, p. 1–15, Jan. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17010463/>. Acesso em: 13 ago. 2020.

GARNER, D.; KATHARIOU, S. Fresh produce-associated listeriosis outbreaks, sources of concern, teachable moments, and insights. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 79, n. 2, p. 337–344, Feb. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26818997/>. Acesso em: 10 mar. 2021.

GARRIDO, V.; VITAS, A. I.; GARCÍA-JALÓN, I. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: Prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. **Food Control**, [Amsterdam], v. 20, n. 11, p. 986–991, Nov. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713508003228>. Acesso em: 15 ago. 2020.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Agentes bacterianos de toxinfecções**. 3. ed. Barueri: Manole, 2008. p. 277-356.

- GIMÉNEZ, B.; DALGAARD, P. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology**, [Malden], v. 96, n. 1, p. 96-109, Jan. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14678163/>. Acesso em: 13 mar. 2021.
- GONÇALVES, J. M. **Atividades biológicas e composição química dos óleos essenciais de *Achyrocline satureoides* (Lam) DC. e *Ageratum conyzoides* L. encontradas no semiárido baiano**. 2015. 111 p. Tese (Doutorado Acadêmico em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.
- GORTON, A.; STASIEWICZ, M. J. Twenty-two years of U.S. meat and poultry products recalls: implications for food safety and food waste. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 80, n. 4, p. 674–684, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28294687/>. Acesso em: 22 maio 2022.
- GREEN BROWN, L.; KHARGONEKAR, S.; BUSHNELL, L. Frequency of inadequate chicken cross-contamination prevention and cooking practices in restaurants. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 76, n. 12, p. 2141-2145, Dec. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24290693/>. Acesso em: 12 maio 2020.
- GUPTA, A. *et al.* Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, [London], v. 12, p. 2826–2841, Feb. 2016. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/sm/c5sm02958a>. Acesso em: 06 jun. 2021.
- HÄCHLER, H. *et al.* Outbreak of listeriosis due to imported cooked ham, Switzerland 2011. **Euro Surveillance**, [Strasbourg], v. 18, n. 18, p. 1-7, May 2013. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V18N18/art20469.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2020.
- HAMMONS, S. R. *et al.* Evaluation of third-party deep cleaning as a *Listeria monocytogenes* control strategy in retail delis. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 80, n. 11, p. 1913–1923, Oct. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29053422/>. Acesso em: 22 maio 2022.
- HE, S. *et al.* Ethanol adaptation in foodborne bacterial pathogens. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [Abingdon], v. 61, n. 5, p. 777-787, Apr. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32274932/>. Acesso em: 07 jul. 2022.
- HE, S. *et al.* Ethanol adaptation induces direct protection and cross-protection against freezing stress in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Journal of Applied Microbiology**, [Malden], v. 120, n. 3, p. 697–704, Mar. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26743544/>. Acesso em: 07 jul. 2022.
- HE, S. *et al.* Influence of ethanol adaptation on *Salmonella enterica* serovar Enteritidis survival in acidic environments and expression of acid tolerance-related genes. **Food Microbiology**, [London], v. 72, p. 193–198, June 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002017305178>. Acesso em: 07 jul. 2022.

HEO, E. J. *et al.* Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by real-time PCR in processed meat and dairy products. **Jornal of Food Protection**, [United States], v. 77, n. 3, p. 453–458, Mar. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24674437/>. Acesso em: 14 mar. 2021.

HILLEGREN, A.; LINDGREN, J.; ALDÉN, M. Protection mechanism of Tween 80 during freeze–thawing of a model protein, LDH. **International Journal of Pharmaceutics**, [Amsterdam], v. 237, n. 1-2, p. 57–69, Apr. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11955804/>. Acesso em: 09 set. 2022.

HINNEBURG, I.; DAMIEN DORMAN, H. J.; HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 97, n. 1, p. 122-129, July 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814605002840>. Acesso em: 05 abr. 2021.

HOELZER, K.; POUILLOT, R.; DENNIS, S. *Listeria monocytogenes* growth dynamics on produce: A review of the available data for predictive modeling. **Foodborne Pathogens and Disease**, [New Rochelle], v. 9, n. 7, p. 661-673, July 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22612229/>. Acesso em: 12 mar. 2021.

HOLAH, J. T. *et al.* Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent stains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, [Malden], v. 92, n. s1, p. 111S-120S, May 2002. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.18.x>. Acesso em: 14 mar. 2021.

HONIKEL, K. O. Chemical analysis for specific componentes curing agents. *In*: DEVINE, C. (ed.). **Encyclopedia of meat Sciences**. 2nd ed. Oxford: Academic Press, 2014. p. 200-205.

HUANG, Q.; YU, H.; RU, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. **Journal of Food Science**, [Chicago], v. 75, n. 1, p. R50-R57, Jan./Feb. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20492195/>. Acesso em: 06 abr. 2021.

HUANG, Y.-T. *et al.* Effect of ethanol shock pretreatment on the tolerance of *Cronobacter sakazakii* BCRC 13988 exposed to subsequent lethal stresses. **Foodborne Pathogens and Disease**, [New Rochelle], v. 10, n. 2, p. 165–170, Feb. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23441915/>. Acesso em: 10 jul. 2021.

IGLESIAS, M. A. *et al.* Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 100, n. 1, p. 96–101, Oct. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28873766/>. Acesso em: 10 jul. 2021.

INGHAM, S. C. *et al.* Survival of *Listeria monocytogenes* during storage of ready-to-eat meat products processed by drying, fermentation, and/or smoking. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 67, n. 12, p. 2698-2702, Dec. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15633674/>. Acesso em: 13 mar. 2021.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JAYASENA, D. D.; JO, C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: a review. **Trends in Food Science & Technology**, [London], v. 34, n. 2, p. 96-108, Dec. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224413002033>. Acesso em: 04 abr. 2021.

JU, J. *et al.* Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth on baked foods. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 240, p. 850–855, Feb. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814617312736>. Acesso em: 04 abr. 2021.

KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 65, n. 11, p. 1811-1829, Nov. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12430709/>. Acesso em: 20 ago. 2020.

KENTISH, S. *et al.* The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [Netherlands], v. 9, n. 2, p. 170-175, Apr. 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1466856407001294>. Acesso em: 06 jun. 2021.

KIM, J-W.; SILETZKY, R. M.; KATHARIOU, S. Host ranges of *Listeria*-specific bacteriophages from the turkey processing plant environment in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, [Washington], v. 74, n. 21, p. 6623–6630, Nov. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2576701/>. Acesso em: 20 mar. 2021.

KING, A. M. *et al.* Modeling the impact of ingoing sodium nitrite, sodium ascorbate, and residual nitrite concentrations on growth parameters of *Listeria monocytogenes* in cooked, cured pork sausage. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 79, n. 2, p. 184–193, Feb. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26818978/>. Acesso em: 15 set. 2022.

KOPPEL, R.; SCHADE, J.; PEIER, M. Specific detection of the most prevalent five *Listeria* strains and unspecific detection of 15 *Listeria* using multiplex real-time PCR. **European Food Research and Technology**, [Germany], v. 247, p. 1167–1175, Feb. 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-021-03697-y>. Acesso em: 10 jun. 2022.

KOVACEVIC, J.; MESAK, L. R.; ALLEN, K. J. Occurrence and characterization of *Listeria* spp. in ready-to-eat retail foods from Vancouver, British Columbia. **Food Microbiology**, [London], v. 30, n. 2, p. 372-378, June 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22365350/>. Acesso em: 10 mar. 2021.

LAER, A. E. V. *et al.* Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in pelotas-rs by pfge. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 574-582, Sept. 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/Bx4cCk7nZPywKB4PXfvcG3x/abstract/?lang=en>. Acesso em: 12 maio 2020.

LANDRY, K. S. *et al.* Effectiveness of a novel spontaneous carvacrol nanoemulsion against *Salmonella enterica* Enteritidis and *Escherichia coli* O157: H7 on contaminated mung bean and alfalfa seeds. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 187, p. 15-21, Sept. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25033425/>. Acesso em: 04 abr. 2021.

LATORRE, A. A. *et al.* Increased in vitro adherence and on-farm persistence of predominant and persistent *Listeria monocytogenes* strains in the milking system. **Applied and Environmental Microbiology**, [Washington], v. 77, n. 11, p. 3676–3684, June 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3127605/>. Acesso em: 12 mar. 2021.

LAWAL, O.; OGUNWANDE, I. Essential oils from the medicinal plants of Africa. In: KUETE, V. (ed.). **Medicinal plant research in Africa: Pharmacology and chemistry**. London: Elsevier, 2013. p. 203–210

LEE, N. *et al.* A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean ready-to-eat food. **Foodborne Pathogens and Disease**, [New Rochelle], v. 11, n. 7, p. 574–580, July 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24796416/>. Acesso em: 20 mar. 2021.

LEISTNER, L.; GOULD, G. W. **Hurdle technologies: combination treatments for food stability, safety and quality**. London: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2002.

LI, H. *et al.* Risk factors and level of *Listeria monocytogenes* contamination of raw pork in retail markets in China. **Frontiers in Microbiology**, [Switzerland], v. 9, May 2018a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29896170/>. Acesso em: 10 mar. 2020.

LI, M. K.; FOGLER, H. S. Acoustic emulsification. Part 1. The instability of the oilwater interface to form the initial droplets. **Journal of Fluid Mechanics**, [Cambridge], v. 88, n. 03, p. 499-511, Oct. 1978. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-fluid-mechanics/article/abs/acoustic-emulsification-part-1-the-instability-of-the-oilwater-interface-to-form-the-initial-droplets/BCF2C99BEF70897EF1BAF49B471623CA>. Acesso em: 10 mar. 2020.

LI, W. *et al.* The epidemiology of *Listeria monocytogenes* in China. **Foodborne Pathogens and Disease**, [New Rochelle], v. 15, n. 8, p. 459–466, Aug. 2018b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30124341/>. Acesso em: 10 mar. 2020.

LIANOU, A.; PANAGOUE, E. Z.; NYCHAS, G.-J. E. Meat safety - I foodborne pathogens and other biological issues. In: TOLDRÁ, F. (ed.). **Lawrie's Meat Science**. 8th ed. Germany: Springer, 2017. p. 521–552.

LIANOU, A.; SOFOS, J. N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 70, n. 9, p. 2172–2198, Sept. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17900099/>. Acesso em: 11 mar. 2020.

LIDON, F.; SILVESTRE, M. M. **Indústrias Alimentares. Aditivos e Tecnologia**. 1. ed. Lisboa: Escolar Editora, 2007.

LIU, Y. *et al.* The prevalence of *Listeria monocytogenes* in meat products in China: A systematic literature review and novel meta-analysis approach. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 312, Jan. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31655356/>. Acesso em: 02 abr. 2021.

LOIKO, M. R. *et al.* Genotypic and antimicrobial characterization of pathogenic bacteria at different stages of cattle slaughtering in Southern Brazil. **Meat Science**, [Kidlington], v. 116, p. 193–200, June 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26896744/>. Acesso em: 13 mar. 2021.

LOU, Y.; YOUSEF, A. E. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. **Applied and Environmental Microbiology**, [Washington], v. 63, n. 4, p. 1252–1255, Apr. 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9097420/>. Acesso em: 13 mar. 2021.

LUBER, P. *et al.* Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization e recommendations for improved prevention and control. **Food Control**, [Amsterdam], v. 22, n. 9, p. 1535-1549, Sept. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713511000260>. Acesso em: 20 mar. 2021.

MAGALHÃES, R. *et al.* Persistent and non-persistent strains of *Listeria monocytogenes*: a focus on growth kinetics under different temperature, salt, and pH conditions and their sensitivity to sanitizers. **Food Microbiology**, [London], v. 57, p. 103–108, Aug. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27052708/>. Acesso em: 12 mar. 2021.

MAHFOUDHI, N.; KSOURI, R.; HAMDI, S. Nanoemulsions as potential delivery systems for bioactive compounds in food systems: preparation, characterization, and applications in food industry. In: GRUMEZESCU, A. M. (ed.). **Emulsions**. Amsterdam: Elsevier, 2016. p. 365–404.

MANTILLA, S. P. S. *et al.* Ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de carne bovina moída comercializadas no município de Niterói, RJ, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1225-1230, ago. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/y84W6FKG6zR9KYGwK6x4WrJ/?lang=pt>. Acesso em: 10 maio 2020.

MARTINS, E. A. ***Listeria monocytogenes* em produtos fatiados do tipo read-to-eat, presunto cozido e salame, comercializados no município de São Paulo: Ocorrência, quantificação e sorotipagem**. 2009. 76 p. Tese (Doutorado em Prática Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MAZAHERI, T. *et al.* *Listeria monocytogenes* biofilms in the food industry: Is the current hygiene program sufficient to combat the persistence of the pathogen? **Microorganisms**, [Basel], v. 9, n. 1, p. 181, Jan. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33467747/>. Acesso: 07 jun. 2022.

McCIEMENTS, D. J. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. **Trends in Food Science & Technology**, [London], v. 6, n. 9, p. 293–299, Sept. 1995. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224400891396>. Acesso em: 06 abr. 2021.

MEI, Z. *et al.* Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [Amsterdam], v. 56, n. 2, p. 189–196, Sept. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12957632/>. Acesso em: 06 jun. 2021.

MEJLHOLM, O. *et al.* Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes* — an international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 141, n. 3, p. 137-150, July 2010. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160510002576>. Acesso em: 12 mar. 2021.

MELLEFONT, L. A.; McMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 121, n. 2, pp. 157-168, Jan. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18083261/>. Acesso em: 10 mar. 2020.

MILILLO, S. R. *et al.* A review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [Abingdon], v. 52, n. 8, p. 712–725, May 2012. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22591342/>. Acesso em: 14 mai. 2021.

MOGHIMI, R. *et al.* Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 194, p. 410–415, Mar. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26471573/>. Acesso em: 23 jun. 2021.

MORAES, M. *et al.* Nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: production by a low energy method and evaluation of antibacterial action. In: IFT13 - **Annual Meeting and Food Expo**. Chicago: Program & Exhibit Director, 2013. 1 v. p. 72.

MUÑOZ, A. B. *et al.* *Listeria monocytogenes* in food handlers: A new approach to address the dangers in food industry. **Biomedica**, [Bogotá], v. 33, n. 2, p. 283-291, Apr./June 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24652139/>. Acesso em: 04 abr. 2020.

