



JULIANA JUNQUEIRA PINELLI

**USO DE NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO
CONTROLE DE *Clostridium sporogenes* EM MORTADELA**

**LAVRAS – MG
2018**

JULIANA JUNQUEIRA PINELLI

USO DE NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE
Clostridium sporogenes **EM MORTADELA**

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

Prof. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora
Prof. Dr. Eduardo Mendes Ramos
Coorientador

LAVRAS – MG

2018

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

Pinelli, Juliana Junqueira.

Uso de nanoemulsões de óleos essenciais no controle de
Clostridium sporogenes em mortadela / Juliana Junqueira Pinelli. -
2018.

115 p. : il.

Orientador (a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Coorientador (a): Eduardo Mendes Ramos.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Nanoemulsões. 2. Conservantes naturais. 3. *Clostridium*
sporogenes. I. Piccoli, Roberta Hilsdorf. II. Ramos, Eduardo
Mendes. III. Título.

JULIANA JUNQUEIRA PINELLI

**USO DE NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE
Clostridium sporogenes EM MORTADELA**

**USE OF NANOEMULSIONS OF ESSENTIAL OILS IN THE CONTROL OF
Clostridium sporogenes IN MORTADELLA**

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

APROVADA em 26 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Hilário Cuquetto Mantovani

UFV

Prof. Dr. Eduardo Mendes Ramos

UFLA



Prof. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

LAVRAS – MG

2018

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me iluminado nesta trajetória e me dado forças nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Lucila e Antônio, por sempre me apoiarem e terem me ensinado tudo aquilo que sei hoje. Pelo amor incondicional e incentivo. Sem vocês eu nada seria! Amo vocês!

Ao meu companheiro Daniel, por todo amor, carinho, compreensão e apoio em toda essa jornada que juntos percorremos. Te amo!

À minha prima Tatiana, pela amizade, carinho, incentivo e ajuda nos momentos desesperadores.

À toda a minha família e amigos, por estarem sempre presentes me apoiando nos bons e maus momentos.

À professora Roberta, pela paciência, pelo carinho e amizade, pelos ensinamentos e sugestões transmitidas, contribuindo assim para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao professor Eduardo, pela orientação e ensinamentos dados, contribuindo de forma significativa para realização deste projeto.

Aos meus colegas de laboratório, Heloísa, Monique, Michelle, Jéssica, Mariana, Letícia, Tenille, Raquel, Bruna, Sabrina, Mônica, Anderson, Lívio, Silas e Jorge, que se tornaram grandes amigos, compartilhando comigo suas experiências e ensinamentos, me incentivando e apoiando nos momentos de dificuldades. Em especial, as colegas Heloísa, Monique e Michelle, sem a ajuda de vocês não seria possível a realização deste trabalho!

À Eliane, técnica do laboratório, pelos auxílios e ensinamentos transmitidos.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização do mestrado.

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Meu muito obrigada!

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho avaliar a atividade antimicrobiana de combinações de óleos essenciais de canela, limão Taiti, orégano, cardamomo e pimenta-chinesa, e de nanoemulsões baseadas nestas combinações, no controle de *Clostridium sporogenes* inoculado em mortadela e sua influência sobre as características tecnológicas do produto. A concentração mínima bactericida (CMB) de cada óleo foi determinada utilizando-se o método de diluição em caldo. As CMB encontradas foram: 0,05% para o óleo essencial de orégano; 0,10% para os óleos essenciais de canela e pimenta-chinesa; e 1,00% para os óleos essenciais de limão Taiti e cardamomo. As análises microbiológicas das mortadelas foram realizadas durante 20 dias, com intervalo de 5 dias para cada análise, com armazenamento a 14°C. Já as análises tecnológicas (físico-químicas) das mortadelas, foram realizadas após 1, 21 e 30 dias de processamento, sob armazenamento de 4°C. Foram avaliados o pH, nitrito residual, oxidação lipídica, atividade de água e cor de cinco tratamentos: controle (75 ppm de nitrito); Tratamento 1 (75 ppm de nitrito, 0,115% óleo de limão Taiti, 0,115% óleo de cardamomo, 0,0025% óleo de pimenta-chinesa); Tratamento 2 (75 ppm de nitrito, 0,015% óleo de canela, 0,24% óleo de cardamomo, 0,015% óleo de pimenta-chinesa); Tratamento 3 (75 ppm de nitrito + nanoemulsão constituída por 0,0225% óleo de pimenta-chinesa, 1,035% óleo de cardamomo, 1,035% óleo de limão Taiti); Tratamento 4 (75 ppm de nitrito + nanoemulsão constituída por 1,8% óleo de cardamomo, 0,1125% óleo de pimenta-chinesa, 0,1125% óleo de canela). O Tratamento 3 promoveu maior redução de células vegetativas de *C. sporogenes* na mortadela. As combinações de óleos essenciais utilizadas não evitaram a esporulação. Não foram observadas alterações nas características tecnológicas das mortadelas com os tratamentos. Observou-se aumento na atividade de água e no índice de vermelho (a^*) e diminuição no ângulo de tonalidade (H^*) e nitrito residual nas mortadelas com o período de armazenamento. A utilização de óleos essenciais como conservantes naturais em mortadelas pode ser considerada alternativa promissora a substituição parcial de conservantes químicos, uma vez que os tratamentos com óleos essenciais apresentaram maiores atividades antimicrobianas sem alterar as características físico-químicas do produto.

Palavras-chave: *Clostridium sporogenes*. Conservantes naturais. Nanoemulsões. Mortadela.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the antimicrobial activity of essential oils combinations of cinnamon, lemon, oregano, cardamom and Chinese pepper and of nanoemulsions based on these combinations in the control of *Clostridium sporogenes* inoculated in mortadella and its influence on the technological characteristics of the product. The minimum bactericidal concentration (CMB) of each oil was determined using the broth dilution method. The CMB found were: 0,05% for the oregano essential oil; 0,10% for cinnamon essential oil and Chinese pepper essential oil; and 1,00% for lemon essential oil and cardamom essential oil. Microbiological analyzes of mortadella were performed for 20 days, with a 5 day interval for each analysis, with storage at 14°C. The technological analyses (physical-chemical) were performed after 1, 21 and 30 days of processing, under storage at 4°C. The pH, residual nitrite, lipid oxidation, water activity and color of five treatments were evaluated: control (75 ppm nitrite); Treatment 1 (75 ppm nitrite, 0,115% lemon essential oil, 0,115% cardamom essential oil, 0,0025% Chinese pepper essential oil); Treatment 2 (75 ppm nitrite, 0,015% cinnamon essential oil, 0,24% cardamom essential oil, 0,015% Chinese pepper essential oil); Treatment 3 (75 ppm nitrite + nanoemulsion consisting of 0,0225% Chinese pepper essential oil, 1,035% cardamom essential oil, 1,035% lemon essential oil); Treatment 4 (75 ppm nitrite + nanoemulsion consisting of 1,8% cardamom essential oil, 0,1125% Chinese pepper essential oil, 0,1125% cinnamon essential oil). Treatment 3 promoted a greater reduction of *C.sporogenes* vegetative cells in mortadella. The combinations of essential oils used did not prevent sporulation. Regarding the technological characteristics, no significant changes were observed between treatments. It was observed an increase in water activity and red index (a *) and a decrease in the hue angle (H *) and residual nitrite in the mortadellas only with the storage period, with the essential oils not having a significant influence on these parameters. The use of essential oils as natural preservatives in mortadella can be considered a promising alternative to the partial substitution of chemical preservatives, since the treatments with essential oils presented greater antimicrobial activities without altering the physical-chemical characteristics of the product.