MURIEL-GALET, V. *et al.* Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of oregano essential oil and green tea extract componentes. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 149, p. 9-16, Mar. 2015.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877414004270>. Acesso em: 23 jun. 2021.

NAKAMURA, H. *et al.* Biofilm formation and resistance to benzalkonium chloride in *Listeria monocytogenes* isolated from a fish processing plant. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 76, n. 7, p. 1179–1186, July 2013. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23834792/>. Acesso em: 14 maio 2021.

NASCENTES, C. C. *et al.* Use of ultrasonic baths for analytical applications: a new approach for optimisation conditions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 57-63, 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/rTVbW4csKg7pVFtMfywdCS/?lang=en>. Acesso em: 14 jun. 2021.

NOWAK, J. *et al.* Persistent *Listeria monocytogenes* strains isolated from mussel production facilities form more biofilm but are not linked to specific genetic markers. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 256, p. 45–53, Sept. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28599174/>. Acesso em: 14 maio 2022.

O'BRIEN JÚNIOR, W. D. Ultrasound-biophysics mechanisms. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, [United Kingdom], v. 93, n. 1–3, p. 212–255, Jan./Apr. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16934858/>. Acesso em: 06 jun. 2021.

OCHIAI, Y. *et al.* Unique response characteristics in persistent strains of *Listeria monocytogenes* exposed to low pH. **Food Microbiology**, [London], v. 86, Apr. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S074000201930190X>. Acesso em: 14 maio 2022.

OISETH, S.; JONES, L.; MAZA, E. **Infeções por *Listeria monocytogenes***. 2022. Disponível em: <https://www.lecturio.com/pt/concepts/infecoes-por-listeria-monocytogenes/> Acesso em: 08 ago. 2022.

OLIVEIRA, B. R. de. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsão com óleos de *Carapa Guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti***. 2008. 128 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

OLIVEIRA, J. L. de *et al.* Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. **Biotechnology Advances**, [Amsterdam], v. 32, n. 8, p. 1550–1561, Dec. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975014001591>. Acesso em: 10 jul. 2021.

PAINTER, J. A. *et al.* Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. **Emerging Infectious Diseases**, [Atlanta], v. 19, n. 3, p. 407–415, Mar. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23622497/>. Acesso em: 20 maio 2020.

PANDEY, A. K. *et al.* Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives. **Frontiers in Microbiology**, [Lausanne], v. 7, p. 2161, Jan. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5238431/>. Acesso em: 19 abr. 2021.

PESAVENTO, G. *et al.* Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. **Food Control**, [Amsterdam], v. 21, n. 5, p. 708–713, May 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713509002916>. Acesso em: 02 mar. 2021.

PISOSCHI, A. M. *et al.* An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [France], v. 143, p. 922–935, Jan. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29227932/>. Acesso em: 03 maio 2021.

PORTE, A.; GODOY, R. L. de O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 193-210, jul./dez. 2001. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/1233>. Acesso em: 04 fev. 2020.

RAMOS, M. *et al.* Active packaging for fresh food based on the release of carvacrol and thymol. **Chemistry and Chemical Technology**, [Ukraine], v. 7, n. 3, p. 295-303, Nov. 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/287256170_Active_packaging_for_fresh_food_based_on_the_release_of_carvacrol_and_thymol. Acesso em: 18 abr. 2021.

RAO, J.; CHEN, B.; McCLEMENTS, D. J. Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: mechanisms of action. **Annual Review of Food Science and Technology**, [Palo Alto], v. 10, p. 365–387, Mar. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30653350/>. Acesso em: 24 abr. 2021.

REYES-JURADO, F. *et al.* Essential oils: antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling. **Food Engineering Reviews**, [New York], v. 7, p. 275–297, Jan. 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12393-014-9099-2>. Acesso em: 17 jun. 2020.

RIBEIRO, D. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) frente a bactérias isoladas de alimentos: Estudos *in vitro* e em matriz alimentícia**. 2011. 102 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

RODRÍGUEZ-CAMPOS, D. *et al.* Persistent *Listeria monocytogenes* isolates from a poultry-processing facility form more biofilm but do not have a greater resistance to disinfectants than sporadic strains. **Pathogens**, [San Francisco], v. 8, n. 4, p. 250, Nov. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31756896/>. Acesso em: 03 jul. 2022.

RYSER, E. T.; DONNELLY, C. W. *Listeria*. In: SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M. L. (eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 5th ed. Washington: American Public Health Association, 2015. p. 425–475.

SADEKUZZAMAN, M. *et al.* Effectiveness of a phage cocktail as a biocontrol agent against *L. monocytogenes* biofilms. **Food Control**, [Amsterdam], v. 78, p. 256–263, Aug. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713516306120>. Acesso em: 18 maio 2020.

SAGOO, S. K. *et al.* Microbiological safety of retail vacuum-packed and modified-atmosphere-packed cooked meats at end of shelf life. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 70, n. 4, p. 943–951, Apr. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17477265/>. Acesso em: 16 mar. 2020.

SAKATE, R. I. **Prevalência, epidemiologia, caracterização sorológica e molecular de *Listeria monocytogenes* isoladas na criação intensiva de novilhos superprecoces e em abatedouros frigoríficos no Estado de São Paulo.** 2005. 95 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SAMUEL, M. C. *et al.* Consumption of risky foods among adults at high risk for severe foodborne diseases: room for improved targeted prevention messages. **Journal of Food Safety**, [Malden], v. 27, n. 2, p. 219-23, May 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-4565.2007.00074.x>. Acesso em: 17 mar. 2020.

SANTOS, T. M. dos. Resistência de micro-organismos patógenos (*Clostridium*, *Salmonella*, e *Listeria*) em embutidos crus e cozidos e carnes armazenadas em embalagem com atmosfera modificada. **PUBVET**, Maringá, v. 2, n. 24, p. 1-14, jun. 2008. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/material/Santos256.pdf>. Acesso em: 13 maio 2021.

SHAFIQ, S. *et al.* Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [Amsterdam], v. 66, n. 2, p. 227–243, May 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17127045/>. Acesso em: 03 maio 2021.

SHEEN, S.; HWANG, C.-A. Mathematical modeling the cross-contamination of *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of ready-to-eat meat product while slicing. **Food Microbiology**, [London], v. 27, n. 1, p. 37-43, Feb. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19913690/>. Acesso em: 17 mar. 2020.

SHEEN, S.; HWANG, C.-A. Modeling transfer of *Listeria monocytogenes* from slicer to deli meat during mechanical slicing. **Foodborne Pathogens Disease**, [New Rochelle], v. 5, n. 2, p. 135–146, Apr. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18361687/>. Acesso em: 16 mar. 2020.

SILVA, E. K.; ROSA, M. T. M. G.; MEIRELES, M. A. A. Ultrasound-assisted formation of emulsions stabilized by biopolymers. **Current Opinion in Food Science**, [Netherlands], v. 5, Oct. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214799315001228>. Acesso em: 12 maio 2021.

SILVA, H. D. *et al.* Nanoemulsions of b-carotene using a high-energy emulsification–evaporation technique. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 102, n. 2, p. 130–135, Jan. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877410003936>. Acesso em: 12 jun. 2021.

SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos e água.** 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 632 p.

- SILVA, W. P. da *et al.* *Listeria* spp. no processamento de linguiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 911-916, June 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/qVcYHkXdQ8cTQcf8drjLYfm/?lang=pt>. Acesso em: 12 mar. 2020.
- SIMMONS, C. *et al.* *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. contamination patterns in retail delicatessen establishments in three U.S. states. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 77, n. 11, p. 1929–1939, Nov. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25364927/>. Acesso em: 16 mar. 2020.
- SOLANS, C. *et al.* Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, [United Kingdom], v. 10, n. 3-4, p. 102–110, Oct. 2005. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/223222264_Nano-emulsion. Acesso em: 02 maio 2021.
- SORIANO, J. M. *et al.* *Listeria* species in raw and ready-to-eat foods from restaurants. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 64, n. 4, p. 551-553, Apr. 2001. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/64/4/551/167896/Listeria-Species-in-Raw-and-Ready-to-Eat-Foods>. Acesso em: 15 mar. 2020.
- SOUZA, E. R. N.; TEBALDI, V. M. R.; PICCOLI, R. H. Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria monocytogenes* aos compostos eugenol e carvacrol. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 17, n. 4, p. 528-533, Oct./Dec. 2015. Disponível em: Acesso em: 04 maio 2021.
- SPECTOR, M. P.; KENYON, W. J. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 45, n. 2, p. 455–81, Mar. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096399691100439X>. Acesso em: 04 maio 2021.
- SUN, W. *et al.* Probabilistic model for estimating *Listeria monocytogenes* concentration in cooked meat products from presence/absence data. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 131, May 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096399692030065X>. Acesso em: 06 maio 2022.
- SUNDARRAM, A. *et al.* Lytic capacity survey of comercial *Listeria* spp. with varied genotypic and phenotypic characteristics. **Foodborne Pathogens and Disease**, [New Rochelle], v. 18, n. 6, p. 413-418, June 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33902330/>. Acesso em: 08 jun. 2022.
- SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, [Paris], v. 9, n. 10, p. 1236–1243, Aug. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17720602/>. Acesso em: 07 abr. 2019.
- TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, [Amsterdam], v. 21, n. 9, p. 1199–218, Sept. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713510000459>. Acesso em: 07 ago. 2019.

TIAN, W. L. *et al.* Physical stability and antimicrobial activity of encapsulated cinnamaldehyde by self-emulsifying nanoemulsion. **Journal of Food Process Engineering**, [United States], v. 39, n. 5, p. 462-471, Oct. 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpe.12237>. Acesso em: 28 abr. 2019.

TODD, E. C. D.; NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, [Amsterdam], v. 22, n. 9, p. 1484-1490, Sept. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713510002422>. Acesso em: 07 abr. 2019.

TOMPKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, [United States], v. 65, n. 4, p. 709-725, Apr. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11952224/>. Acesso em: 10 abr. 2019.

TREMONTE, P. *et al.* Antimicrobial effect of *Malpighia punicifolia* and extension of water buffalo steak shelf-life. **Journal of Food Science**, [Chicago], v. 81, n. 1, p. 97-105, Jan. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26556435/>. Acesso em: 09 maio 2021.

UHITIL, S. *et al.* Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. In cakes in Croatia. **Food Control**, [Amsterdam], v. 15, n. 3, p. 213-216, Apr. 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713503000495>. Acesso em: 10 abr. 2019.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Interagency Risk Assessment: *Listeria monocytogenes* in Retail Delicatessens**. 2013. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/c0c6dfbc-ad83-47c1-bcb8-8db6583f762b/Lm-Retail-Technical-Report.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 16 mar. 2020.

VALIZADEH, A. *et al.* Increased antibacterial activity of cinnamon oil microemulsion in comparison with cinnamon oil bulk and nanoemulsion. **Nanomedicine Research Journal**, [Iran], v. 3, n. 1, p. 37-43, Feb. 2018. Disponível em: http://www.nanomedicine-rj.com/article_31899_b55ae8d909d7e6d55b9f67c6a438d678.pdf. Acesso em: 04 nov. 2021.

WANG, L. J. *et al.* Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations. **Journal of Colloid and Interface Science**, [New York], v. 314, n. 1, p. 230-235, Oct. 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021979707004699>. Acesso em: 21 ago. 2019.

WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; McCLEMENTS, J. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of Food Science**, [Chicago], v. 71, n. 9, p. R107-R116, Nov./Dec. 2006. Disponível em: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1750-3841.2006.00195.x>. Acesso em: 18 jun. 2021.

WEISZHÁR, Z. *et al.* Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [Amsterdam], v. 45, n. 4, p. 492-498, Mar. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21963457/>. Acesso em: 09 jan. 2021.

WELLER, D. *et al.* *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [Reading], v. 65, n. 1, p. 286–292, Jan. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25342111/>. Acesso em: 05 maio 2021.

WIEDMANN, M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, [Arlington], v. 85, n. 2, p. 524-531, Mar./Apr. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11990041/>. Acesso em: 27 maio 2021.

WINTER, C. H. *et al.* Prolonged hospital and community-based listeriosis outbreak caused by ready-to-eat scalded sausages. **Journal of Hospital Infection**, [London], v. 73, n. 2, p. 121-128, Oct. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19716628/>. Acesso em: 04 mar. 2020.

WU, S. T. *et al.* Infrastructure, sanitation, and management practices impact *Listeria monocytogenes* prevalence in retail grocery produce environments. **Food Control**, [Amsterdam], v. 109, Mar. 2020a. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713519305006>. Acesso em: 25 maio 2022.

WU, S. T. *et al.* Predictive risk models combined with employee- and management-implemented SSOPs identified and reduced *Listeria monocytogenes* prevalence in retail delis. **Food Control**, [Amsterdam], v. 109, Mar. 2020b. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713519305316>. Acesso em: 25 maio 2022.

XI, Y. *et al.* Effects of natural antimicrobials on inhibition of *Listeria monocytogenes* and on chemical, physical and sensory attributes of naturally-cured frankfurters. **Meat Science**, [Oxford], v. 90, n. 1, p. 130–138, Jan. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21723674/>. Acesso em: 15 set. 2022.

YEON-JI, J. *et al.* Physical and antimicrobial properties of trans-cinnamaldehyde nanoemulsions in water melon juice. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 60, n. 1, p. 444–451, Jan. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643814005970>. Acesso em: 09 jan. 2021.

YUCEL, N. Y.; CITAK, S.; ONDER, M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. **Food Microbiology**, [London], v. 22, n. 2-3, p. 241-245, Apr./June 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002004000619>. Acesso em: 18 mar. 2021.

ZHANG, D. L.; BAI, Y. L.; BOWMAN, J. P. Impact of combined acidic and hyperosmotic shock conditions on the proteome of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 in a time-course study. **Journal of Food Quality**, v. 2019, Apr. 2019. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jfq/2019/3075028/>. Acesso em: 24 maio 2021.

ZHANG, W. *et al.* Modeling inhibition effects of *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* CICC 6257 on growth of *Listeria monocytogenes* in ground pork stored at CO₂-rich atmospheres. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 97, p. 811–817, Nov. 2018. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643818306339>. Acesso em: 10 fev. 2021.

ZHANG, W.; JAYARAO, B. M.; KNABEL, S. J. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, [Washington], v. 70, n. 2, p. 913–920, Feb. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14766571/>.

Acesso em: 18 mar. 2021.

ZHU, Q.; GOONERATNE, R.; HUSSAIN, M. A. *Listeria monocytogenes* in fresh produce: outbreaks, prevalence and contamination levels. **Foods**, [Basel], v. 6, n. 3, p. 21, Mar. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28282938/>. Acesso em: 10 fev. 2019.