Keywords: *Clostridium sporogenes*. Natural additives. Nanoemulsions. Mortadella.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esporo bacteriano típico.....	17
Figura 2 – Imagem de uma microscopia eletrônica de transmissão de esporos de <i>Clostridium sporogenes</i>	17
Figura 3 - Reações de nitrato de sódio e nitrito de sódio durante o processo de cura de produtos cárneos processados.	20
Figura 4 - Alterações químicas da mioglobina durante a reação de cura.	21
Figura 5 - Reações do sistema fosforoclástico.....	22
Figura 6 - Estrutura química de alguns componentes de óleos essenciais.	26
Figura 7 - Estrutura química de alguns componentes representantes dos dois grupos principais de óleos essenciais.	27
Figura 8 - Mecanismo de ação e sítios alvos dos óleos essenciais em células microbianas.	31
Figura 9 - Potenciais aplicações da nanotecnologia nas indústrias de alimentos e embalagens.....	46
Figura 10 - Plaqueamento e incubação em condições de anaerobiose.	53
Figura 11 - Nanoemulsões referentes as combinações 1 e 2 elaboradas.	56
Figura 12 – Preparo das nanoemulsões.	57
Figura 13 - Mortadelas elaboradas e porcionamento destas em fatias para as análises microbiológicas e físico-químicas.	60
Figura 14 - Crescimento de células vegetativas de <i>C. sporogenes</i> em meio SPS ágar após incubação.	61
Figura 15 - Pesos da Análise de Componente Principais (PCA) da ação bactericida sobre <i>Clostridium sporogenes</i> dos diferentes ensaios da combinação 1 (óleo essencial de canela, limão Taiti, cardamomo; e pimenta-chinesa).	71
Figura 16 - Pesos da Análise de Componente Principais (PCA) para os diferentes ensaios da combinação 2 (óleo essencial de orégano, canela, cardamomo e pimenta-chinesa) sobre a inibição de <i>Clostridium sporogenes</i>	72
Figura 17 - Variação da densidade de volume da amostra (%) em função do diâmetro das partículas (μm) da (A) nanoemulsão 1 (TRAT 3) e (B) nanoemulsão 2 (TRAT 4).	75
Figura 18 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da mortadela tratada com a nanoemulsão 1 (TRAT 3) no período de 5 dias de armazenamento com um aumento de 6220x.	81
Figura 19 - Imagem das mortadelas elaboradas com os diferentes tratamentos após 1 dia de fabricação.	88
Figura 20 - Mortadelas elaboradas com os cinco tratamentos durante período de armazenamento (1, 21 e 30 dias).	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparativo entre cepas proteolíticas de <i>Clostridium botulinum</i> e de <i>Clostridium sporogenes</i>	18
Tabela 2 - Combinação de componentes e óleos essenciais e suas interações antimicrobianas contra diversos microrganismos.	30
Tabela 3 – Exemplos de trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos/Unidade de Processamento e Qualidade de Carne da UFLA, buscando estudar a utilização de óleos essenciais como conservantes naturais em produtos cárneos.	34
Tabela 4 - Proporções (em porcentagem) utilizadas na combinação 1 (óleos essenciais de canela, limão Taiti, cardamomo e pimenta-chinesa).	54
Tabela 5 - Proporções (em porcentagem) utilizadas na combinação 2 (óleos essenciais de orégano, canela, cardamomo e pimenta-chinesa).	55
Tabela 6 - Formulação da mortadela utilizada no experimento e as porcentagens dos óleos essenciais, nitrito de sódio, água/gelo e nanoemulsão dos cinco tratamentos de mortadela.	58
Tabela 7 - Concentração mínima bactericida (CMB), em porcentagem, dos diferentes óleos essenciais testados sobre <i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437.	66
Tabela 8 - Proporções (em porcentagem) utilizadas na combinação 1 (óleos essenciais de canela, limão Taiti, cardamomo e pimenta-chinesa) e resposta quanto a atividade antimicrobiana.	69
Tabela 9 - Proporções (em porcentagem) utilizadas na combinação 2 (óleos essenciais de orégano, canela, cardamomo e pimenta-chinesa) e resposta quanto a atividade antimicrobiana.	70
Tabela 10 - Caracterização do diâmetro médio das partículas para os TRAT 3 e TRAT 4.	74
Tabela 11 - Efeito dos tratamentos e dos tempos de armazenamento sobre células vegetativas e <i>Clostridium sporogenes</i> (Log UFC/g) inoculadas em mortadelas adicionadas de 75 ppm de nitrito de sódio e combinações de óleos essenciais ou nanoemulsionados, armazenadas a 14°C durante 20 dias.	77
Tabela 12 - Efeito do tempo de armazenamento sobre o número médio (\pm desvio padrão) de células vegetativas e endósporos de <i>Clostridium sporogenes</i> (Log UFC/g) inoculados em mortadelas adicionadas de 75 ppm de nitrito de sódio e combinações de óleos essenciais ou nanoemulsionados, armazenadas a 14°C durante 20 dias.	78
Tabela 13 - Valores médios (\pm desvio padrão) de pH e atividade de água (<i>A_w</i>) para os tratamentos e tempos 1, 21 e 30 dias.	82
Tabela 14 - Teores médios (\pm desvio padrão) de nitrito residual encontrados para os tempos de armazenamento e para os tratamentos das mortadelas.	83
Tabela 15 - Valores médios (\pm desvio padrão) do índice TBARS para os tratamentos e tempos de armazenamento das mortadelas.	85

Tabela 16 - Valores médios (\pm desvio padrão) da luminosidade (L^*), índice de amarelo (b^*), índice de vermelho (a^*) e índice de saturação (C^*) obtidos para os tratamentos e para os tempos de armazenamento das mortadelas a 4°C.	87
Tabela 17 - Diferença global da cor (ΔE^*) encontrada para os tratamentos em relação ao controle de cada tempo de armazenamento das mortadelas.	90

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA – Análise de Variância
ATCC – American Type Culture Collection
ATP – Adenosina Trifosfato
Aw – Atividade de Água
BHA - Butil Hidroxianisol
BHT - Butil Hidroxitolueno
CMB – Concentração Mínima Bactericida
DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional
DH - Diâmetro Hidrodinâmico Médio das Partículas
DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado
DLS - Dispersão De Luz Estática
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DRCBB – Differential Reinforced Clostridium Base Broth
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FDA – Food and Drug Administration
GRAS - Generally Recognized As Safe
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LPS – Lipopolissacarídeos
MAD – Malonaldeído
MAO - Monoamina Oxidase
MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura
MPa – Megapascal
NaCl – Cloreto de Sódio
NAD - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NMP – Número Mais Provável
NO⁻² - Nitrito
NO⁻³ - Nitrato
O/W – Emulsão do tipo óleo em água
OE's – Óleos Essenciais
PCA - Análise dos Componentes Principais
PDI - Índice de Polidispersidade
PG - Propil Galato
pH – Potencial Hidrogeniônico
ppm – Partes por Milhão
SPS - Sulfite Polymyxin Sulfadiazine
TBA – Ácido Tiobarbitúrico
TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TBHT – Terc-butil-hidroquinona
TCA- Ácido Tricloroacético
TEP - 1,1,3,3-tetraetoxipropano
UFC – Unidades Formadoras de Colônias
UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	<i>Clostridium sporogenes</i>	16
2.2	Nitrato e nitrito de sódio	19
2.3	Óleos essenciais	24
2.3.1	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e sua interação com alimentos	28
2.3.2	Aplicação dos óleos essenciais em produtos cárneos	33
2.3.3	Atividade antioxidante dos óleos essenciais	37
2.4	Descrição botânica de plantas condimentares aromáticas	39
2.4.1	<i>Origanum vulgare</i>	39
2.4.2	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	41
2.4.3	<i>Citrus aurantifolia</i>	42
2.4.4	<i>Elettaria cardamomum</i>	43
2.4.5	<i>Litsea cubeba</i>	44
2.5	Nanoemulsão de óleos essenciais	45
2.6	Matriz Alimentar: Mortadela.....	49
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1	Óleos essenciais	51
3.2	Microrganismo, padronização e manutenção do inóculo	51
3.3	Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB)	52
3.4	Combinações entre óleos essenciais	53
3.5	Preparo das nanoemulsões.....	55
3.6	Fabricação da Mortadela	58
3.7	Enumeração de <i>Clostridium sporogenes</i> nas mortadelas	61
3.8	Análises tecnológicas	62
3.8.1	Atividade de Água	62
3.8.2	pH	62
3.8.3	Concentração de nitrito residual	62
3.8.4	Oxidação lipídica (índice de TBARS)	63
3.8.5	Cor Objetiva	64
3.9	Microscopia Eletrônica de Varredura	64
3.10	Análises Estatísticas.....	65
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1.	Concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais.....	66
4.2.	Concentração mínima bactericida das combinações dos óleos essenciais	68
4.3	Caracterização das nanoemulsões: diâmetro hidrodinâmico médio das partículas e índice de polidispersividade (PDI)	74

4.4	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais combinados e das nanoemulsões incorporadas por eles sobre células vegetativas e endósporos de <i>Clostridium sporogenes</i> inoculado em mortadela.....	76
4.5	Análises Tecnológicas.....	81
5.	CONCLUSÕES	93
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
7.	APÊNDICES	114

1. INTRODUÇÃO

Observa-se, nas últimas décadas, crescente aumento da consciência do consumidor quanto as questões de segurança alimentar e qualidade de vida, visando a diminuição dos surtos de toxinfecções alimentares e elevação da segurança dos alimentos para o consumo. Dentre os principais agentes causadores de toxinfecções alimentares destacam-se as bactérias, sendo as do gênero *Clostridium* relevantes em embutidos cárneos cozidos.

O gênero *Clostridium* compreende várias espécies, dentre elas, *C. botulinum* se destaca por causar toxinose considerada de emergência pública.

Clostridium botulinum é uma bactéria anaeróbia obrigatória, Gram-Positiva, formadora de esporos altamente resistentes ao calor, sendo encontrada em diversos ambientes. É responsável pela produção de importantes neurotoxinas que levam ao desenvolvimento de uma enfermidade de extrema gravidade nos humanos conhecida como botulismo que provoca sérios distúrbios neurológicos e digestivos. Diversos alimentos têm sido descritos como responsáveis pelo botulismo, especialmente alimentos produzidos de forma artesanal, conservados de forma inadequada ou que não sofreram tratamento térmico apropriado inativando os endósporos de *C. botulinum*.

Produtos embalados a vácuo, valores de pH superiores a 4,5, a atividade de água elevada, o ambiente anaeróbico e o fato de apresentarem prévio cozimento, que elimina a microbiota competente, fazem com que os produtos cárneos cozidos curados apresentem as condições necessárias ao crescimento da bactéria.

O controle de *C. botulinum* em produtos cárneos, especialmente os cozidos curados, ocorre pela adição de sais de nitrato e nitrito no produto durante seu processo de fabricação. Além de protegerem o alimento contra a bactéria *C. botulinum* e diversas outras bactérias patogênicas, esses sais contribuem para coloração rósea e sabor característico de produtos cozidos curados; além de exercerem ação antioxidante. Apesar de serem de grande utilização, esses conservantes apresentam risco à saúde humana, desempenhando importante papel na formação de N-nitrosaminas, substâncias consideradas carcinogênicas para os seres humanos. Com isso, tem-se aumentando a percepção negativa de antimicrobianos sintetizados industrialmente utilizados numa vasta gama de alimentos, fazendo então com que se aumente a procura por compostos ditos “naturais” capazes de exercer as mesmas funções antioxidantes e antimicrobianas, porém sem apresentar risco a saúde humana. Neste contexto, os óleos essenciais condimentares e aromáticos se destacam.

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis aromáticos que são reconhecidos como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) e apresentam ampla aplicação pela indústria alimentícia, atuando não só como “conservantes naturais”, mas também como antioxidantes e aromatizantes em diversos produtos. Apesar de seu uso apresentar uma série de vantagens, a aplicação destes óleos em alimentos encontra restrições quanto a sua aceitabilidade sensorial. Quando altas concentrações forem necessárias para se obter a atividade antimicrobiana, podem ser desenvolvidos sabores e odores indesejáveis no alimento. Desta forma, a utilização de nanoemulsões como sistema de entrega de misturas de óleos essenciais pode minimizar o efeito sensorial e aumentar a atividade antimicrobiana. O encapsulamento em nanoescala dos óleos essenciais tem se mostrado efetivo, protegendo-os das interações com os ingredientes dos alimentos e aumentando sua bioatividade devido ao tamanho subcelular das gotas da nanoemulsão, ativando mecanismos de absorção passivo nas células bacterianas.

Apesar de *C. botulinum* ser um microrganismo que merece atenção especial devido a sua patogenicidade e capacidade de contaminação, estudos atuais têm utilizado *Clostridium sporogenes* como seu modelo uma vez que não produz toxinas e é filogeneticamente semelhante ao *C. botulinum* tipo A. *C. sporogenes* apresenta-se na forma de bastonetes Gram-positivos, anaeróbios e formadores de endósporos com semelhanças morfológicas e genéticas com *C. botulinum*.

Diante do exposto, o presente trabalho apresentou como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana sinérgica de combinações de óleos essenciais, assim como avaliar os efeitos antimicrobianos de nanoemulsões baseadas nestas combinações, para controle de *C. sporogenes* em mortadela, buscando assim desenvolver conservante naturais que possam ser utilizados em substituição parcial de sal de nitrito comumente utilizado. A influência da adição das misturas dos óleos essenciais e suas nanoemulsões sobre a concentração de nitrito residual, pH, oxidação lipídica, atividade de água e cor das mortadelas também foram avaliadas.

Deve-se ressaltar que, apesar da adição de óleos essenciais em produtos alimentícios em concentrações mais elevadas alterar as características sensoriais dos produtos, no presente trabalho não foram realizadas análises sensoriais do produto cárneo contendo óleos essenciais ou nanoemulsões elaboradas a partir destes óleos uma vez que o tempo para desenvolvimento do trabalho não foi suficiente para estas análises, sugerindo que trabalhos futuros realizem tais procedimentos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

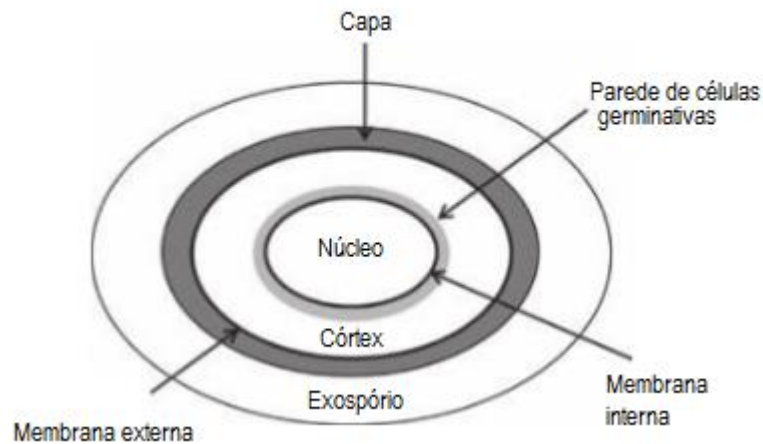
2.1 *Clostridium sporogenes*

Clostridium sporogenes apresentam-se na forma de bastonetes Gram-Positivos, anaeróbios, formadores de esporos e putrefativos (MAH; KANG; TANG, 2009). São capazes de fermentar aminoácidos e liquefazer gelatina, sendo então considerados proteolíticos (ALLISON; MACFARLANE, 1990). Seus esporos são altamente resistentes a temperatura, fato preocupante a indústria alimentícia já que conseguem sobreviver aos mais diversos tratamentos térmicos aplicados (YETIM et al., 2006).

São encontrados em ambientes variados como solos, sedimentos marinhos, lagos de água doce, adubos, produtos lácteos, carnes conservadas, fezes humanas e de animais, infecções em animais domésticos e em humanos e em venenos de serpentes (OLIVEIRA, 2007). Apresentam ainda uma alta resistência a desinfetantes e secagem durante a fase de esporulação, sendo então capazes de sobreviver em condições desfavoráveis (HAAGSMA, 1991).

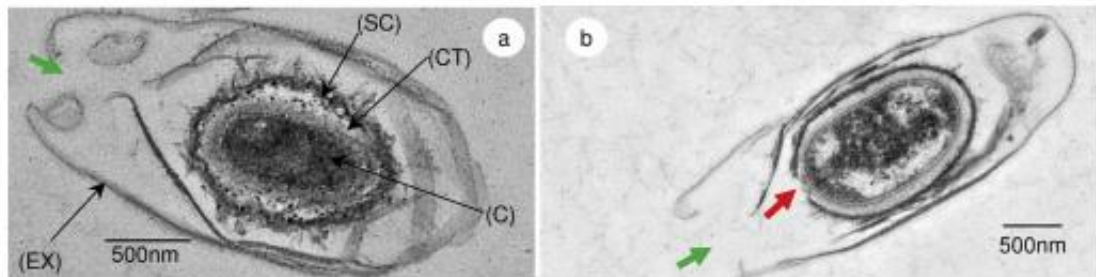
Seus esporos, endósporos, exibem fases morfológicas características uma vez que a fase de dormência é quebrada. Apresentam estruturas semelhantes aos esporos bacterianos típicos (FIGURA 1). A presença de uma camada membranosa externa que reveste o endósporo bacteriano mais estendida em um pólo, o exospório clostridial, é fundamental na germinação bem-sucedida do endósporo, na proliferação vegetativa, na colonização de novos locais e na virulência, sendo constituído por uma série de macromoléculas, como proteínas, que contribuem para estas funções (FIGURA 2). Observa-se ainda a produção de estruturas morfológicas exosporiais muito específicas que parecem facilitar a fixação do esporo ao substrato e a outros esporos num processo de co-agregação (PANESSA-WARREN; TORTORA; WARREN, 1997; JANGANAN et al., 2016). Em muitos países, são considerados indicadores para a presença de microrganismos patogênicos em água potável, além de serem empregados como indicadores biológicos para monitorar a eficácia de diversos processos de esterilização (YANG; PONCE, 2009).

Figura 1 – Esporo bacteriano típico.



FONTE: LEGGETT et al. (2012) com modificações.

Figura 2 – Imagem de uma microscopia eletrônica de transmissão de esporos de *Clostridium sporogenes*.



(a): micrografia eletrônica de transmissão de uma seção transversal de um esporo de *Clostridium sporogenes* com córtex intacto. (CT) córtex; (SC) capas do esporo; (C) núcleo do esporo; (EX) exosporio. (b) Esporo germinando. A seta vermelha indica quebras e distorções do revestimento de esporos. Seta verde indica uma seção aberta no exosporio que pode permitir a liberação da célula recém-formada.

FONTE: BRUNT; CROSS; PECK (2015) com modificações.

Têm sido amplamente utilizados como substitutos da forma proteolítica das bactérias *Clostridium botulinum* na validação de processos térmicos para alimentos estáveis e de baixa acidez, uma vez que são morfologicamente semelhantes e filogeneticamente relacionados, sendo considerados microrganismos mais seguros já que não apresentam a produção de neurotoxinas, fato presente em *Clostridium botulinum*. A Tabela 1 traz algumas semelhanças e diferenças entre cepas proteolíticas de *Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes*. São ainda de fácil detecção por apresentarem odor característico ou formação de gás (BROWN; TRAN-DINH; CHAPMAN, 2012).