ZIANI, K. *et al.* Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [Washington], v. 59, n. 11, p. 6247–6255, June 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21520914/>. Acesso em: 20 maio 2021.

SEGUNDA PARTE**ARTIGO 1 – POTENTIAL APPLICATION OF NANOEMULSION OF ESSENTIAL OIL BLENDS FOR THE CONTROL OF *Listeria innocua* IN MORTADELLA**

Elaborado de acordo com as normas do periódico *Food Research International*
(ISSN 0963-9969)

Raquel Martino Bemfeito^{1*}, Heloísa Helena de Abreu Martins², Carla Martino Bemfeito³, Diego Alvarenga Botrel³, Roberta Hilsdorf Piccoli³

¹Federal University of Lavras, Department of Food Science, Lavras - Minas Gerais, Brazil and IFMG – Minas Gerais Federal Institute of Education, Science and Technology, Department of Agrarian Sciences, Bambuí - Minas Gerais, Brazil.

²IFBaiano – Federal Institute of Education, Science and Technology, Department of Agroindustry, Itaberaba - Bahia, Brazil.

³Federal University of Lavras, Department of Food Science, Lavras - Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author: Raquel Martino Bemfeito
E-mail: raquel.bemfeito@ifmg.edu.br.

ABSTRACT

The present manuscript evaluated the antimicrobial effect of essential oil blends and their nanoemulsions against *Listeria innocua*, *in vitro* and in mortadella throughout storage (0, 7, 14 and 21 days at 8°C). Two combinations of essential oils (EO) were selected and five treatments were prepared: Control (without addition of essential oils); Treatment 1 containing the EO of oregano (0.075325%), white thyme (0.07925%), chinese pepper (0.058675%) and clove leaf (0.07925%); Treatment 2 containing EO of oregano (0.0875%), white thyme (0.05%), chinese pepper (0.0875%) and clove leaf (0.15%); from treatments 1 and 2, two nanoemulsions were developed and constituted treatments 3 and 4, respectively. The nanoemulsions were characterized considering size, polydispersity index and zeta potential. Furthermore, mortadella were characterized by pH, lipid oxidation and color at 0 and 21 days. Sensory evaluation of mortadella with EO and their nanoemulsions was performed using a descriptive focus group method. Overall, for antimicrobial activity, treatments with EO and nanoemulsions were more efficient than the control treatment. There was no significant difference between treatments in relation to pH and lipid oxidation, but an increase in lipid oxidation was observed during storage time. The color variation between treatments was not noticeable. In the sensory analysis, the presence of EO was perceived by consumers. Although the use of natural preservatives incorporated in mortadella formulations is interesting and attractive, changes in sensory characteristics must be considered. The present study presented a promising strategy to improve the safety of meat products, but more studies should be carried out to optimize the concentrations of essential oils in order to reduce the impacts on sensory characteristics.

Keywords: Meat product; Food pathogen; Natural additives; Antimicrobial activity; Nanocarrier; Sensory analysis.

1. Introduction

The demand for ready-to-eat products has increased significantly and among this food group, sliced meat products such as ham and sausages like mortadella stand out. However, the post-processing handling of these products increases their exposure to contaminating microorganisms, both spoilage and pathogenic, among these *L. monocytogenes*, which has been highlighted as one of the main causes of foodborne diseases in the world (Mor-Mur and Yuste, 2009; Huang and Hwang, 2012; Syne et al., 2013; Akbar and Anal, 2015; Adzitey et al., 2019; Adzitey et al., 2020).

Listeria monocytogenes is a bacterium with a high adaptive capacity to stressful conditions, and therefore has drawn attention in the food industry, especially in the meat industry. *L. monocytogenes* is a Gram-positive, non-endospore-forming bacterium, motile due to the presence of flagella, and its development occurs at temperatures between 0 and 42°C, that is it can multiply under refrigeration. This bacterium, unlike most other food pathogens, is resistant and can form biofilms on the surfaces of production lines, being persistent in the processing environment and in different environmental conditions (Forsythe, 2013; Mazaheri et al., 2021). This ability to form biofilms has been widely associated with post-processing contamination of meat products, making their elimination more complicated.

The *Listeria* genus includes 17 species, 6 of which are genetically related and classified in the stricto sensu group (ability to colonize mammalian hosts); they are: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua* and *L. marthii* (Bhunja, 2018). Of these six species, *L. monocytogenes* is characterized as the main pathogenic species to humans, being represented by 13 serovars, some of which are shared with *Listeria innocua*, which is often considered a non-pathogenic variant of *L. monocytogenes* (Orsi and Wiedmann, 2016; Silva et al., 2019).

To develop gastroenteritis caused by *L. monocytogenes* it is necessary to ingest viable cells (from 100 to 10⁶ CFU/g). Considering this, several European Union countries and Brazil tolerate the presence of this bacterium in ready-to-eat foods (limit of 100 CFU/g), since these foods are not targeted to specific consumer groups such as babies and immunocompromised people; and that the food does not offer viable conditions for its growth during storage. (D'Arrigo et al., 2020; Brasil, 2022).

In view of this scenario and the tendency of consumers to prefer healthy foods, the food industry has invested in the development of reformulated meat products and in the total or

partial replacement of commonly used additives such as nitrite salts, by natural substances that have antimicrobial and antioxidante potential. In this context, essential oils have emerged.

Essential oils (EO) are natural plant-derived substances containing different bioactive components, which generally have antimicrobial, antioxidant and aromatic properties, and can be used as a potential preservative and natural antioxidant in foods (Stefanakis et al., 2013; Khorshidian et al., 2017; Pateiro et al., 2018; Dutra et al., 2019). Furthermore, their biological activities can be increased when used in mixtures, since studies have demonstrated the synergistic effect when two or more oils are combined (Padalia et al., 2015; Clemente et al., 2016; Sharma et al., 2018; Stojanovic-Radic et al., 2018; Vasiljević et al., 2019). However, some properties of essential oils restrict their application in foods, such as low water solubility, high volatility and undesirable properties such as sensory changes when used in high concentrations (Rodríguez-Rojo et al., 2012; Do et al., 2015; Szymandera-Buszka et al., 2020). Thus, it is necessary to use specific methods for their protection, in order to prevent volatility and their oxidation and degradation due to environmental stressors (Llinares et al., 2021) and reduce the sensory impact on food. In this sense, nanoemulsions containing essential oils are an option, helping to maintain biological and physical properties (Surassmo et al., 2010), improving stability and increasing the bioavailability of these lipophilic bioactive compounds, in addition to having improved properties compared to simple emulsions (Donsì and Ferrari, 2016; Erramreddy and Ghosh, 2016).

Given the context, the objective of the present study was to prepare mortadella with reduced concentration of nitrite, and incorporated with coarse emulsions and nanoemulsions containing blends of essential oils, to evaluate the antimicrobial activity against *Listeria innocua* and the physicochemical and sensorial characteristics, after being sliced and stored under refrigeration.

2. Material and methods

2.1. Essential oils

The essential oils of oregano (*Origanum vulgare*), white thyme (*Thymus vulgaris*), chinese pepper (*Litsea cubeba*), peppermint (*Mentha piperita*), clove leaf (*Eugenia caryophyllus*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), ho wood (*Cinnamomum camphora* var. *Linalooliferum*), nutmeg (*Myristica fragans*), black pepper (*Piper nigrum*), tea tree (*Melaleuca alternifolia*), star anise (*Illicium verum*), basil (*Ocimum basilicum*), cardamom (*Elettaria*

cardamomum), Tahiti lemon (*Citrus latifolia*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and mandarin (*Citrus nobilis*) (100% pure) were purchased from Ferquima Indústria e Comércio LTDA (Vargem Grande, São Paulo, Brazil) and Flora Fiora Aromaterapia e Cosmética Natural LTDA (Sorocaba, São Paulo, Brazil).

The constituents of EOs selected to be applied in mortadella were chemically characterized, being oregano, white thyme, chinese pepper and clove leaf.

The characterization was performed by GC/MS (Shimadzu, GCMS-QP2010 Plus) using a chromatographic column of type SBLTM-5MS of 0.25 μm thick, 30 m long, and 0.25 mm internal diameter (bound phase; 5% diphenyl, 95% dimethyl polysiloxane). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.18 mL/min. A temperature ramp from 60°C to 240°C was used at a rate of 3°C/min, then from 300°C to 10°C/min and kept constant for 7 min. The other parameters used were: injection temperature of 220°C; SPLIT injection mode 1:100; ion source temperature: 200°C; interface temperature: 240°C; solvent cutting: 2.4 min and m/z range analyzed: 45–500 Da. Then, 0.1 μL of each EO diluted in hexane was injected at a partition rate of 1:100 v:v. Gas chromatograph with FID (Shimadzu, FID 2010) were used for quantification. The experimental parameters were the same as those applied in the identification. The mass spectra obtained were compared to the Wiley 8.0 equipment library and the retention indexes of the compounds calculated after previous analysis of a homologous series of alkanes, comparing the data obtained with those obtained in the literature (Adams, 2007).

2.2. Microorganisms, standardization and maintenance of the inoculum

The bacterial strain used in the development of this study was *Listeria innocua* ATCC 33090, acquired at the Instituto Adolfo Lutz (IAL), São Paulo, SP, Brasil. The stock cultures were stored in freezing medium (glycerol - 15 mL; bacteriological peptone - 0.5 g; yeast extract - 0.3 g; NaCl - 0.5 g; distilled water 100 mL, pH 7.0).

The culture was thawed at room temperature and reactivated by inoculating 100 μl aliquots into tubes containing 10 mL of Tryptone Soy Broth (TSB) plus 0.6% yeast extract and incubated at 37°C for 24 h. The cultures were standardized at 10^8 CFU/mL by growth curve.

The growth of the microorganism was monitored by reading the absorbance (620 nm) and plating the culture on Tryptone Soy Agar (TSA) with 0.6% of yeast extract and incubation at 37°C for 24 h.

2.3. *In vitro* antimicrobial activity: essential oils and their blends

The minimum bactericidal concentrations (MBC) of essential oils were performed using the microdilution broth technique in 96-well polystyrene plates (CLSI, 2019).

For this purpose, solutions of 150 μ L of TSB plus 0.6% yeast extract and 0.5% Tween 80 (Dinâmica®, São Paulo, SP, Brasil) were added to each well of the microdilution plate. The essential oils were evaluated at the following concentrations: 0.015%; 0.03%; 0.0625%; 0.125%; 0.25%; 0.50%; 1.00% e 2.00% (v/v). In the wells, 10 μ L aliquots of the standardized bacterial cultures were inoculated. The analysis was performed in triplicate and three repetitions, with a negative control (TSB, yeast extract, Tween 80 and essential oil) for each concentration tested. The microplates were incubated at 37°/24 h. After this period, 10 μ L aliquots of the culture from each well were inoculated in Petri dishes containing TSA plus 0.6% yeast extract using the microdroplet technique, which were incubated at 37°C/24 h. The lowest concentrations with no bacterial growth were established as MBC.

After performing the MBC test, the EOs selected were oregano, white thyme, chinese pepper, and clove leaf, which had the lowest MBC. The study of antimicrobial synergy between oils was carried out based on the MBC of each oil. Two combinations of EOs, containing four oils each, were defined in order to reduce the sensory impact. Combination 1 was prepared based on 17% of the MBC and combination 2 was constituted based on 25% of the MBC of the EOs of oreganum, white thyme, chinese pepper and clove leaf. Variations in oil concentrations were generated using the Rotational Central Composite Design (RCCD) in the Chemoface version 1.5 program, using “Experimental design”. The variables +2 and - 2 were calculated according to the MBC (Table 1).

To evaluate the action of the essential oil combinations *in vitro*, 500 μ L aliquots of the standardized culture (10^8 CFU/g) were transferred to tubes containing 5 mL of TSB plus 0.6% (w/v) of yeast extract and 0.5% (v/v) of Tween 80 and the combination of oils. After homogenization, the tubes were incubated at 37°C/24 h. Then, 100 μ L were inoculated in Petri dishes containing TSA plus 0.6% yeast using surface plating method. The plates were incubated at 37°C/24 h. The experiment was carried out in triplicate and three repetitions.

Table 1

Coded variables and actual values of essential oil concentrations (%) used in the tests of the two combinations.

Coded levels		-2	-1	0	+1	+2
Combination	Essential oils (%)					
1	oregano	0.05035	0.058675	0.067	0.075325	0.08365
	white thyme	0.05	0.07925	0.1085	0.13775	0.167
	chinese pepper	0.05035	0.058675	0.067	0.075325	0.08365
	clove leaf	0.05	0.07925	0.1085	0.13775	0.167
2	oregano	0.05	0.06875	0.0875	0.10625	0.125
	white thyme	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
	chinese pepper	0.05	0.06875	0.0875	0.10625	0.125
	clove leaf	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25

The percentages were calculated based on 17% of the minimum bactericidal concentration (MBC) of each essential oil for Combination 1 and 25% the minimum bactericidal concentration (MBC) of each essential oil for Combination 2.

2.4. Synthesis and characterization of nanoemulsions

After the tests defined by the RCCD were carried out, a trial of each combination of oils was selected for the elaboration of the emulsions and their respective nanoemulsions. Oil-in-water (O/W) emulsions were prepared according with Joe et al. (2012) with modifications. Therefore, four treatments were used, two containing the emulsified oils and two with the nanoemulsified oils of each combination (Tabela 2). The coarse emulsions were formulated containing 0.5% of Tween 80, 0.29% and 0.38% of the essential oils blend, these being Treatments 1 and 2 respectively. The nanoemulsions were prepared with 2% EOs, 6% non-ionic surfactant tween 80, and 92% distilled water at 250 mL.

To prepare the nanoemulsions, the mixtures were homogenized for approximately 10 min in UltraTurrax (Ika Labortechnik) and transferred to an ultrasonic homogenizer (Digital Ultrasound Sonifier, Model 450, Brason Ultrasonic Corporation) at 70 amplitude, where they remained for 7 min. The energy density of the equipment was 784 J/mL, the frequency of the ultrasound emitted was 20 KHz and the probe size was 13 mm. The emulsion temperature (15°C) was controlled by an ice bath. The droplet diameter (indicated by z-average), diameter distribution (indicated by polydispersity index, PdI) and zeta potential were determined by dynamic light scattering on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Inc., Worcestershire, U.K.). Ultrapure water was used as a dispersant to avoid multiple scattering as well as interdroplet dispersion and interaction effects. Measurements were carried out soon after emulsification. All measurements were done in triplicate and mean values were reported.