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

Características	<i>C. botulinum</i>	<i>C. sporogenes</i>
Produção de neurotoxinas	Sim	Não
Temperatura ótima de crescimento (°C)	37	37
pH mínimo de crescimento	4,6	4,6
Concentração de sal inibitória	>10%	>10%
Atividade de água mínima	0,94	0,94
Produção de esporos	Baixa	Alta
Resistência térmica dos esporos D121°C	0,1-0,2 min	1,2-2,5 min
Presença de proteínas ricas em cisteína (CsxA, CsxB e CsxC) no exospório	Sim	Sim

FONTE: JANGANAN et al. (2016); BROWN, TRAN-DINH E CHAPMAN (2012) E SMITH (1980).

Clostridium botulinum é o agente patogênico formador de esporos mais importante encontrado nos alimentos por produzir potentes neurotoxinas responsáveis por causar o botulismo, doença potencialmente letal. É uma bactéria em forma de bastonete, Gram-positiva e anaeróbia obrigatória, sendo geralmente encontrada em solo, vegetais e fezes humanas e de animais. Os endósporos são formados geralmente sob condições de estresse, sobrevivendo a medidas padrão de cozimento e processamento dos alimentos e germinando em condições propícias com condições anaeróbicas, pH acima de 4,6 e baixo conteúdo de sal e açúcar. Há sete tipos de *C. botulinum* definidos, A-G, cada qual com características antigênicas da neurotoxina que produzem, distribuídos em quatro grupos. Os grupos I e II tem implicações no botulismo em humanos e englobam os tipos A B, E e F. O grupo III tem implicações no botulismo em animais e engloba o tipo C. Já o grupo IV não está normalmente associado com a ocorrência da doença e engloba o tipo G (CERESER et al., 2008; SOBEL, 2005; MOREIRA et al., 2014).

O botulismo é dividido em 4 diferentes formas: botulismo alimentar causado pela ingestão de alimentos contaminados com a toxina botulínica; botulismo de feridas causado pela colonização de ferida pelo *C. botulinum* e produção de toxinas *in situ*; botulismo infantil causado pela colonização intestinal e produção da toxina e o botulismo com toxemia intestinal do adulto, uma forma mais rara de colonização intestinal e produção da toxina em adultos (SOBEL, 2005).

Independentemente da via de exposição, a neurotoxina botulínica pode entrar no sistema circulatório a partir de diferentes sítios periféricos e então ser transportada a junções neuromusculares de neurônios motores onde sua ação destrutiva ocorre. O principal fenômeno

clínico do botulismo é a paralisia flácida aguda, que inicialmente compromete o nervo craniano bilateral envolvendo os músculos dos olhos, rosto, cabeça e faringe, seguindo então, para o comprometimento dos músculos do tórax e extremidades, podendo levar a morte (SMITH, 2009).

Os alimentos descritos como responsáveis pelo botulismo são muitos. Dentre os principais, destacam-se os produtos cárneos embutidos, enlatados, conservas de frutas, legumes e peixes (CARDOSO et al., 2004). Alimentos embalados a vácuo e sem tratamento adequado, possibilitam o desenvolvimento da bactéria e, conseqüentemente, produção da toxina botulínica. Além desses fatores, a temperatura, pH e atividade de água também influenciam no desenvolvimento dessa bactéria no alimento (GELLI; JAKABI; SOUZA, 2002).

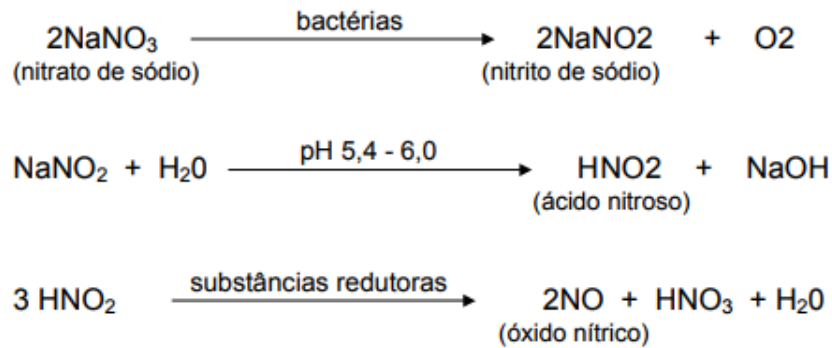
A fim de se evitar a contaminação dos alimentos por essa bactéria, são recomendadas algumas medidas preventivas. Para alimentos refrigerados, por exemplo, adotam-se os seguintes procedimentos: armazenamento em baixas temperaturas, normalmente iguais ou inferiores a 8°C, e vida útil inferior a 10 dias; tratamento térmico a 90°C por 10 min ou letalidade equivalente (por exemplo, 80°C por 129 min, 85°C por 36 min) combinada com armazenamento a baixas temperaturas; pH igual ou inferior a 5 no alimento também combinado com armazenamento a baixas temperaturas; adição de NaCl em concentrações iguais ou superiores a 3,5% em todo o alimento; atividade de água igual ou inferior a 0,97 e adição de nitritos em concentrações superiores a 100 ppm (PECK; STRINGER; CARTER, 2011; SILVA; GIBBS, 2010).

2.2 Nitrito e nitrito de sódio

Os sais de nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) são ingredientes alimentares muito utilizados em diversos produtos, especialmente em produtos cárneos, uma vez que nitritos possuem forte ação antimicrobiana, principalmente sobre *C. botulinum* e *Listeria monocytogenes*. Nitratos, apesar de não possuírem efeitos antimicrobianos sobre estes microrganismos, apresentam sua ação manifestada após serem reduzidos a nitritos em condições anaeróbicas por bactérias pertencentes a microbiota da carne que utilizam a nitrato redutase contendo molibidpterina. Uma vez reduzidos a nitritos, estes reagem com a água em ambientes ácidos, originando ácido nitroso que, por sua vez, se converte a óxido nítrico por ação de substâncias redutoras. O óxido nítrico reage com as proteínas hidrossolúveis da carne, a mioglobina e hemoglobina, conferindo a fixação da coloração rósea características de muitos produtos cárneos. A Figura 3 traz o

sumário das reações químicas mais importantes desde a conversão de nitrato de sódio a nitrito de sódio até a formação do óxido nítrico.

Figura 3 - Reações de nitrato de sódio e nitrito de sódio durante o processo de cura de produtos cárneos processados.



FONTE: FARIA et al. (2001).

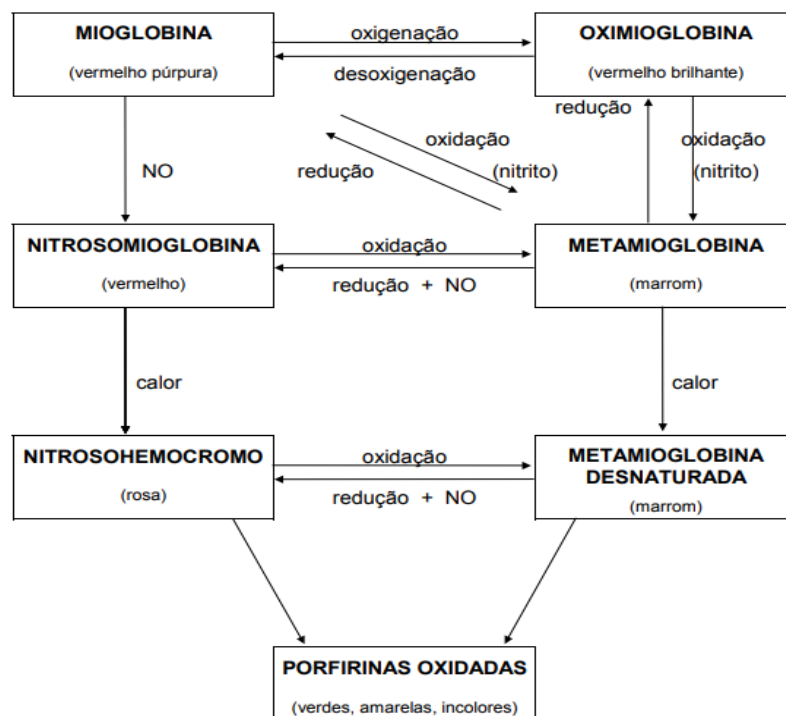
Além da fixação da cor rósea, o nitrito, por apresentar propriedades antioxidantes, retarda a oxidação lipídica e prolonga a vida útil desses produtos. Esses ingredientes são normalmente encontrados em vegetais como espinafre, beterraba, alface e couve, sendo produzidos no solo por ação de microrganismos e seu uso no processamento de produtos cárneos é denominado de cura (KEETON et al., 2009; HUI; NIP; ROGERS, 2001; CAMMACK et al., 1999).

O processo de cura pode ser entendido como uma forma de preservação de produtos alimentares por período maior de tempo, especialmente carnes e peixes processados, pela adição de sais de nitritos/nitratos. Outros ingredientes como açúcares, sal, fosfatos e especiarias também podem ser adicionados durante este processo (SEBRANEK; BACUS, 2007). O nitrito merece atenção especial já que desempenha papel fundamental no sabor característico e na textura final do produto (PEGG; SHAHIDI, 2000).