2.5. Mortadella Formulation and Processing

The mortadella samples were produced according to the formulation described by Dutra et al. (2011), with modifications (Table 2). The EOs used and their proportions were selected from the study of antimicrobial synergy between the oils through the statistical planning RCCD. The essential oil combinations selected as preservatives for mortadella were: T1: oregano (0.075325%), white thyme (0.07925%), chinese pepper (0.058675%) and clove leaf (0.07925%); and T2: oregano (0.0875%), white thyme (0.05%), chinese pepper (0.0875%) and clove leaf (0.15%). Considering T1 and T2, two nanoemulsions T3 and T4, respectively, were developed. The ingredients were emulsified in a high speed cutter up, adding the EOs at the end of the process since they are volatile and could be lost with the increase in temperature throughout processing.

Table 2

Formulation of mortadellas and the different treatments used.

Ingredients	Amount (%)				
	Control	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4
Beef	42.20	42.20	42.20	42.20	42.20
Water	21.29	17.29	17.29	6.79	2.29
Pork meat	15.80	15.80	15.80	15.80	15.80
Pork lard	14.00	14.00	14.00	14.00	14.00
Cassava starch	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Salt (NaCl)	1.90	1.90	1.90	1.90	1.90
Sodium tripolyphosphate (New Max)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Ascorbic acid	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Sodium nitrite	0.0075	0.0075	0.0075	0.0075	0.0075
Emulsão	-	4.0	4.0	-	-
Nanoemulsão	-	-	-	14.5	19.0
Essential oils (%)		Emulsões (%)		Nanoemulsions ^a (%)	
	Control	Treatment 1 ^a	Treatment 2 ^a	Treatment 3 ^b	Treatment 4 ^b
Oregano	0	0.075325	0.0875	0.075325	0.0875
White thyme	0	0.07925	0.05	0.07925	0.05
Chinese pepper	0	0.058675	0.0875	0.058675	0.0875
Clove leaf	0	0.07925	0.15	0.07925	0.15
Final concentration of essential oils	0	0.29	0.38	0.29	0.38

^a In treatments 1 and 2, 4% of emulsion was added to replace the amount of water.

^b Nanoemulsions were prepared using 2% of the combination of essential oils. To be used in the formulation in the same proportions as in treatments 1 and 2, 14.5% of the nanoemulsion was added to treatment 3, and 19.0% of nanoemulsion added in treatment 4. Then, there was a reduction in the amount of water.

The obtained masses were weighed in 25 g portions and vacuum packed in 16 micron thick Nylon Poly bags (Registron Automação Comercial Eireli, São Paulo, SP, Brasil). The masses were cooked by immersion in a water bath according to the methodology described by Silva et al. (2021), with changes in the initial temperature of the bath.

The cooking was carried out following the program: initial temperature of the bath at 50°C, being adjusted to 80°C as soon as the doughs were added, maintaining this until an internal temperature of 72°C was obtained, measured using an insertion thermocouple. After cooking, the products were immersed in an ice bath for 15 minutes and stored at 4°C/24 h.

To perform the microbiological analysis, each 25g mortadella sample was ground, inoculated with 10^9 CFU/g of *Listeria innocua*, homogenized, vacuum packed and stored at 8°C. The samples were analyzed at 0, 7, 14 and 21 days.

For the physicochemical analyses, the samples were stored at a temperature of 8°C and analyzed at 0 and 21 days. The production of mortadella and the physical-chemical and microbiological analyzes were performed three times, each in triplicate.

2.6. Quantification of *Listeria innocua* in mortadella

Listeria innocua was quantified according to the FDA (Food and Drug Administration), described by Hitchins (2003), with modifications in the enrichment step and storage temperature. The packages containing 25 g of mortadella were added to 225 mL of 0.1% peptone water (m/v) and the mixtures were homogenized in Stomacher Metroterm® (490 strokes/min) for 5 min. Then, 100 µL aliquots of the appropriate dilutions were spread on Palcan agar enriched with selective supplement (Merck S/A), plates were incubated at 37°C/48 h. The analyzes were performed in in triplicate.

2.7. Technological analysis

The pH values of the mortadellas were measured by insertion of a combined electrode, coupled to a potentiometer (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EUA). Analysis of the Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) was undertaken according to the methodology described by Pikul et al. (1989), with alterations. Samples of about 5g were homogenized in 15 ml of perchloric acid (3.86%) and 1 ml of the antioxidant hydroxybutyltoluene (BHT - 0.15% w/v). The mixture was homogenized (Turratec TE 102; TECNAL, Piracicaba, SP, Brazil) for 1 min, followed by the filtration process. Then, a 5 mL

aliquot was added with 5 mL of thiobarbituric acid (TBA-0.02 M), incubated at boiling for 30 min. After incubation, the aliquots were cooled in an ice bath and the absorbance was read at 532 nm (Genesys 10 UV; Thermo Scientific Varian, São Paulo, Brazil) considering the blank (TBA - 0.02 M and perchloric acid 3.86 % in a 1:1 ratio). The concentration of malonaldehyde (MAD) was determined from an analytical curve with 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) and the results expressed in milligrams of malonaldehyde per kilogram of sample (mg MDA/kg).

Color measurements were taken with the CM-700d spectrophotometric colorimeter (Konica Minolta Inc, Tokyo, Japan) established at a 10° angle for the observer and illuminated D65, excluding specular light, to calculate color indices in the CIELAB system following the recommendations of Ramos et al. (2009) for cured meat products.

The parameters chroma (C^*) and hue angle (h) were obtained from an average of five readings taken at different points of the internal surface of the mortadella slices. The total color difference (ΔE^*) was calculated according to Ramos & Gomide (2017) (Equation 1). The ΔE^* was calculated in relation to the control on day one of storage. All measurements were performed in triplicate and mean values were reported.

$$\Delta E^* = ((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2)^{1/2} \quad (\text{Equation 1})$$

2.8. Sensory analyses

Ethical approval for sensory analyses was obtained from the Ethics Committee on Research with Human Beings of the Federal University of Lavras (CAAE: 94921318.8.0000.5148) and the volunteers signed the Informed Consent Form.

A focus group was organized with 15 untrained tasters and consumers of mortadella, randomly recruited, who evaluated five coded samples (one of each treatment), in balanced order and monadically (Varela and Ares, 2012). Slices of mortadella that were 1.0 cm thick and weighed 25 g in circular format were identified and stored at 4°C until the moment of evaluation. Sensory analysis was performed right after the production of mortadella (time 0).

The purpose of the focus group, the role of the moderator and the aim of the study were presented to the participants. The focus group was conducted according to a script of questions previously prepared. Initially, tasters were asked to characterize the mortadella samples considering the attributes of appearance, aroma, texture, flavor and overall impression. Purchase intention was also considered. Tasters were encouraged to express their opinions

through a discussion conducted with the objective of identifying and raising the most relevant characteristics of the product for the evaluated attributes (Minim, 2013).

2.9. Statistical analysis

The RCCD planning scheme was used to analyze the combinations of EOs using Statistica® 8.0 software (Stasoft, 2008).

The experiment was carried out in three replications using a completely randomized design, in a factorial scheme 5 (treatments) x 4 (storage times) x 1 (temperature) for microbiological analysis and 5 (treatments) x 2 (storage times) x 1 (temperature) for technological analysis.

Data analysis was performed with SISVAR software 5.6. Data from physical-chemical analyzes were submitted to analysis of variance (ANOVA), considering a level of 5% significance. When necessary, the means of the treatments were separated by Tukey's test ($P < 0.05\%$). The results of the microbiological analyzes were submitted to regression analysis.

For sensory analysis data, a qualitative method was used. The answers to the questions were evaluated at once, aiming to compare the answers of the different participants in relation to each question. The frequency of citation of each characteristic was observed for each attribute, generating a contingency table, where it was possible to verify the similarities between the treatments, as well as the unique characteristics of each treatment. Correspondence analysis was calculated on the contingency table in order to determine the spatial configuration, that is, a two-dimensional representation of treatments and attributes, allowing to determine the similarities and differences between treatments. These analyzes were performed using the XLSTAT software (Addinsoft).

3. Results and discussion

3.1. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils

The minimum bactericidal concentration (MBC) of the essential oils tested are described in Table 3. Cinnamon essential oil was the most efficient against *L. innocua* with MBC 0.25%, followed by oregano and chinese pepper oils (MBC 0.50%); white thyme, cloves and ho wood (MBC 1.00%) and peppermint (MBC 2.00%). The other essential oils tested showed no antimicrobial action against the microorganism studied.

Table 3Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of essential oils against *Listeria innocua*.

Essencial Oils		
Scientific Name	Common name	MBC (%)
<i>Origanum vulgare</i>	Oregano	0.50
<i>Thymus vulgaris</i>	White thyme	1.00
<i>Litsea cubeba</i>	Chinese pepper	0.50
<i>Mentha piperita</i>	Peppermint	2.00
<i>Eugenia caryophyllus</i>	Clove leaf	1.00
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Cinnamon	0.25
<i>Cinnamomum camphora</i> var. <i>Linalooliferum</i> *	Ho Wood	1.00
<i>Myristica fragans</i> *	Nutmeg	-
<i>Piper nigrum</i> *	Black pepper	-
<i>Melaleuca alternifolia</i> *	Tea tree	-
<i>Illicium verum</i> *	Star anise	-
<i>Ocimum basilicum</i> *	Basil	-
<i>Elettaria cardamomum</i> *	Cardamom	-
<i>Citrus latifolia</i> *	Tahiti lemon	-
<i>Rosmarinus officinalis</i> *	Rosemary	-
<i>Citrus nobilis</i> *	Mandarin	-

* Essential oils that did not show MBC at the concentrations tested.

The antimicrobial activity of essential oils depends on their chemical composition as well as their structure, functional group, lipophilicity or water solubility (Dorman and Deans, 2000). The different chemical components present in a single essential oil provide different biochemical properties and ensure the effectiveness of the essential oil (Gutierrez et al., 2008). Friedman et al. (2002) evaluated the antimicrobial efficiency of 96 essential oils against four bacterial genera, including *Listeria* spp. The essential oils of clove, oregano, cinnamon, Jamaica pepper and thyme were the ones that showed the highest activity against *L. monocytogenes*, a result similar to that verified in the present study.

Cinnamon oil has several antibacterial properties. It has potent activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *E. coli* O157:H7 biofilms (Kalia et al., 2015; Kim et al., 2015), mainly due to the presence of cinnamaldehyde (Utchariyakiat et al., 2016). The major compound present in clove oil, eugenol, also has potent antimicrobial properties (Devi et al., 2010; Zhang et al., 2017). Cinnamon and clove essential oils are effective against bacteria that cause gastrointestinal tract infections such as *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Shigella*, present in fruit juices (Franklyne et al., 2019). Thyme and oregano essential oils and their main constituents, thymol and carvacrol, are effective against many microbial groups (Du et al., 2015; García-Salinas et al., 2018; Čabarkapa et al., 2019). The antibacterial activity of chinese pepper essential oil against food-borne pathogens has been reported against methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* (Hu et al., 2019), *Vibrio parahaemolyticus*, and *Listeria monocytogenes* (Liu and Yang, 2012). The major components of chinese pepper essential oil are citral, D-limonene and linalool (Yang et al., 2016) and the antibacterial activity is mainly due to the action of citral (Liu and Yang, 2012; Hu et al., 2019).

Ho wood essential oil has linalool (26.6%) as its major compound, usually followed by eucalyptol (16.8%) (Yu et al., 2019; Chen et al., 2020). It has a broad spectrum of biophysiological functions (Singh and Jawaid, 2012) including antibacterial (Yeh et al., 2009) and antifungal functions (Pragadheesh et al., 2013). Chen et al. (2020) found that the oil has antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella*. In China, it is traditionally used in the treatment of bacterial infections (Singh et al., 2008; Marasini et al., 2015).

Essential oils from *Mentha* species (*Lamiaceae* family) are widely recognized for their aromatic and medicinal properties. Peppermint essential oil has long been used as a flavoring in beverages, providing a refreshing aroma and flavor. Some studies have demonstrated inhibitory effects of essential oil against spoilage and pathogenic microorganisms (Freire et al., 2011; Goldjil et al., 2015; de Oliveira et al., 2017; de Sousa Guedes et al., 2017).

The sensory quality of food is one of the main factors in the acceptance of a product in the market. Essential oils and spice extracts can be used in the elaboration of meat products with high convenience for the consumer, however, the high intensity of the essential oil and spicy flavors can be a limitation (Szymandera-Buszka et al., 2020).

Among the oils that showed in vitro antimicrobial activity against *L. innocua*, the essential oils of oregano, white thyme, chili pepper and clove were selected for further analysis, aiming to reduce the sensory impact when incorporated in the mortadella formulation.

3.2 In vitro antimicrobial activity of essential oil blends

The effect of essential oil blends against *L. innocua* is shown in Table 4.

Among the 27 essays evaluated, the following essays were selected: 9 (combination 1: 0.075325% oregano oil, 0.07925% white thyme oil, 0.058675% chinese pepper oil and 0.07925% clove leaf oil; and 19 (combination 2: 0.0875% oregano oil, 0.05% white thyme oil, 0.0875% chinese pepper oil and 0.15% clove leaf oil) to continue the study steps.

Some studies show the antimicrobial activity of the essential oils used in this research, including against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* (Liu and Yang, 2012; Santos et al., 2018; Yousefi et al., 2020). However, it can be observed that there are differences between

the minimum inhibitory or bactericidal concentrations reported by different authors, even for the same strains. Among the various factors involved in these differences, the components present in the oils stand out, which may vary in presence and concentration. Due to this, the evaluation of the components present in the oils is of great importance.

Table 4

Antimicrobial activity *in vitro* of essential oils combinations on *Listeria innocua*.

Essays	Combination 1				Growth ^a	Combination 2				Growth ^a
	Oregano	White thyme	Chinese pepper	Clove leaf		Oregano	White thyme	Chinese pepper	Clove leaf	
	%	%	%	%		%	%	%	%	
1	0.058675	0.07925	0.058675	0.07925	-	0.06875	0.1	0.06875	0.1	-
2	0.058675	0.07925	0.058675	0.13775	-	0.06875	0.1	0.06875	0.2	-
3	0.058675	0.07925	0.075325	0.07925	+	0.06875	0.1	0.10625	0.1	-
4	0.058675	0.07925	0.075325	0.13775	-	0.06875	0.1	0.10625	0.2	-
5	0.058675	0.13775	0.058675	0.07925	-	0.06875	0.2	0.06875	0.1	-
6	0.058675	0.13775	0.058675	0.13775	+	0.06875	0.2	0.06875	0.2	-
7	0.058675	0.13775	0.075325	0.07925	+	0.06875	0.2	0.10625	0.1	-
8	0.058675	0.13775	0.075325	0.13775	-	0.06875	0.2	0.10625	0.2	-
9	0.075325	0.07925	0.058675	0.07925	-	0.10625	0.1	0.06875	0.1	+
10	0.075325	0.07925	0.058675	0.13775	-	0.10625	0.1	0.06875	0.2	-
11	0.075325	0.07925	0.075325	0.07925	+	0.10625	0.1	0.10625	0.1	-
12	0.075325	0.07925	0.075325	0.13775	+	0.10625	0.1	0.10625	0.2	-
13	0.075325	0.13775	0.058675	0.07925	-	0.10625	0.2	0.06875	0.1	-
14	0.075325	0.13775	0.058675	0.13775	+	0.10625	0.2	0.06875	0.2	-
15	0.075325	0.13775	0.075325	0.07925	-	0.10625	0.2	0.10625	0.1	-
16	0.075325	0.13775	0.075325	0.13775	-	0.10625	0.2	0.10625	0.2	-
17	0.05035	0.1085	0.067	0.1085	-	0.05	0.15	0.0875	0.15	+
18	0.08365	0.1085	0.067	0.1085	-	0.125	0.15	0.0875	0.15	-
19	0.067	0.05	0.067	0.1085	-	0.0875	0.05	0.0875	0.15	-
20	0.067	0.167	0.067	0.1085	-	0.0875	0.25	0.0875	0.15	-
21	0.067	0.1085	0.05035	0.1085	-	0.0875	0.15	0.05	0.15	-
22	0.067	0.1085	0.08365	0.1085	-	0.0875	0.15	0.125	0.15	-
23	0.067	0.1085	0.067	0.05	-	0.0875	0.15	0.0875	0.05	-
24	0.067	0.1085	0.067	0.167	+	0.0875	0.15	0.0875	0.25	-
25	0.067	0.1085	0.067	0.1085	+	0.0875	0.15	0.0875	0.15	-
26	0.067	0.1085	0.067	0.1085	+	0.0875	0.15	0.0875	0.15	-
27	0.067	0.1085	0.067	0.1085	+	0.0875	0.15	0.0875	0.15	-

^a (+) Growth in plates; (-) no growth in plates.

Many components were observed in the essential oils studied (Supplementary Material). The main components and their concentrations in the essential oil of oregano were carvacrol (69.53%), ρ -cymene (15.8%) and γ -terpinene (6.19%); in white thyme, thymol (47.82%), ρ -cymene (29.41%), γ -terpinene (6.81%) and carvacrol (4.27%). The major components of

chinese pepper oil were citral (46.48%), neral (34.66%) and limonene (14.19%); and in the clove leaf oil was eugenol (90.19%).

Major components are normally associated with the antimicrobial activity of different essential oils, however, trace components may be involved, both in the synergistic effect and in their antagonism.

In the combinations evaluated, the EOs present lower concentrations than in the individual MBCs, demonstrating synergism and excellent in vitro bactericidal action. In combination 1, growth inhibition was observed in 63% of the essays performed, and in combination 2 in 92.6%.

Many EOs show synergistic antimicrobial activity when used in combination (Bevilacqua et al., 2010; Calo et al., 2015; Falleh et al., 2019; Fadavi et al., 2020; Hosseini et al., 2021; Pinelli et al., 2021). In a study conducted with carvacrol, thymol and eugenol, it was observed that the MBC of the compounds used separately against *Listeria innocua* was respectively 0.015%, 0.025% and 0.045% (w/w) (García-García et al., 2011). Combinations of 0.00625% thymol and 0.0075% carvacrol, or 0.005625% thymol and 0.0125% eugenol completely inhibited the growth of *L. innocua*, as did a combination of carvacrol, thymol and eugenol from 0.0075%, 0.003125% and 0.005625%, demonstrating that EO combinations can reduce the amount needed for antimicrobial action, which can consequently reduce the cost and potential impacts on the sensory quality of foods in which they can be applied.

Another study evaluated the antimicrobial effects of soy sauce containing essential oils against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* at 22°C and 4°C, it was observed that the antibacterial activity of soy sauce was increased by the addition of a small amount of carvacrol and thymol through synergism. The concentrations used in the combinations were lower than the minimum inhibitory concentrations (MIC) of each oil. Although *L. monocytogenes* was also eliminated, it was slightly more tolerant at 4°C than other bacteria, which is attributed to the ability of the cell membrane to adapt to low temperatures (Moon and Rhee, 2016).

3.3. Characterization of the nanoemulsions

The nanoemulsions were characterized according to droplet diameter (Z-average), PDI and zeta potential. The results are shown in Table 5.

Table 5

Characterization of essential oil nanoemulsions.

Treatments*	Z-Average (d.nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
T3	195.17	0.55	-8.56
T4	180.77	0.50	-11.23

* T3: nanoemulsion containing 0.075325% oregano essential oil, 0.07925% white thyme, 0.058675% chinese pepper and 0.07925% clove leaf; T4: nanoemulsion containing 0.0875% oregano essential oil, 0.05% white thyme, 0.0875% chinese pepper and 0.15% clove leaf.

The PDI values found were below 0.6, demonstrating a homogeneous system, probably consisting of drops of similar sizes. Particle size and polydispersity index (PDI) are important indicators of physical stability, uniformity and dispersibility of nanoemulsions. Overall, a reduction in droplet size leads to improved stability for aggregation and, subsequently, gravitational separation, flocculation and coalescence. PDI, ranging from 0 to 1, indicates homogeneity in droplet size distribution, while higher PDI leads to greater particle size variability and reduced stability (Ameur et al., 2021).

The zeta potential values of the nanoemulsions were negative and varied between -8.56 and -11.23 mV due to the negative surface charge of the essential oil droplets, these values are similar to previous studies with essential oils (Salvia-Trujillo et al., 2015; Ceylan et al., 2020).

Nanoemulsions with zeta potential values below -30 mV are normally considered stable, due to the predominance of repulsive forces between the droplets (Heurtault et al., 2003). The zeta potential values demonstrated a common behavior of the system. It is expected that the higher the zeta potential in modulus, the smaller the particle size, tending to be a thermodynamically stable system. However, depending on the wall material used, as well as the surfactant and the degree of dissociation and number of ionizable compounds in the oils used, suspensions can be stable with zeta potential values of around -20 mV or less (Mishra et al., 2009; Bonila et al., 2012). The surfactant used (Tween 80) is non-ionic, it does not interfere with the potential presented by the particles.

*3.4. Antimicrobial action of essential oil blends in emulsions and nanoemulsions on *Listeria innocua* inoculated in mortadella*

The antimicrobial action of essential oil blends in emulsions and nanoemulsions in mortadella stored at 8°C were evaluated for 21 days. The behavior of *Listeria innocua* to different treatments is shown in Fig. 1. The observed values and the estimated values were

adjusted using quadratic regression ($Y = ax^2+bx+c$), whose regression coefficients along the storage are shown in Table 6.

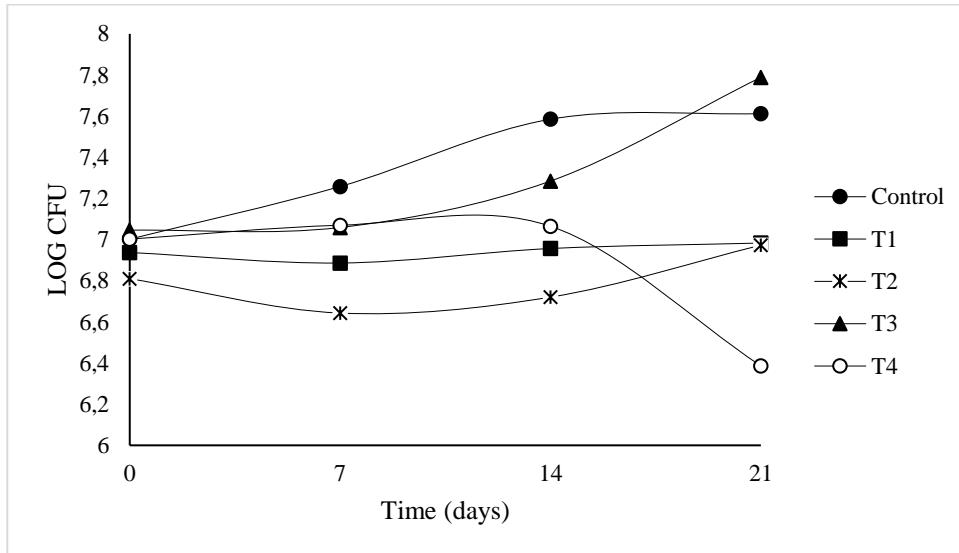


Fig. 1. Growth curve of *Listeria innocua* subjected to different treatments during 21 days of storage at 8°C.

Control: mortadella without essential oils; T1: mortadella with emulsion of essential oils: oregano (0.075325%), white thyme (0.07925%), chili pepper (0.058675%) and clove leaf (0.07925%); T2: mortadella with emulsion of essential oils: oregano (0.0875%), white thyme (0.05%), chili pepper (0.0875%) and clove leaf (0.15%). T3: mortadella with nanoemulsion obtained from the T1 combination; T4: mortadella with nanoemulsion obtained from the T2 combination.

Table 6

Regression coefficients for the growth of *Listeria innocua* during storage of mortadella formulations.

Treatments	a	b	c	R ²
Control	-0.0012	0.0552	6.9780	0.9725
T1	0.0004	-0.0051	6.9258	0.7723
T2	0.0021	-0.0360	6.8030	0.9955
T3	0.0025	-0.0171	7.0437	0.9993
T4	-0.0038	0.0538	6.9668	0.9462

In general, it is possible to observe that treatments with essential oils and nanoemulsions applied to the food product showed a reduction when compared to the control treatment. It was found that the combinations of essential oils used as preservatives in mortadella showed excellent antimicrobial action when used in vitro, but reduced the activity when applied to

mortadella, similar results were observed by Aleixo et al. (2022), Dias et al. (2022), Mendes et al. (2018), Martins et al. (2021), and Pinelli et al. (2021).

Different studies with meat matrices report the antimicrobial action of essential oils and nanoemulsions (Balta et al., 2017; Noori et al., 2018; Durmuş et al., 2019; Keykhosravi et al., 2020; Xiong et al., 2020). It is expected that treatments with simple emulsions and nanoemulsions show lower growth due to the antimicrobial action of essential oils, especially nanoemulsified lipophilic antimicrobials. Oil-in-water nanoemulsions are considered useful tools with great potential for the incorporation of food ingredients. The size reduction of active compounds incorporated in a solution increases the surface area and consequently the solubility and stability in foods. Furthermore, the ability of active lipids to penetrate biological membranes is also enhanced, increasing their biological functionality (Odrizola-Serrano et al., 2014).

In the present study, *L. innocua* was cultivated in a medium rich in nutrients, however, mortadella contains sodium nitrite and essential oils in its formulation. Furthermore, the samples were stored at 8°C, different from the optimum temperature for growth of this microorganism. The combination of these factors probably limited the growth of the microorganism in the mortadella during the storage time.

After 14 days of storage, *L. innocua* submitted to T3 showed greater growth than in the control treatment. This result was not expected considering that essential oil nanoemulsions should be more efficient as observed for T4, however, the same was observed in other studies (Buranasuksombat et al., 2011; Ziani et al., 2011; Salvia-Trujillo et al., 2014; Salvia-Trujillo et al., 2015). This fact can be attributed to the concentration of essential oils. The concentration of essential oils used in T3 was lower than in T4, which may not have been sufficient to show antimicrobial action.

The results showed that essential oils affected the growth curve of the microorganism. In a typical growth curve, bacteria go through an adaptation phase (lag) and a logarithmic growth phase (log) followed by a death phase. In the control treatment, it was observed that *L. innocua* had its logarithmic phase in the first 14 days. For treatments containing essential oils, the lag phase was longer than in the control; and at T4 the microorganism did not reach the log phase, entering the death phase. Thus, T4 showed a greater antimicrobial effect when compared to the other treatments.

In treatments containing essential oil emulsions (T1 and T2), it was observed that *L. innocua* remained in the lag phase, unable to adapt to the medium and move to the log phase. Therefore, the presence of emulsions and nanoemulsions of essential oils in mortadella

showed an interesting effect on the physiology of the microorganism, which was unable to express its population through the typical growth curve.

3.5. Technological analysis

Regarding the analysis of pH and TBARS index, there was no significant difference between treatments or interaction between treatment and time. There was a significant difference for time ($p < 0.05$) with means (\pm standard deviation) of initial pH values ranging from 6.02 ± 0.027 to 5.85 ± 0.215 after 21 days; and TBARS index increasing from 0.24 ± 0.102 to 0.35 ± 0.117 after 21 days of mortadella storage at 8°C .

The pH is an essential variable in the study of the quality of meat products. When the pH is high, it may indicate that there has been protein deamination and accumulation of metabolites by the action of bacteria (Bhat et al., 2013). The pH values of all treatments were close to neutrality, a result similar to that found in mortadella by Meireles et al. (2020). There was a significant decrease in the pH value of the samples at the end of the storage time, which may occur due to the action of lactic acid bacteria normally present in meat products, or may be related to chemical reactions that occur in the food during storage (Hwang et al., 2017).

Regarding the TBARS index, the emulsions and nanoemulsions of essential oils showed no antioxidant effect, but the mortadella samples practically did not undergo lipid oxidation, as the variation was small during the storage time. Although several studies show that essential oils have antioxidant properties (Lorenzo et al., 2014; Ortega-Ramirez et al., 2016; Alirezalu et al., 2020), this was not observed in this study.

According to Das et al. (2020), the reduction in droplet size can affect the chemical stability of the nanoemulsion and lead to increased lipid oxidation. Deus et al. (2017) reported that particle size had no significant effect on lipid oxidation in turkey stored in modified atmosphere packaging, and the same was reported by Xiong et al. (2020) who studied the effect of oregano essential oil nanoemulsions on pork loin shelf life.

The results for objective color are shown in Table 7.