Em produtos cárneos curados, a coloração rósea característica é um dos principais efeitos da adição de nitrito nestes produtos. Ela é formada a partir de uma série de complexas reações, sendo as mais importantes as do óxido nítrico (que é derivado do ácido nitroso) com os pigmentos heme da carne, levando a formação de nitrosomioglobina e nitrosohemocromo após aquecimento. O óxido nítrico é o principal produto de decomposição do nitrito adicionado na reação de cura.

Em presença de nitrito e outros subprodutos de reação deste composto, os pigmentos da carne podem sofrer diversas alterações que dependem tanto de fatores intrínsecos (pH, potencial de óxido-redução, atividade enzimática) quanto fatores extrínsecos (outros aditivos, acidificação e aquecimento). No momento de preparo da massa cárnea, há a incorporação de ar nos tecidos, levando a oxigenação do pigmento de mioglobina, convertendo-o em oximioglobina, de cor predominante vermelha, com a adição de NO_2/NO_3 . Observa-se a oxidação tanto da oximioglobina quanto da mioglobina, formando metamioglobina de cor marrom. Esta então reage com óxido nítrico (NO), formando o complexo nitrosometamioglobina. Enzimas redutoras ou agentes redutores como ascorbato reduzem esse complexo, formando uma forma termicamente estável chamada nitrosomioglobina que apresenta cor vermelha rosada. Em produtos cozidos, após aquecimento, a nitrosomioglobina é convertida em nitrosohemocromo que apresenta cor rósea característica deste tipo de produto. Esta reação implica na desnaturação da parte protéica da mioglobina, mas fica intacta a estrutura heme unida ao óxido nítrico. A cor do pigmento desnaturado (nitrosohemocromo) é mais estável do que o pigmento nitrosomioglobina, sendo este estável ao calor, porém instável à luz e oxidações (FARIA et al., 2001; HONIKEL, 2008; PEGG; SHAI, 2000; ROÇA, 2000). A Figura 4 traz o sumário das alterações químicas da mioglobina durante a reação de cura.

Figura 4 - Alterações químicas da mioglobina durante a reação de cura.

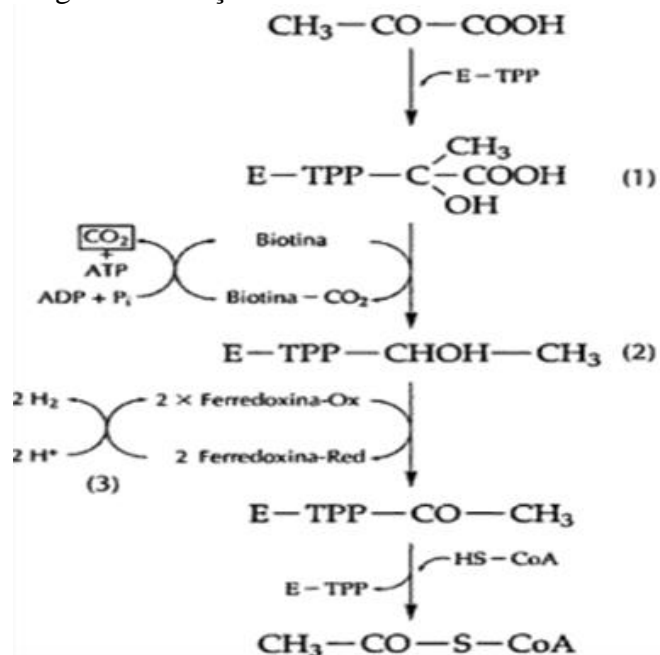


FONTE: PRICE; SCHWEIGERT (1994).

Os nitritos e nitratos podem apresentar uma série de mecanismos de ação antimicrobiana: podem agir em enzimas e proteínas; no sistema genético; nas membranas e paredes celulares e na ligação de nutrientes essenciais. Por exemplo, o óxido nítrico pode atuar sobre as enzimas aconitases, pertencentes ao Ciclo de Krebs e fundamentais na interconversão de citrato e isocitrato, inativando-as e levando a diminuições na síntese de ATP. Ácido nitroso pode reagir com tióis, produzindo nitrosotióis, que podem impedir a ação da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, alterando também a síntese de ATP. O óxido nítrico também pode atuar sobre ribonucleotídeos redutases, enzimas essenciais para a formação do DNA. O nitrato pode desativar grupos importantes para a viabilidade celular, como sulfidrilas, presentes na membrana celular, causando danos permanentes a ela (CAMMACK et al., 1999).

Uma importante via de obtenção de energia de espécies do gênero *Clostridium* denominada sistema fosforoclástico se mostra bastante afetada pela presença dos nitritos. Essa é uma das vias principais utilizadas por muitas bactérias deste gênero para síntese de ATP em nível de substrato, onde se observa uma clivagem oxidativa do piruvato a acetato. Ela é uma via dependente da ação de duas enzimas ferro-enxofre envolvidas no transporte de elétrons e nas reações de oxidação-redução: ferredoxina e piruvato-ferredoxina oxidoreductase (FIGURA 5).

Figura 5 - Reações do sistema fosforoclástico.



A ferredoxina é uma proteína de baixo peso molecular cuja função é exclusivamente carrear elétrons, transferindo-os da piruvato desidrogenase para hidrogenase na formação de hidrogênio. A piruvato-ferredoxina oxidorreductase catalisa a descarboxilação oxidativa do piruvato a acetil-CoA com produção de gás carbônico. A adição de nitrito de sódio em meios contendo microrganismos pertencentes a este gênero, como o *C. botulinum*, resulta na inibição do sistema fosforoclástico por meio da reação do nitrito com os centros ferro-enxofre destas enzimas, resultando na formação de um complexo ferro-óxido nitroso que inativa estas enzimas. Essa inibição afeta principalmente o transporte de elétrons envolvidos na redução do NAD e produção de hidrogênio; a síntese de ATP e interfere em praticamente todas as reações de oxidação-redução do metabolismo bacteriano, fazendo assim com que a célula bacteriana entre em colapso (CARPENTER; REDDY; CORNFORTH, 1987; WOODS; WOOD; GIBBS, 1981).

O nitrito também possui atividade antioxidante devido, principalmente, a quatro mecanismos de ação: ação quelante sobre os metais catalíticos da oxidação; capacidade de combinar-se e estabilizar as insaturações dos ácidos graxos; capacidade de se associar aos íons de ferro, impedindo que atuem como catalisadores da oxidação lipídica (observa-se a formação de compostos estáveis entre o nitrito e grupo heme da mioglobina, mantendo-se os níveis de Fe^{2+} e evitando que ele seja oxidado a Fe^{3+} , um catalisador das reações de oxidação lipídica) e reação com constituintes da carne que formam compostos nitrosos que possuem ação antioxidante (ARENDET; SKIBSTED; ANDERSEN, 1997). São necessários cerca de 20 a 60 ppm de nitrito para que este desenvolva esta ação (PEGG; SHAIDI, 2000).

Apesar de possuírem ampla aplicação na indústria de alimentos, sua utilização apresenta sério problema a saúde humana: está associado a efeitos tóxicos e carcinogênicos quando ingerido em elevadas concentrações. Em produtos cárneos curados, pode haver a formação de N-nitrosaminas (substâncias químicas com alto poder carcinogênico, tóxico, mutagênico, neuro e nefrotóxico) a partir da reação de aminas e aminoácidos presentes na carne com o agente nitrosante anidrido nitroso (oriundo do ácido nitroso que, por sua vez, vêm do nitrito de sódio adicionado inicialmente) em altas temperaturas. Podem ainda ser formadas nos alimentos, durante seu armazenamento ou preparo ou em ambiente ácido, como o estômago. O pH ótimo para a reação de nitrosaminação é entre 2,5 a 3,5. Fatores como método de cozimento, concentração de precursores de nitrosaminas, conteúdo de umidade, temperatura e tempo de fritura, entre outros, podem interferir na concentração de compostos N-nitrosos nos alimentos

(DUTRA; RATH; REYES, 2007; PARTHASARATHY; BRYAN, 2012; RYWOTYCKI, 2002; MIRVISH, 1975; IAMARINO et al, 2015; ALABURDA; NISHIHARA, 1998).

Alimentos crus, de origem vegetal ou animal (vegetais, carnes, peixes, frutas e cereais), normalmente contêm baixos níveis de compostos N-nitrosos. Entretanto, quando se realiza o processo de cura do alimento, onde há a adição de nitrito/nitrato, o nível destes compostos aumenta consideravelmente (CASSENS, 1997; SINDELAR; MILKOWSKI, 2011).

Segundo a Legislação Brasileira, 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).