Table 7

Mean values (\pm standard deviation) of lightness (L^*), chroma (C^*) and hue angle (h^*) obtained for treatments and mortadella storage times at 8°C.

Treatments	Lightness (L^*)	Chroma (C^*)	Hue angle (h^*)	ΔE^*
Control	63.11 \pm 2.59 ^{ab}	17.40 \pm 1.49 ^a	49.86 \pm 3.77 ^a	0 ^a
T1	61.58 \pm 2.01 ^a	17.89 \pm 2.15 ^a	48.33 \pm 1.89 ^b	1.53 \pm 0.53 ^b
T2	61.36 \pm 1.42 ^a	18.22 \pm 1.70 ^a	49.82 \pm 2.58 ^a	1.79 \pm 0.89 ^b
T3	65.89 \pm 2.90 ^b	16.66 \pm 1.14 ^a	44.91 \pm 4.42 ^c	3.15 \pm 0.94 ^c
T4	66.35 \pm 2.50 ^b	16.46 \pm 1.09 ^a	45.66 \pm 4.45 ^b	3.37 \pm 1.25 ^c
Time (days)				
0	63.05 \pm 3.22 ^a	17.89 \pm 1.89 ^a	46.25 \pm 3.69 ^a	1.72 \pm 1.61 ^a
21	64.09 \pm 2.71 ^a	16.77 \pm 0.98 ^b	49.90 \pm 3.19 ^b	1.44 \pm 1.29 ^a

Means followed by different letters in the lines indicate a significant difference by Tukey's test ($P < 0.05$).

Control: mortadella without essential oils; T1: mortadella with emulsion of essential oils: oregano (0.075325%), white thyme (0.07925%), chili pepper (0.058675%) and clove leaf (0.07925%); T2: mortadella with emulsion of essential oils: oregano (0.0875%), white thyme (0.05%), chinese pepper (0.0875%) and clove leaf (0.15%); T3: mortadella with nanoemulsion obtained from the T1 combination; T4: mortadella with nanoemulsion obtained from the T2 combination.

The L^* parameter was significant ($P < 0.05$) only for the treatments. High values indicate lighter colors and low values indicate darkening of the sample (Rogers et al., 2014). It was observed that the lightness was higher in mortadella containing nanoemulsions than treatments containing essential oil emulsions.

Regarding the Chroma parameter (C^*), high values suggest a more intense color (Ramos and Gomide, 2017). There was a significant difference ($p < 0.05$) for the interaction between time and treatment, as well as for time, with a decrease in the mean value at the end of the storage time; this may also be associated with increased lipid oxidation at 21 days. Hue angle (h^*) values close to 0 denote red tones and close to 90 indicate yellow tones (Ramos and Gomide, 2017). For this parameter, there was a significant difference ($p < 0.05$) between treatments and between times, with an increase in the average value at the end of the storage time, suggesting a less red tone.

According to Obón et al. (2009), global color difference values (ΔE^*) between 0.5 and 1.5 are considered very low and not perceptible by the human eye. However, values above 1.5 indicate detectable differences, and values above 5, evidently perceptible. Higher values ΔE^* were observed in treatments with nanoemulsions (T3 and T4) than in treatments with simple emulsions (T1 and T2), results similar to those found by Pinelli et al. (2021). Despite this variation in the average values of the treatments, all presented values below 5.0, suggesting that overall there was no perceptible color variation between treatments, which was later confirmed by sensory analysis.

3.6. Sensory analysis

The correspondence analysis obtained with the characteristics used by consumers to describe the treatments is shown in Fig. 2. The first and second dimensions of the correspondence analysis graph represented 78.54% of the variability of the experimental data, with 57.78% and 20.76%, respectively.

It is observed in Fig. 2 and Table 8, that the characteristic pink color was a common description among all treatments, highlighted in T1. Treatments T2 and T3 were the most similar in relation to the described characteristics, being located closer to each other in the correspondence analysis graph. The most cited characteristics were: Control - characteristic pink color, characteristic mortadella aroma, pleasant taste; T1 - characteristic pink color, aroma of herbs/essences/spices and soft texture; T2 - characteristic pink color, mild aroma, aroma of herb/essence/spice and firm texture; T3 - characteristic pink color, mild aroma, aroma of herbs/essences/spices, intense taste and bitter residual taste; T4 - characteristic pink color, mild aroma, intense taste and bitter residual taste.

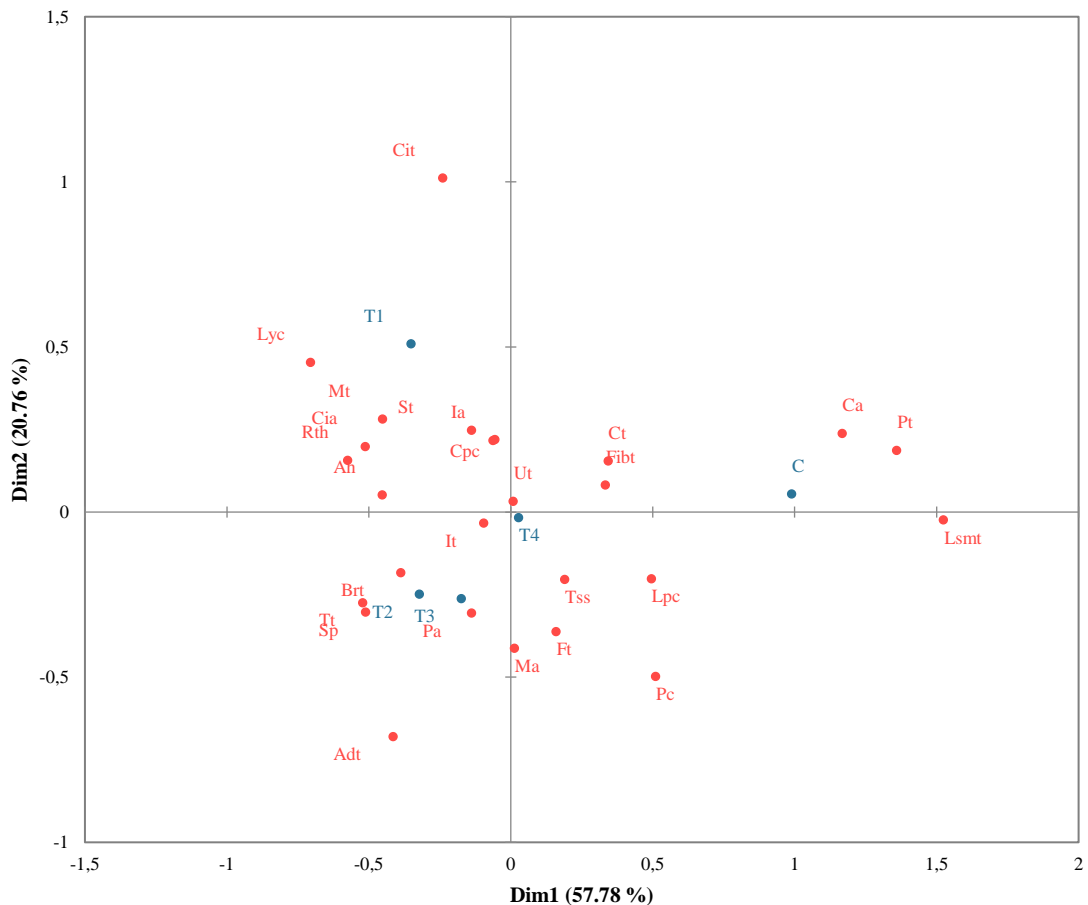


Fig. 2. Correspondence analysis for the main attributes described by the testers of the focus group according to treatments.

C: mortadella without essential oils; T1: mortadella with emulsion of essential oils: oregano (0.075325%), white thyme (0.07925%), chili pepper (0.058675%) and clove leaf (0.07925%); T2: mortadella with emulsion of essential oils: oregano (0.0875%), white thyme (0.05%), chili pepper (0.0875%) and clove leaf (0.15%). T3: mortadella with nanoemulsion obtained from the T1 combination; T4: mortadella with nanoemulsion obtained from the T2 combination.

Described characteristics: Characteristic pink color (Cpc); Light pink color (Lpc); Pale color (Pc); Lightly yellow color (Lyc); Pleasant aroma (Pa); Intense aroma (Ia); Mild aroma (Ma); Characteristic aroma (Ca); Citrus/lemon aroma (Cia); Aroma of herbs/essences/condiments (Ah); Firm texture (Ft); Fibrous texture (Fibt); Soft texture (St); Characteristic texture (Ct); Pleasant taste (Pt); Unpleasant taste (Ut); Intense taste (It); Astringent taste (Adt); Citrus/lemon taste (Cit); Lightly seasoned meat taste (Lsmt); Residual taste of herbs/essences/spices (Sth); Bitter residual taste (Brt); Mint taste (Mt); Spicy taste (Sp); Taste slightly salty (Tss); Tea/ herbs taste (Tt).

Note: in printed version of paper, please do not use color printing.

Table 8

Main characteristics described by the tasters participating in the focus group (%) for the treatments regarding the appearance, aroma, texture and flavor of the developed meat products.

Described characteristics	Treatments				
	C (%)	T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)	T4 (%)
Characteristic pink color (Cpc)	46.67	86.67	60.00	40.00	80.00
Light pink color (Lpc)	33.33	6.67	13.33	26.67	13.33
Pale color (Pc)	20.00	0.00	6.67	26.67	0,00
Lightly yellow color (Lyc)	0.00	6.67	6.67	0.00	0,00
Pleasant aroma (Pa)	13.33	13.33	33.33	33.33	20.00
Intense aroma (Ia)	13.33	26.67	6.67	26.67	13.33
Mild aroma (Ma)	26.67	6.67	53.33	40.00	40.00
Characteristic aroma (Ca)	46.67	6.67	0.00	0.00	26.67
Citrus/lemon aroma (Cia)	0.00	40.00	33.33	20.00	20.00
Aroma of herbs/essences/condiments (Ah)	6.67	66.67	60.00	60.00	20.00
Firm texture (Ft)	33.33	6.67	40.00	40.00	33.33
Fibrous texture (Fibt)	33.33	20.00	13.33	20.00	33.33
Soft texture (St)	26.67	60.00	33.33	40.00	20.00
Characteristic texture (Ct)	20.00	13.33	13.33	6.67	6.67
Pleasant taste (Pt)	60.00	6.67	0.00	6.67	13.33
Unpleasant taste (Ut)	6.67	6.67	13.33	0.00	6.67
Intense taste (It)	20.00	33.33	33.33	40.00	53.33
Astringent taste (Adt)	0.00	0.00	13.33	6.67	6.67
Citrus/lemon taste (Cit)	6.67	33.33	0.00	6.67	6.67
Lightly seasoned meat taste (Lsmt)	26.67	0.00	6.67	0.00	0.00
Residual taste of herbs/essences/spices (Sth)	0.00	26.67	26.67	13.33	6.67
Bitter residual taste (Brt)	0.00	26.67	33.33	46.67	40.00
Mint taste (Mt)	0.00	6.67	6.67	0.00	6.67
Spicy taste (Sp)	0.00	6.67	20.00	6.67	6.67
Taste slightly salty (Tss)	13.33	6.67	13.33	13.33	0.00
Tea/ herbs taste (Tt)	0.00	13.33	26.67	20.00	6.67

C: mortadella without essential oils; T1: mortadella with emulsion of essential oils: oregano (0.075325%), white thyme (0.07925%), chili pepper (0.058675%) and clove leaf (0.07925%); T2: mortadella with emulsion of essential oils: oregano (0.0875%), white thyme (0.05%), chili pepper (0.0875%) and clove leaf (0.15%). T3: mortadella with nanoemulsion obtained from the T1 combination; T4: mortadella with nanoemulsion obtained from the T2 combination.

In this way, all treatments presented some characteristics different from the control, and the addition of essential oils was sensorially perceived by the tasters. This explains the distance between treatments T1, T2, T3, T4 and the control in the correspondence analysis graph (Fig. 2).

In a study carried out by Pinelli et al. (2021) nanoemulsions of essential oils were added to mortadella. Features such as light color and light pink color and some considered atypical of mortadella such as firm texture, unpleasant aroma and taste were mentioned for all treatments. Many studies suggest that the incorporation of nanoemulsions in meat products can improve or may not adversely affect the sensory characteristics of the products, however this depends on the compatibility of the specific bioactive substances used for each product, therefore, it may be necessary to optimize the delivery system used for the food product being studied (Das et al., 2020).

Regarding the consumption of meat products, the tasters reported regularly consuming several meat products, including mortadella, ham, sausages of different types. When asked about purchase intent, the panelists showed greater interest in purchasing the control sample, followed by treatments T1, T2, T4 and T3, respectively. Among the factors that most interfered with purchase intention were the different tastes in relation to traditional mortadella. Possibly, T1 had the second highest purchase intention due to the lower frequency of responses for "bitter residual taste". However, other characteristics markedly perceived in T1, such as "aroma of herbs/essences/spices", "citrus/lemon taste" and "intense taste" probably affected the purchase intention of this sample. Therefore, further studies should be carried out in order to optimize the appropriate oil concentrations to minimize the effects on the sensory characteristics of the product.

4. Conclusion

The combinations of essential oils tested in vitro showed interesting antimicrobial effects. There was synergism when essential oils were combined, allowing to use lower concentrations than MBCs.

The emulsions and nanoemulsions of essential oils applied to mortadella caused a change in the growth curve of *L. innocua*, suggesting that the essential oils made the medium unfavorable to the growth of the microorganism.

In general, no changes were observed in the technological characteristics of mortadella in the analyzed treatments

The presence of essential oils in the meat product was sensorially perceived by the tasters. Thus, there is a need to carry out more studies varying the concentrations of essential oils or other ingredients to reduce sensory change.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

We thank the Minas Gerais Federal Institute of Education, Science and Technology (BambuÍ, MG, Brazil) and the postgraduate program in food science of the Federal University of Lavras (Lavras, MG, Brazil) for the financial support.

References

- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (4th ed.). Allured Publishing.
- Adzitey, F., Ekli, R., & Abu, A. (2019). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from raw and grilled beef in Nyankpala community in the Northern Region of Ghana. *Cogent Food & Agriculture*, 5(1), 1-8.
- Adzitey, F., Ekli, R., & Aduah, M. (2020). Incidence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from ready-to-eat meats in the environs of Bolgatanga Municipality of Ghana. *Cogent Environmental Science*, 6(1), 1-9.
- Akbar, A., & Anal, A. K. (2015). Isolation of *Salmonella* from ready-to-eat poultry meat and evaluation of its survival at low temperature, microwaving and simulated gastric fluids. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 3051–3057.