2.3 Óleos essenciais

Óleos essenciais (OE's) são compostos complexos, voláteis e naturais, caracterizados por forte odor, apresentando ampla aplicação como condimentos alimentares. Podem ser também chamados de óleos etéreos ou essências. Recebem essa denominação por serem geralmente substâncias líquidas de aparência oleosa em temperatura ambiente. São obtidos de plantas aromáticas, sendo formados, geralmente, em células especiais ou grupo de células, encontradas em folhas e caules, e comumente concentradas em uma região particular como folhas, casca ou fruto. Podem ser obtidos por meio de fermentações, extração ou destilação a vapor e destacam por possuírem aroma intenso e agradável, sendo utilizados para acentuar gosto ou aroma de alguns alimentos. São solúveis em solventes orgânicos apolares, apresentando solubilidade limitada em água, mas suficiente para aromatizar essas soluções, denominadas hidrolatos (SIMÕES et al., 2007; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; JAYASENA; JO, 2013).

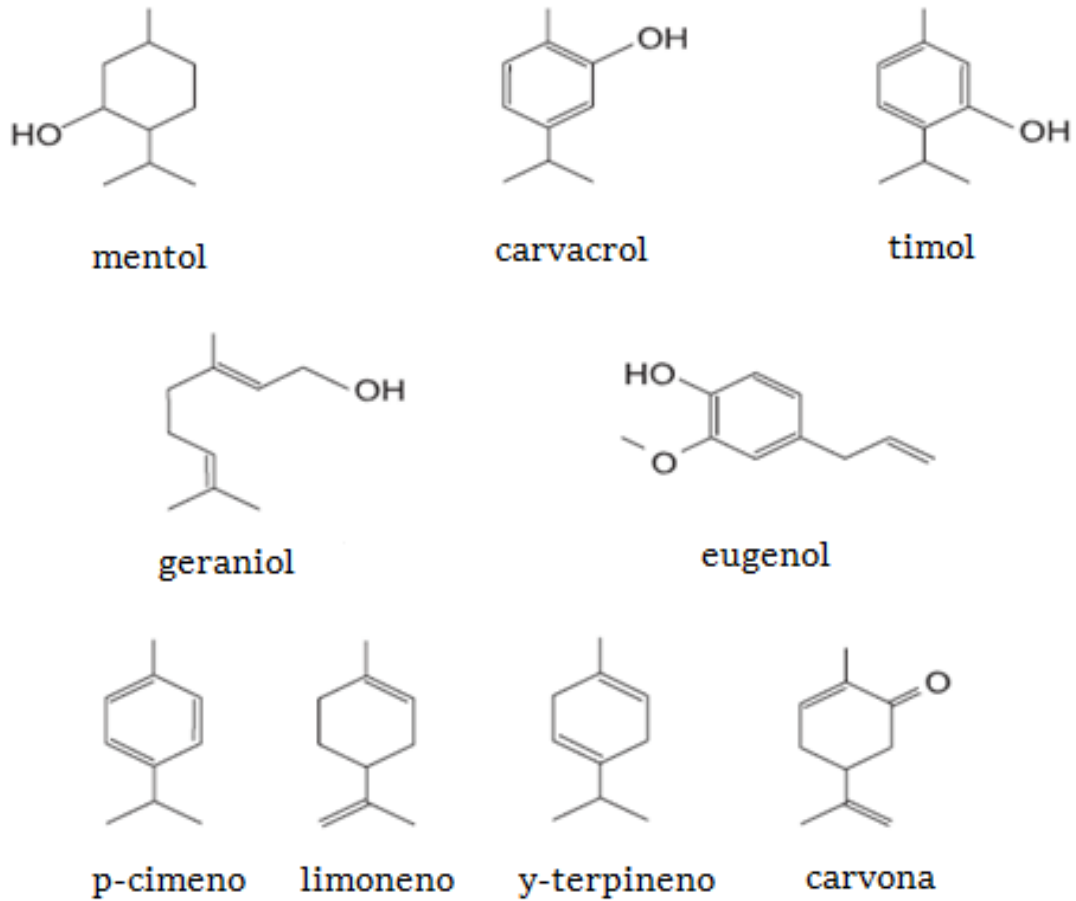
Os óleos essenciais são formados no metabolismo secundário das plantas, possuindo, em sua grande maioria, atividade antimicrobiana, antifúngica e antioxidante. São conhecidos, aproximadamente, 3.000 óleos essenciais, dos quais 300 são utilizados nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, sanitárias, perfumaria e de cosméticos (MAGWA et al., 2006; NEDOROSTOVA et al., 2009).

Aproximadamente, 60% destes óleos presentes em plantas medicinais, ervas e condimentos apresentam propriedades antifúngicas e 35% propriedades antibacterianas e por isso apresentam grande potencial para serem utilizados como conservantes naturais em alimentos industrializados (GUERRA et al., 2012).

Os metabólitos secundários costumam representar interface química entre as plantas e o ambiente circundante, dessa forma síntese é afetada por condições ambientais como temperatura, disponibilidade hídrica, nutrientes, altitude, entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Os principais grupos de metabólitos secundários encontrados que possuem atividade biológica são flavonoides, taninos, alcaloides, quinonas e os óleos essenciais (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais são constituídos, em geral, por misturas de compostos de baixo peso molecular como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácido orgânicos fixos, em diferentes concentrações, onde, normalmente um composto farmacologicamente ativo é majoritário (SANTURIO et al., 2007; BAJPAI; BAE; KANG, 2012). Podem apresentar mais de 60 componentes individuais, sendo que os principais podem corresponder a até 85%, enquanto os demais componentes estão presentes apenas em traços. Os compostos fenólicos são, em geral, os responsáveis por sua atividade antibacteriana. Os compostos presentes em baixas concentrações podem desempenhar papel crítico nessa atividade, possivelmente, pelo efeito sinérgico entre eles e os outros componentes (BURT, 2004). A Figura 6 apresenta a estrutura química de alguns componentes dos óleos essenciais com atividade antimicrobiana.

Figura 6 - Estrutura química de alguns componentes de óleos essenciais.



FONTE: BURT (2004) com modificações.

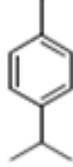
Os componentes dos óleos essenciais normalmente são divididos em dois grupos: compostos aromáticos e compostos derivados de terpenos. Os compostos aromáticos são derivados de fenilpropano na natureza, que são aldeídos, álcoois, fenóis, metoxi e dioxi de metileno. Os compostos derivados de terpenos apresentam ocorrência natural em plantas, sendo considerados os componentes principais da maioria dos OE's (BAJPAI; BAE; KANG, 2012). A Figura 7 apresenta alguns componentes pertencentes aos dois grupos principais.

Figura 7 - Estrutura química de alguns componentes representantes dos dois grupos principais de óleos essenciais.

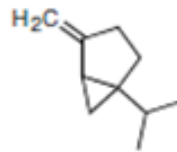
1. Terpenos

- monoterpenos

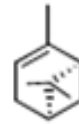
Cimeno ("y") ou p-cimeno



Sabineno



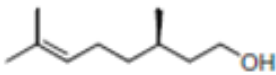
Alfa-pineno



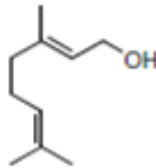
Betapineno



Álcool acíclico
Citronelol

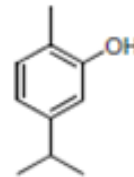


Geraniol

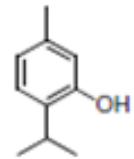


Fenol

Carvacrol

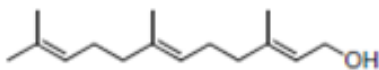


Timol



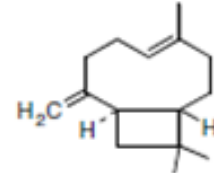
- Sesquiterpenos

Farnesol



Álcool

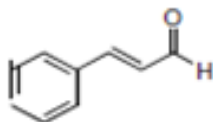
Cariofileno



2. Compostos aromáticos

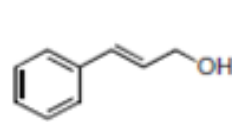
Aldeído

Cinamaldeído



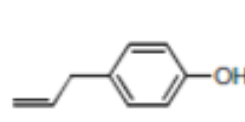
Álcool

Cinamil álcool



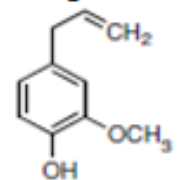
Fenol

Cavicol



Fenol

Eugenol



FONTE: BAKKALI et al. (2008) com modificações.

Devido às diferenças existentes entre os grupos de compostos químicos que constituem os óleos essenciais, é provável que sua atividade antibacteriana não seja atribuída a um mecanismo específico, mas sim a vários mecanismos de ação com diferentes alvos celulares. Por serem considerados GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (U.S FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2006) e já estarem presentes na dieta humana há séculos como condimentos alimentares, podem ser utilizados em diversos alimentos, sendo alternativa ao uso de conservantes químicos sintéticos.