- Aleixo, G. de C., Silva, M. S., Martins, H. H. de A., Carvalho, R. M. B., Ramos, E. M., & Piccoli, R. H. (2022). Effect of essential oils and major compound on *Clostridium botulinum* endospores inoculated in meat product. *Research, Society and Development*, 11(7).
- Alirezalu, K., Pateiro, M., Yaghoubi, M., Alirezalu, A., Peighambardoust, S. H., & Lorenzo, J. M. (2020). Phytochemical constituents, advanced extraction technologies and techno-functional properties of selected Mediterranean plants for use in meat products. A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 292–306.
- Ameur, A., Bensid, A., Ozogul, F., Ucar, Y., Durmus, M., Kulawik, P., & Boudjenah-Haroun, S. (2021). Application of oil-in-water nanoemulsions based on grape and cinnamon essential oils for shelf-life extension of chilled flathead mullet fillets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(1), 105–112.
- Balta, I., Brinzan, L., Stratakos, A. C., Linton, M., Kelly, C., Pinkerton, L., & Corcionivoschi, N. (2017). Geraniol and linalool loaded nanoemulsions and their antimicrobial activity. *Animal Science and Biotechnologies*, 74(2), 157–161.
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2010). Combining eugenol and cinnamaldehyde to control the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Control*, 21(2), 172–177.
- Bhat, Z. F., Kumar, P., & Kumar, S. (2013). Effect of skin, enrobing and refrigerated storage on the quality characteristics of chicken meat balls. *Journal of Food Science and Technology*, 50(5), 890–899.
- Bhunja, A. K. (2018). *Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis* (2nd ed.). Springer.
- Bonilla, J., Atares, L., Vargas, M., & Chiralt, A. (2012). Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 9–16.
- Brasil. (2022). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Instrução Normativa n° 161, de 01 de julho de 2022*. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Brasília, Diário Oficial da União n° 126, Seção 1, de 06 de julho de 2022. Retrieved from <https://www.jusbrasil.com.br/diarios/1191461858/dou-secao-1-06-07-2022-pg-235>. Accessed July 13, 2022.

- Buranasuksombat, U., Kwon, Y. J., Turner, M., & Bhandari, B. (2011). Influence of emulsion droplet size on antimicrobial properties. *Food Science and Biotechnology*, *20*(3), 793-800.
- Čabarkapa, I., Čolović, R., Đuragić, O., Popović, S., Kokić, B., Milanov, D., & Pezo, L. (2019). Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella Enteritidis*. *Biofouling*, *35*(3), 361–375.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, *54*, 111-119.
- Ceylan, Z., Meral, R., Kose, Y. E., & Cavidoglu, I. (2020). Wheat germ oil nanoemulsion for oil stability of the cooked fish fillets stored at 4 °C. *Food Science and Technology*, *57*(3), 1798–1806.
- Chen, J., Tang, C., Zhang, R., Ye, S., Zhimin Zhao, Z., Huang, Y., Xu, X., Lan, W., & Yang, D. (2020). Metabolomics analysis to evaluate the antibacterial activity of the essential oil from the leaves of *Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl. *Journal of Ethnopharmacology*, *253*.
- Clemente, I., Aznar, M., Silva, F., & Nerín, C. (2016). Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *36*, 26–33.
- CLSI. Clinical & Laboratory Standards Institute. (2019). *CLSI Guidelines*. Retrieved from <https://clsi.org/>. Accessed June 20, 2021.
- D'Arrigo, M., Mateo-Vivaracho, L., Guillamón, E., Fernández-León, M. F., Bravo, D., Peirotén, A., Medina, M., & García-Lafuente, A. (2020). Characterization of persistent *Listeria monocytogenes* strains from ten dry-cured ham processing facilities. *Food Microbiology*, *92*.
- Das, A. K., Nanda, P. K., Bandyopadhyay, S., Banerjee, R., Biswas, S., & McClements, D. J. (2020). Application of nanoemulsion-based approaches for improving the quality and safety of muscle foods: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *19*(5), 2677-2700.
- De Oliveira, K. A. R., Berger, L. R. R., Araújo, S. A., Câmara, M. P. S., & Souza, E. L. (2017). Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. *Food Microbiology*, *66*, 96–103.

- De Sousa Guedes, J. P., & Souza, E. L. (2017). Investigation of damage to *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis exposed to *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in pineapple and mango juice by flow cytometry. *Food Microbiology*, 76, 564–571.
- Deus, D., Kehrenberg, C., Schaudien, D., Klein, G., & Krischek, C. (2017). Effect of a nano-silver coating on the quality of fresh turkey meat during storage after modified atmosphere or vacuum packaging. *Poultry Science*, 96(2), 449–457.
- Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., & Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 107–115.
- Dias, N. A. A., Pinelli, J. J., Silva, M. S., Isidoro, S. R., Martins, H. H. de A., Gonçalves, M. C., Ramos, E. M., & Piccoli, R. H. (2022). Viability of *Clostridium difficile* in mortadella with added essential oils and reduced sodium nitrite content. *Research, Society and Development*, 11(9), 1-16.
- Do, T. K. T., Hadji-Minaglou, F., Antoniotti, S., & Fernandez, X. (2015). Authenticity of essential oils. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 66, 146–157.
- Donsì, F., & Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, 233, 106–120.
- Dorman, H. J., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
- Du, E., Gan, L., Li, Z., Wang, W., Liu, D., & Guo, Y. (2015). In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6, 58.
- Durmuş, M., Ozogul, Y., Köşker, A. R., Ucar, Y., Esmeray, K. B., Ceylan, Z., & Ozogul, F. (2019). The function of nanoemulsion on preservation of rainbow trout fillet. *Journal of Food Science and Technology*, 57(46), 895–904.
- Dutra, T. V., Castro, J. C., Menezes, J. L., Ramos, T. R., do Prado, I. N., Machinski Junior, M., Mikcha, J. M. G., & de Abreu Filho de, B. A. (2019). Bioactivity of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil against *Alicyclobacillus* spp. *Industrial Crops and Products*, 129, 345–349.
- Dutra, M. P., Ramos, E. M., Ramos, A. D. L. S., Fontes, P. R., Cardoso, G. P., & Leal, A. S. (2011). Gamma radiation and storage time on lipidic oxidation, color, heme pigments and residual nitrite of bologna-type sausages formulated with different nitrite additions. *Ciência Rural*, 41(12), 2203–2209.

- Erramreddy, V., & Ghosh, S. (2016). Gelation in nanoemulsion: Structure formation and rheological behavior. In *Emulsions* (pp. 257–292). Elsevier BV.
- Fadavi, A., Pajohi-Alamoti, M., & Karami, M. (2020). Synergistic effect of peppermint and garlic essential oil on fate of *Kluyveromyces marxianus* in Zucchini Bouranee. *Journal of Food Safety*, 40(3).
- Falleh, H., Jemaa, M. B., Djebali, K., Abid, S., Saada, M., & Ksouri, R. (2019). Application of the mixture design for optimum antimicrobial activity: Combined treatment of *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Myrtus communis*, and *Lavandula stoechas* essential oils against *Escherichia coli*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(12).
- Forsythe, S. J. (2013). *Microbiologia da segurança dos alimentos* (2nd ed.). Artmed.
- Franklyne, J. S., Iyer, S., Ebenazer, A., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2019). Essential oil nanoemulsions: antibacterial activity in contaminated fruit juices. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(9), 2802–2810.
- Freire, M. M., Jhan, G. N., Dhingra, O. D., Jardim, C. M., Barcelos, R. C., & Valente, V. M. M. (2011). Composition, antifungal activity and main fungitoxic components of the essential oil of *Mentha piperita* L. *Journal of Food Safety*, 32(2012), 29–36.
- Friedman, M., Henika, P. R., & Mandrell, R. E. (2002). 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*, 65(10), 1545-1560.
- García-García, R., Lopez-Malo, A., & Palou, E. (2011). Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science*, 76(2), 95-100.
- García-Salinas, S., Elizondo-Castillo, H., Arruebo, M., Mendoza, G., & Irusta, S. (2018). Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of different components of natural origin present in essential oils. *Molecules*, 23(6), 1399.
- Goudjil, M. B., Ladjel, S., Bencheikn, S. E., Ziqhmi, S., & Hamada, D. (2015). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil extracted from the *Mentha piperita* of Southern Algeria. *Research Journal of Phytochemistry*, 9(2), 79–87.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 91–97.

- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J. E., & Benoit, J. P. (2003). Physicochemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, *24*(23), 4283–4300.
- Hitchins, A. D. (2003). *Listeria monocytogenes* (7th ed.). In *Bacteriological analytical manual* (pp. 141-151). AOAC International.
- Hosseini, M., Jamshidi, A., Raeisi, M., & Azizzadeh, M. (2021). Effect of sodium alginate coating containing clove (*Syzygium Aromaticum*) and lemon verbena (*Aloysia Citriodora*) essential oils and different packaging treatments on shelf life extension of refrigerated chicken breast. *Journal of Food Processing and Preservation*, *45*(3).
- Hu, W., Li, C. Z., Dai, J. M., Cui, H. Y., & Lin, L. (2019). Antibacterial activity and mechanism of Litsea cubeba essential oil against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Industrial Crops and Products*, *130*, 34–41.
- Huang, L., & Hwang, C. A. (2012). In-package pasteurization of ready-to-eat meat and poultry products. In J. P. Kerry (Ed.), *Advances in meat, poultry and seafood packaging* (pp. 437–450). Woodhead Publishing.
- Hwang, K. E., Kim, T. K., Kim, W. H., Oh, N. S., Kim, Y. B., Jeon, K. H., & Choi, Y. S. (2017). Efeito de extratos fermentados de beterraba vermelha na estabilidade de prateleira de salsichas tipo frankfurters com pouco sal. *Ciência dos Alimentos e Biotecnologia*, *26*(4), 929–936.
- Joe, M. M., Chauhan, P. S., Bradeeba, K., Shagol, C., Sivakumaar, P. K., & Sa, T. (2012). Influence of sunflower oil based nanoemulsion (AUSN-4) on the shelf life and quality of Indo-Pacific king mackerel (*Scomberomorus guttatus*) steaks stored at 20°C. *Food Control*, *23*(2), 564-570.
- Kalia, M., Yadav, V. K., Singh, P. K., Sharma, D., Pandey, H., Narvi, S. S., & Agarwal, V. (2015). Effect of cinnamon oil on quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, *10*(8).
- Keykhosravi, K., Khanzadi, S., Hashemi, M., & Azizzadeh, M. (2020). Chitosan-loaded nanoemulsion containing Zataria multiflora Boiss and Bunium persicum Boiss essential oils as edible coatings: Its impact on microbial quality of turkey meat and fate of inoculated pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, *150*, 904–913.
- Khorshidian, N., Yousefi, M., Khanniri, E., & Mortazavian, A. M. (2017). Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, *45*, 62–72.

- Kim, Y.-G., Lee, J.-H., Kim, S.-I., Baek, K.-H., & Lee, J. (2015). Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *International Journal of Food Microbiology*, *195*, 30-39.
- Liu, T. T., & Yang, T. S. (2012). Antimicrobial impact of the components of essential oil of *Litsea cubeba* from Taiwan and antimicrobial activity of the oil in food systems. *International Journal of Food Microbiology*, *156*(1), 68–75.
- Llinares, R., Ramírez, P., Carmona, J. A., Trujillo-Cayado, L. A., & Muñoz, J. (2021). Assessment of fennel oil microfluidized nanoemulsions stabilization by advanced performance xanthan gum. *Foods*, *10*(4), 1-12.
- Lorenzo, J. M., Batlle, R., & Gomez, M. (2014). Extension of the shelf-life of foal meat with two antioxidant active packaging systems. *LWT - Food Science and Technology*, *59*(1), 181–188.
- Marasini, B. P., Baral, P., Aryal, P., Ghimire, K. R., Neupane, S., Dahal, N., Singh, A., Ghimire, L., & Shrestha, K. (2015). Evaluation of antibacterial activity of some traditionally used medicinal plants against human pathogenic bacteria. *Biomed Reserch International*, 2015.
- Martins, H. H. A., Simões, L. A., Isidoro, S. R., Nascimento, S. S., Alcântara, J. P., Ramos, E. M., & Piccoli, R. H. (2021). Preservative of essential oil blends: control of *Clostridium perfringens* type a in mortadella. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *64*, 1-9.
- Mazaheri, T., Cervantes-Huamán, B. R. H., Bermúdez-Capdevila, M., Ripolles-Avila, C., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2021). *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Food Industry: Is the Current Hygiene Program Sufficient to Combat the Persistence of the Pathogen?. *Microorganisms*, *9*(1), 181.
- Meireles, B. R. L. A., Vitor, R. C. L., Morais, S. K. Q., Barbosa, T. C. M., Costa, S. S., & Fonseca, S. B. (2020). Evaluation of the potential coloring and antioxidant of betalains (*Beta vulgaris*, L.) in chicken mortadella. *Research, Society and Development*, *9*(7), 1-22.
- Mendes, J. F., Martins, H. H. A., Otoni, C. G., Santana, N. A., Silva, R. C. S., Silva, A. G. da, Silva, M. V., Correia, M. T. S., Machado, G., Pinheiro, A. C. M., Piccoli, R. H., & Oliveira, J. E. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of *Eugenia brejoensis* essential oil nanoemulsions against *Pseudomonas fluorescens*. *LWT - Food Science and Technology*, *93*, 659-664.

- Minim, V. P. R. (2013). *Análise sensorial: Estudos com consumidores* (3. ed.). Editora UFV.
- Mishra, P. R., Shaal, L. A., Müller, R. H., & Keck, C. M. (2009). Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *371*(1), 182–189.
- Moon, H., & Rhee, M. S. (2016). Synergism between carvacrol or thymol increases the antimicrobial efficacy of soy sauce with no sensory impact. *International Journal of Food Microbiology*, *217*, 35–41.
- Mor-Mur, M., & Yuste, J. (2009). Emerging bacterial pathogens in meat and poultry: An overview. *Food and Bioprocess Technology*, *3*, 24–35.
- Noori, S., Zeynali, F., & Almasi, H. (2018). Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. *Food Control*, *84*, 312–320.
- Obón, J. M., Castellar, M. R., Alacid, M., & Fernández-López, J. A. (2009). 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*, *90*(4), 471–479.
- Odziozola-Serrano, I., Oms-Oliu, G., & Martín-Belloso, O. (2014). Nanoemulsion-based delivery systems to improve functionality of lipophilic components. *Frontiers in Nutrition*, *1*(1), 24.
- Orsi, R. H., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(12), 5273–5287.
- Ortega-Ramirez, L. A., Rodriguez-Garcia, I., Silva-Espinoza, B. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2016). Oregano (*Origanum spp.*) oils. In V. R. Preedy (Ed.), *Essential oils in food preservation, flavor and safety* (pp. 625–631). Academic Press.
- Padalia, H., Pooja, M., & Sumitra, C. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles from marigold flower and its synergistic antimicrobial potential. *Arabian Journal of Chemistry*, *8*(5), 732–741.
- Pateiro, M., Barba, F. J., Domínguez, R., Sant’Ana, A. S., Mousavi Khaneghah, A., Gavahian, M., Gómez, B., & Lorenzo, J. M. (2018). Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. *Food Research International*, *113*, 156–166.