2.3.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e sua interação com alimentos

A segurança alimentar é um parâmetro de suma preocupação tanto por parte dos consumidores quanto por parte da indústria de alimentos. Os principais contaminantes microbiológicos de alimentos, na maioria das situações, são as bactérias, uma vez que atuam em diversos tipos de substratos, crescem em diferentes temperaturas, pH e condições ambientais. Em produtos altamente perecíveis, como carnes, torna-se indispensável à utilização de agentes antimicrobianos de forma a preservar a sua qualidade e segurança por período maior de tempo (JING et al., 2014; ANDRADE et al., 2012). Esses agentes antimicrobianos são adicionados aos alimentos em concentrações adequadas de forma a não alterar a sua composição podendo ser adicionados nas várias etapas de processamento (MPOUNTOUKAS et al., 2008).

Diante da atual tendência do mercado de utilizar conservantes seguros como forma de controle de microrganismos, tem-se intensificado o emprego de óleos essenciais para a conservação de alimentos e controle fitossanitário em substituição aos conservantes químicos clássicos utilizados, uma vez que o uso destes conservantes de forma indiscriminada aparece como fator de indução para o aparecimento de cepas microbianas cada vez mais resistentes (ANDRADE et al., 2012; SOUZA et al., 2005).

Diversos estudos têm avaliado a atividade antimicrobiana destes óleos principalmente contra patógenos de origem alimentar. Ruberto et al. (2000) avaliaram as atividades antioxidantes e antimicrobianas dos óleos essenciais de funcho (*Foeniculum vulgare*) e funcho-marítimo (*Crithmum maritimum*) sobre 25 gêneros de bactérias, incluindo patógenos de origem alimentar, encontrando elevada atividade antimicrobiana do óleo essencial de funcho sobre *Brevibacterium linnens*, *Clostridium perfringens*, *Leuconostoc cremoris* e *Staphylococcus aureus*. O óleo essencial de funcho-marítimo, apesar de possuir elevada concentração de hidrocarbonetos monoterpênicos, apresentou baixa atividade antimicrobiana contra praticamente todos os microrganismos testados, apresentando elevada inibição do crescimento de *C. perfringens*. Nevas et al. (2004) avaliaram as atividades antimicrobianas de 13 óleos essenciais de especiarias oriundas da Finlândia contra bactérias patogênicas e deteriorantes, observando que as bactérias do gênero *Clostridium* (*C. botulinum* e *C. perfringens*) foram as mais sensíveis. Oliveira et al. (2011) avaliaram o efeito do óleo essencial de segurelha (*Satureja montana* L.) sobre *C. perfringens* tipo A ATCC 3624, patógeno associado a surtos de toxinfecções alimentares por consumo de produtos cárneos contaminados, inoculado em

mortadelas elaboradas com diferentes níveis de nitrito de sódio, observando atividade do óleo essencial sobre o microrganismo testado tanto nos ensaios *in vitro* quanto no produto cárneo (em concentrações superiores a 1,56%). Valeriano et al. (2012) analisaram os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais de *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum* e *Origanum majorana* contra cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica, *Salmonella enterica* Enteritidis, *L. monocytogenes* e *Cronobacter sakazaki*, demonstrando que estes óleos apresentam atividade antimicrobiana contra estes microrganismos, porém em magnitudes variadas já que os constituintes de cada óleo são diferenciados. Dias et al. (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo, capim-limão, orégano e tomilho contra *C. perfringens* tipo A inoculado em mortadela, observando que todos os óleos apresentaram significativa atividade antimicrobiana, porém o óleo essencial de orégano foi o que se destacou.

Já estão disponíveis no mercado alguns conservantes alimentares contendo óleos essenciais com funções antimicrobianas e antioxidantes. O “DMC base natural” é um conservante de produtos alimentares constituído por mistura de 50% de óleos essenciais extraídos do alecrim, sálvia e citrinus e 50% de glicerol. É produzido pela DOMCA S. A, na Espanha. (MENDOZA-YEPES et al., 1997). Guardian™ Rosemary Extract 201 e Guardian™ Green Tea Extract 20S são conservantes naturais com propriedades antioxidantes extraídos a partir das folhas, respectivamente, de *Rosmarinus officinalis* e *Camellia sinensis*. Estes fazem parte da linha de extratos naturais da Danisco S/A, uma empresa europeia. Entre as produtoras de óleos essenciais no Brasil, pode-se destacar a Ferquima, Raros e Dierberger, que produzem óleos essenciais com fins alimentícios, farmacêuticos, cosméticos e perfumaria (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Apesar de vários componentes dos óleos possuírem alguma ação antibacteriana, a maior parte deles, quando utilizados sozinhos, apresenta baixa atividade e espectro de ação limitado. Esses componentes podem, então, ser combinados com outros, levando a efeitos antagônicos, aditivos ou sinérgicos. Nguefack et al. (2012) avaliaram os efeitos sinérgicos e/ou antagônicos das combinações dos óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), alfavaca (*Ocimum gratissimum*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) contra a produção de duas micotoxinas por *Penicillium expansum* e relataram que, das 23 misturas testadas, 4 apresentaram atividade sinérgica, 1 efeito aditivo e 18 apresentaram efeito antagônico, sugerindo que os componentes que aparecem em menores quantidades também são críticos para a atividade antimicrobiana. Delgado et al. (2004) analisaram os efeitos antimicrobianos do timol e cimeno (constituintes da maioria dos óleos essenciais) contra células vegetativas de *Bacillus cereus*, comprovando que,

quando combinados, o efeito antimicrobiano deles foi maior do que quando utilizados separadamente, demonstrando um sinergismo entre eles. Na Tabela 2 encontram-se alguns exemplos de combinações entre diferentes óleos essenciais e seus efeitos (BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

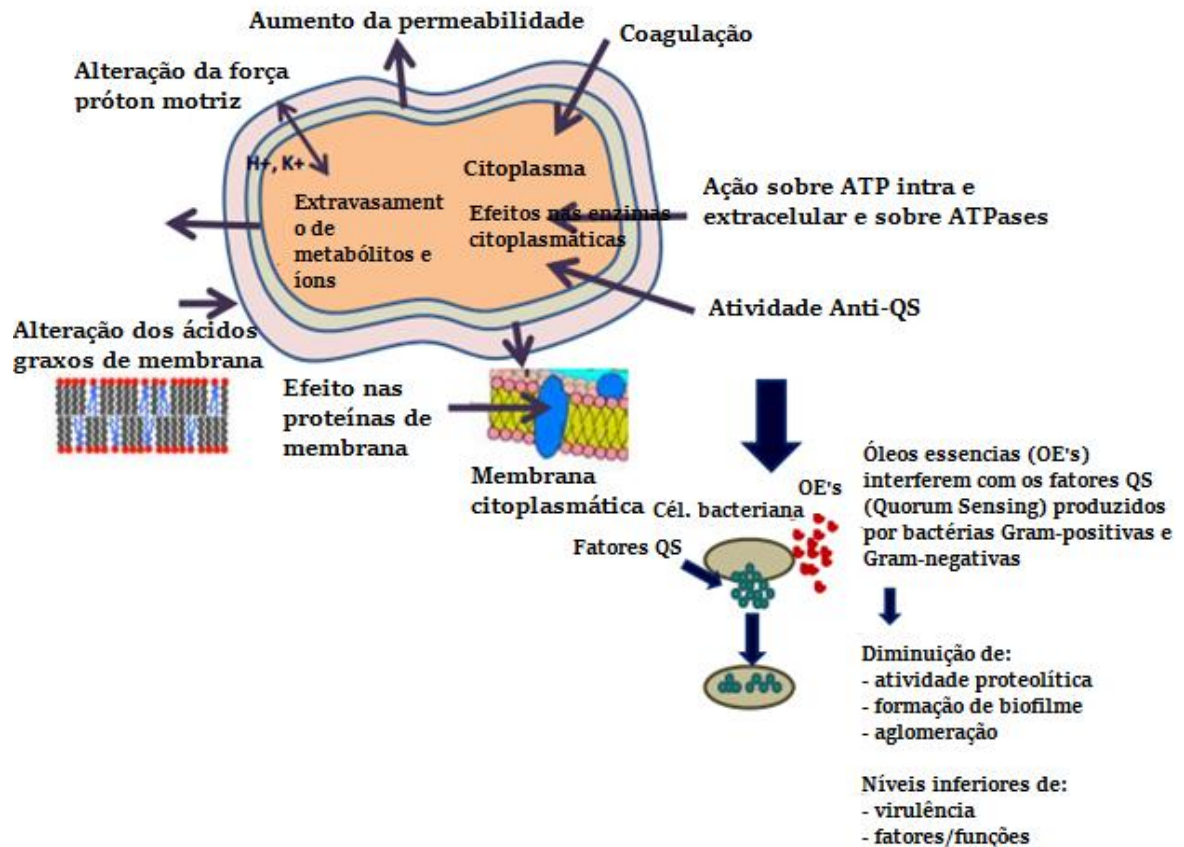
Tabela 2 - Combinação de componentes e óleos essenciais e suas interações antimicrobianas contra diversos microrganismos.