- Pikul, J., Leszczynski, D. E., & Kummerow, F. A. (1989). Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1309–1313.
- Pinelli, J. J., Martins, H. H. A., Guimarães, A. S., Isidoro, S. R., Gonçalves, M. C., Moraes, T. S. J., Ramos, E. M., & Piccoli, R. H. (2021). Essential oil nanoemulsions for the control of *Clostridium sporogenes* in cooked meat product: An alternative? *LTW - Food Science and Technology*, 143.
- Pragadheesh, V.S., Saroj, A., Yadav, A., Chanotiya, C.S., Alam, M., & Samad, A. (2013). Chemical characterization and antifungal activity of *Cinnamomum camphora* essential oil. *Industrial Crops and Products*, 49, 628-633.
- Ramos, E. M., & Gomide, L. A. M. (2017). *Meat quality assessment: Fundamentals and methodologies* (2nd ed.). Editora UFV.
- Ramos, E. M., Ramos, A. L. S., Scarpa, A. B. O., Chinait, T. M. N., Gomide, L. A. M., & Fontes, P. R. (2009). *Otimização da avaliação objetiva da cor de presuntos e apresuntados*. Anais do Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, São Paulo, BR.
- Rodríguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D., & Cocero, M. J. (2012). Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 98–103.
- Rogers, H. B., Brooks, J. C., Martin, J. N., Tittor, A., Miller, M. F., & Brashears, M. M. (2014). The impact of packaging system and temperature abuse on the shelf life characteristics of ground beef. *Meat Science*, 97(1), 1–10.
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2014). Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. *Food Control*, 37, 292-297.
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2015). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food- grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids*, 43, 547–556.
- Santos, J. M. P., Gonçalves, M. C., Martins, H. A., Pinelli, J. J., Isidoro, S. R., & Piccoli, R. H. (2018). Homologous and heterologous adaptation of *Listeria* spp. to essential oils of condiment plants. *Advances in Microbiology*, 8(8), 639-664.

- Sharma, H., Mendiratta, S. K., Agrawal, R. K., Talukder, S., & Kumar, S. (2018). Studies on the potential application of various blends of essential oils as antioxidant and antimicrobial preservatives in emulsion based chicken sausages. *British Food Journal*, *120*(7), 1398-1411.
- Silva, A. C. M. da, Pena, P. de O., Pflanze Junior, S. B., & Nascimento, M. da S. do (2019). Effect of different dry aging temperatures on *Listeria innocua* as surrogate for *Listeria monocytogenes*. *Meat Science*, *157*.
- Silva, D. R. G., Haddad, G. B. S., Moura, A. P. de, Souza, P. M. de, Ramos, A. L. S., Hopkins, D. L., & Ramos, E. (2021). Safe cured meat using gamma radiation: Effects on spores of *Clostridium sporogenes* and technological and sensorial characteristics of low nitrite cooked ham. *LWT - Food Science and Technology*, *137*.
- Singh, R., & Jawaid, T. (2012). Cinnamomum camphora (Kapur): Review. *Pharmacognosy Journal*, *4*(28), 1-5.
- Singh, P., Srivastava, B., Kumar, A., & Dubey, N. K. (2008). Fungal contamination of raw materials of some herbal drugs and recommendation of Cinnamomum camphora oil as herbal fungitoxicant. *Microbial Ecology*, *56*(3), 555-560.
- Stasoft, I. (2008). *Statistica (Data Analysis Software Systems)*, version 8.0.
- Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H. E., & Makridis, P. (2013). Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control*, *34*(2), 539-546.
- Stojanovic-Radic, Z., Pejdic, M., Jokovic, N., Jekanovic, M., Ivic, M., Sojic, B., Skaljic, S., Stojanovic, P., & Mihajilov-Krstev, T. (2018). Inhibition of *Salmonella* Enteritidis growth and storage stability in chicken meat treated with basil and rosemary essential oils alone or in combination. *Food Control*, *90*, 332-343.
- Surassmo, S., Min, S.-G., Bejrapha, P., & Choi, M.-J. (2010). Effects of surfactants on the physical properties of capsicum oleoresin-loaded nanocapsules formulated through the emulsion-diffusion method. *Food Research International*, *43*(1), 8-17.
- Syne, S.-M., Ramsubhag, A., & Adesiyun, A. A. (2013). Microbiological hazard analysis of ready-to-eat meats processed at a food plant in Trinidad, West Indies. *Infection Ecology & Epidemiology*, *3*(1), 1-12.
- Szymandera-Buszka, K., Waszkowiak, K., Jedrusek-Golinska, A., & Hes, M. (2020). Sensory analysis in assessing the possibility of using ethanol extracts of spices to develop new meat products. *Foods*, *9*(2), 209.

- Utcharyiyakiat, I., Surassmo, S., Jaturanpinyo, M., Khuntayaporn, P., & Chomnawang, M. T. (2016). Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16.
- Varela, P., & Ares, G. (2012). Sensory profiling, the blurred line between sensory and consumer science. A review of novel methods for product characterization. *Food Research International*, 48(2), 893–908.
- Vasilijević, B., Mitić-Ćulafić, D., Djekic, I., Marković, T., Knežević-Vukčević, J., Tomasevic, I., Velebit, B., & Nikolić, B. (2019). Antibacterial effect of *Juniperus communis* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* in vitro and in wine marinated beef. *Food Control*, 100, 247–256.
- Xiong, Y., Li, S., Warner, R. D., & Fang, Z. (2020). Effect of oregano essential oil and resveratrol nanoemulsion loaded pectin edible coating on the preservation of pork loin in modified atmosphere packaging. *Food Control*, 114.
- Yang, X., Huang, E., Yuan, C. H., Zhang, L. W., & Yousef, A. E. (2016). Isolation and structural elucidation of Brevibacillin, an antimicrobial Lipopeptide from *Brevibacillus laterosporus* that combats drug-resistant gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(9), 2763–2772.
- Yeh, R. Y., Shiu, Y. L., Shei, S. C., Cheng, S. C., Huang, S. Y., Lin, J. C., & Liu, C. H. (2009). Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(1), 26-32.
- Yousefi, M., Khorshidian, N., & Hosseini, H. (2020). Potential application of essential oils for mitigation of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry products front. *Frontiers in Nutrition*, 7.
- Yu, H., Ren, X., Liu, Y., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., & Yao, W. (2019). Extraction of *Cinnamomum camphora* chvar. *Borneol* essential oil using neutral cellulase assisted-steam distillation: optimization of extraction, and analysis of chemical constituents. *Industrail Crops and Production*, 141.
- Zhang, L. L., Zhang, L. F., Xu, J. G., & Hu, Q. P. (2017). Comparison study on antioxidant, DNA damage protective and antibacterial activities of eugenol and isoeugenol against several foodborne pathogens. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1353356,

Ziani, K., Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D. J. (2011). Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 6247–6255.

Appendix A. Supplementary Material

Chemical constituents identified in the essential oils of oregano (*Origanum vulgare*), white thyme (*Thymus vulgaris*), Chinese pepper (*Litsea cubeba*), and Clove leaf (*Eugenia caryophyllus*).

Retention time	Constituent	RI _{cal}	Kovats Index	Amount (%)
Oregano essential oil				
6.211	α - Thujene	924	924	0.48
6.452	α - Pinene	932	932	1.41
6.944	3-Carene	949	-	0.11
7.791	β - Pinene	978	974	0.15
8.047	Myrcene	986	988	0.70
9.063	α -Terpinene	1016	1014	0.58
9.334	ρ- Cymene	1023	1020	15.8
10.596	γ-Terpinene	1056	1054	6.19
12.197	Linalool	1098	1095	1.48
20.458	Thymol	1289	1289	3.06
20.890	Carvacrol	1298	1298	69.53
25.991	(E)-Caryophyllene	1418	1417	0.51
White thyme essential oil				
6.210	α - Thujene	924	924	0.18
6.452	α - Pinene	932	932	1.84
6.944	Camphene	949	946	0.45
8.045	Myrcene	986	988	0.95
9.063	α - Terpinene	1016	1014	0.55
9.348	ρ- Cymene	1023	1020	29.41
9.658	1,8-cineol	1031	1026	0.32
10.597	γ-Terpinen	1056	1054	6.81
12.197	Linalol	1098	1095	3.90
14.273	Camphor	1146	1141	0.59
15.337	Borneol	1171	1165	0.95
15.689	4-Terpineol	1179	1186	0.71
20.525	Thymol	1290	1289	47.82
20.824	Carvacrol	1297	1298	4.27
25.992	(E)-Caryophyllene	1418	1417	1.25
Chinese pepper essential oil				
6.454	α - Pinene	932	932	1.25
6.949	Camphene	949	946	0.18
7.596	Sabinene	971	969	0.48
7.793	β - Pinene	978	974	0.76
7.898	Hept-5-en-2-one <6-methyl->	981	981	0.54
8.047	Myrcene	986	988	0.07
9.519	Limonene	1028	1024	14.19
9.659	1,8- cineol	1031	1026	0.72
12.201	Linalool	1098	1095	0.67
18.185	Neral	1237	1235	34.66
19.489	Citral	1267	1264	46.48
Clove leaf essential oil				
23.207	Eugenol	1352	1356	90.19
26.000	(E)-Caryophyllene	1418	1417	9.81

RI_{cal}; Calculated Retention Index.

ANEXO**ANEXO A - Ficha de avaliação sensorial**

NOME: _____

Gênero: () Feminino () Masculino

Faixa etária: () 18 a 25 anos () 26 a 35 anos () 36 a 45 anos () 46 a 60 anos () acima de 60 anos

Profissão: _____

Naturalidade (cidade de origem): _____ Estado: _____

Escolaridade:

- () Ensino Fundamental incompleto
- () Ensino Fundamental completo
- () Ensino Médio incompleto
- () Ensino Médio completo
- () Curso Superior incompleto
- () Curso Superior completo
- () Pós-graduação

Renda Familiar Mensal (soma da renda mensal dos componentes familiares do mesmo domicílio):

- () até R\$ 1045,00
- () entre R\$ 1045,01 e R\$ 2090,00
- () entre R\$ 2090,01 e R\$ 3135,00
- () entre R\$ 3135,01 e R\$ 6270,00
- () entre R\$ 6270,01 e R\$ 10450,00
- () entre R\$ 10450,01 e R\$ 15675,00
- () maior que R\$ 15675,01

Consome produtos cárneos?

- () Sim
- () Não

Quais?

Frequência de consumo de mortadela:

- () diariamente
- () 4 a 6 vezes por semana
- () 2 a 3 vezes por semana
- () 1 vez por semana
- () 2 a 3 vezes por mês
- () 1 vez por mês
- () menos de uma vez por mês
- () não consumo

Prove a amostra, indique utilizando a escala hedônica o quanto você gostou ou desgostou da amostra, e descreva suas percepções em relação a cada atributo:

Amostra n^o: _____

Nota Aparência: ____	Nota Aroma: ____	Nota Textura: ____	Nota Sabor: ____	Nota Impressão Global: ____
Descrição:	Descrição:	Descrição:	Descrição:	Descrição:

Atribua uma nota de intenção de compra para essa amostra: _____

Prove a amostra, indique utilizando a escala hedônica o quanto você gostou ou desgostou da amostra, e descreva suas percepções em relação a cada atributo:

Amostra n^o: _____

Nota Aparência: ____	Nota Aroma: ____	Nota Textura: ____	Nota Sabor: ____	Nota Impressão Global: ____
Descrição:	Descrição:	Descrição:	Descrição:	Descrição:

Atribua uma nota de intenção de compra para essa amostra: _____

Prove a amostra, indique utilizando a escala hedônica o quanto você gostou ou desgostou da amostra, e descreva suas percepções em relação a cada atributo:

Amostra n^o: _____

Nota Aparência: ____	Nota Aroma: ____	Nota Textura: ____	Nota Sabor: ____	Nota Impressão Global: ____
Descrição:	Descrição:	Descrição:	Descrição:	Descrição:

Atribua uma nota de intenção de compra para essa amostra: _____

Prove a amostra, indique utilizando a escala hedônica o quanto você gostou ou desgostou da amostra, e descreva suas percepções em relação a cada atributo:

Amostra n^o: _____

Nota Aparência: ____	Nota Aroma: ____	Nota Textura: ____	Nota Sabor: ____	Nota Impressão Global: ____
Descrição:	Descrição:	Descrição:	Descrição:	Descrição:

Atribua uma nota de intenção de compra para essa amostra: _____

Prove a amostra, indique utilizando a escala hedônica o quanto você gostou ou desgostou da amostra, e descreva suas percepções em relação a cada atributo:

Amostra n^o: _____

Nota Aparência: ____	Nota Aroma: ____	Nota Textura: ____	Nota Sabor: ____	Nota Impressão Global: ____
Descrição:	Descrição:	Descrição:	Descrição:	Descrição:

Atribua uma nota de intenção de compra para essa amostra: _____

Escala hedônica de aceitação:

<p>9 Gostei extremamente</p> <p>8 Gostei muito</p> <p>7 Gostei moderadamente</p> <p>6 Gostei ligeiramente</p> <p>5 Nem gostei/nem desgostei</p> <p>4 Desgostei ligeiramente</p> <p>3 Desgostei moderadamente</p> <p>2 Desgostei muito</p> <p>1 Desgostei extremamente</p>

Escala de intenção de compra:

<p>5 Certamente compraria</p> <p>4 Provavelmente compraria</p> <p>3 Talvez compraria / Talvez não compraria</p> <p>2 Provavelmente não compraria</p> <p>1 Certamente não compraria</p>
--