Combinações	Organismos	Interação
Timol/Carvacrol	<i>Staphylococcus aureus</i> ,	Aditiva
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Escherichia coli</i>	Sinérgica
	<i>S. aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> ,	Antagônica
	<i>E. coli</i>	
	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Aditiva
	<i>E. coli</i>	Aditiva
Timol/ Eugenol	<i>Salmonella Typhinurium</i>	Sinérgica
	<i>E. coli</i>	Sinérgica
Carvacrol/ Eugenol	<i>E. coli</i>	Sinérgica
	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> ,	Antagônica
	<i>E. coli</i>	
Carvacrol/Cimeno	<i>B. cereus</i>	Sinérgica
Mentol/Geraniol	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i>	Sinérgica
Cinamaldeído/Carvacrol	<i>E. coli</i>	Aditiva
	<i>S. Typhinurium</i>	Sinérgica
Cinamaldeído/Eugenol	<i>Staphylococcus sp.</i> ,	Aditiva
	<i>Micrococcus sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , e	
	<i>Enterobacter sp.</i>	
1,8- cineol/ Aromadendreno	<i>S. aureus (MRSA)</i> e <i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina	Aditiva

FONTE: BASSOLÉ e JULIANI (2012) com modificações.

Os mecanismos de ação antibacteriana da maioria dos óleos essenciais ainda não foram totalmente elucidados, porém existem alguns mecanismos propostos (Figura 8). Em *Salmonella* e *E. coli*, por exemplo, são observadas alterações morfológicas aparentes: a membrana externa se desintegra após período de exposição ao timol e carvacrol. Em *L. monocytogenes* tratada com timol se observa maior espessamento e ruptura da parede celular, juntamente com aumento na aspereza do material citoplasmático e ausência do citoplasma (FISHER et al., 2008).

Figura 8 - Mecanismo de ação e sítios alvos dos óleos essenciais em células microbianas.



FONTE: NAZZARO et al. (2013) com modificações.

O carvacrol aumenta a fluidez da membrana causando a liberação de prótons e íons de potássio, resultando no colapso do potencial de membrana e inibindo a síntese de ATP. Terpenos (α -pimeno, carvacrol, timol, geraniol, entre outros) agem na parede celular bacteriana, destruindo-a, além de penetrarem na estrutura lipídica da membrana celular, levando a desnaturação de proteínas e destruição desta, causando extravasamento do material citoplasmático, lise celular e conseqüentemente, morte celular. Alguns óleos essenciais, como os de natureza fenólica, também são capazes de permear a membrana mitocondrial, levando a maior permeabilidade da organela e liberação de íons, além de levarem a inibição de propriedades funcionais da célula, causando extravasamento de todo o seu conteúdo interno (FISHER et al., 2008; BAKKALI et al., 2008). Os mecanismos de ação destes componentes se relacionam com sua habilidade em alterar a permeabilidade das células microbianas, danificar a membrana citoplasmática, interferir com o sistema de geração de energia celular (ATP) e interromper a força próton motiva, levando a célula ao colapso e conseqüente morte celular (CALO et al., 2015).

Alguns estudos sugerem que as bactérias Gram-Positivas são mais sensíveis aos óleos essenciais do que as Gram-Negativas, provavelmente devido ao fato de que as bactérias Gram-Negativas possuem uma membrana externa que recobre a membrana citoplasmática e a camada de peptidoglicano, fornecendo maior proteção a célula. Esta membrana é constituída por lipopolissacarídeos (LPS) e glicerofosfolipídeos. LPS é um complexo formado por duas porções, uma lipídica e uma heteropolissacarídica com caráter parcialmente iônico, formando uma camada firme e proporcionando à bactéria superfície hidrofílica. Como resultado, a membrana funciona como barreira a penetração de substâncias hidrofóbicas e macromoléculas (HELANDER; MATTILA-SANDHOLM, 2000). Já as bactérias Gram-Positivas, por não apresentarem essa membrana protetora, são mais susceptíveis a ação dos óleos essenciais.

Apesar dos óleos essenciais serem reconhecidos como seguros (GRAS - *Generally Recognized as Safe*) são pouco utilizados como conservantes por ainda terem que ser utilizados em elevadas concentrações para serem efetivos contra os microrganismos nos alimentos, podendo afetar as características sensoriais dos alimentos como o sabor e aroma, ultrapassando o limiar aceitável para os consumidores (NAZER et al., 2005). Oliveira et al. (2013) relataram atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo e capim-limão contra *L. monocytogenes* presente em carne moída bovina refrigerada, porém estes apresentaram efeitos sensoriais negativos nas concentrações mínimas inibitórias, sugerindo que devem ser utilizados com outras técnicas de preservação.

Os óleos essenciais podem ainda apresentar atividade antimicrobiana reduzida devido a certos componentes presentes nos alimentos, como gorduras, carboidratos, proteínas, sais, água, antioxidantes, entre outros. Elevadas concentrações de proteínas ou gorduras, por exemplo, podem proteger a bactéria por meio da formação de uma camada que absorve o óleo essencial, diminuindo sua concentração e efetividade na fase aquosa. O mesmo não é observado com carboidratos. Por outro lado, altas concentrações de água ou sais podem facilitar a ação dos óleos (PERRICONE et al., 2015; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008).

Elevadas disponibilidades de nutrientes nos alimentos se comparado aos meios de cultura preparados em laboratórios podem fazer com que as bactérias atinjam sua taxa de replicação máxima e tenham acesso aos nutrientes disponíveis, sendo capazes de reparar os danos celulares mais rapidamente. Essas células também podem apresentar sua resistência aumentada quando enfrentam condições de estresse (GILL et al., 2002).

Valores de pH, temperatura e a concentração de microrganismos também podem afetar a bioatividade do óleo essencial. Em baixo pH, por exemplo, alguns componentes de óleos

essenciais se encontram, predominantemente, em sua forma não dissociada, mais hidrofóbicos e penetram mais facilmente na célula, ligando-se em regiões hidrofóbicas das proteínas de membrana e se dissolvendo melhor na fase lipídica da membrana bacteriana. A solubilidade dos óleos essenciais e seus constituintes hidrofóbicos em água também aparece como sendo uma das maiores limitações da sua atividade em sistemas alimentares (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; JUVEN et al., 1994).

Logo, maiores estudos precisam ser realizados afim de se determinar quais óleos essenciais e quais concentrações podem ser utilizadas nos alimentos sem apresentar riscos à saúde humana; como minimizar os efeitos das interações entre eles e os componentes da matriz alimentar e como reduzir os efeitos sensoriais sem afetar sua ação antimicrobiana.

2.3.2 Aplicação dos óleos essenciais em produtos cárneos

A indústria de carnes e produtos cárneos tem enfrentado sérios desafios na preservação segura destes alimentos, uma vez que suas características intrínsecas favorecem rápido crescimento microbiano. Esses alimentos são compostos por, basicamente, gorduras, proteínas, minerais, carboidratos, vitaminas e água. Esses constituintes aliados a elevada atividade de água e pH favorável ao crescimento de microrganismos faz com que os produtos cárneos sejam excelentes meios de cultura para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes (CARDOSO; ARAÚJO, 2003; BERKEL; BOOGAARD; HEIJNEN, 2004).

Normalmente, os microrganismos associados a deterioração de carnes e produtos cárneos incluem bactérias como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Leuconostoc* spp., *Klebsiella*, *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus* spp., *Enterobacter*, fungos filamentosos como *Rhizopus*, *Fusarium* e *Arpergillus* e leveduras como *Candida* e *Torulopsis*. Estes microrganismos causam defeitos na qualidade da carne, como os “off-flavor” e “off-odor”. Já os microrganismos causadores de diversas doenças de origem alimentar associados a produtos cárneos são normalmente bactérias, como *Clostridium* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *B. cereus* e *S. aureus*. Estes microrganismos representam motivo de preocupação para saúde pública e de diversos problemas econômicos em muitos países ao longo das últimas décadas (AMINZARE et al., 2016).

Como forma de inibir os patógenos causadores de doenças alimentares e prolongar a vida útil dos produtos, tem se buscado agentes antimicrobianos naturais que possam substituir

os químicos sintéticos ou antibióticos utilizados que causam efeitos adversos. Alguns antimicrobianos naturais utilizados em produtos cárneos incluem bacteriocinas, lisozima, óleos essenciais e extratos de plantas variadas (HERNÁNDEZ-OCHOA et al., 2014).

O uso de óleos essenciais como conservantes naturais em produtos cárneos tem sido relatado em diversos trabalhos, muitos deles realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos – UFLA, como parte de consolidada linha de pesquisa que busca estudar a influência de compostos naturais sobre o desenvolvimento e controle de microrganismos em alimentos (TABELA 3).

Tabela 3 – Exemplos de trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos/Unidade de Processamento e Qualidade de Carne da UFLA, buscando estudar a utilização de óleos essenciais como conservantes naturais em produtos cárneos.

Trabalhos desenvolvidos	Autores
Sinergismo antimicrobiano de óleos essenciais e nitrito sobre <i>Clostridium sporogenes</i> inoculado em fiambre de peito de frango (Dissertação).	Martins (2016)
Misturas de óleos essenciais e seus compostos majoritários na conservação de apesuntados inoculados com <i>Clostridium sporogenes</i> (Dissertação).	Simões (2016)
Phenolic carvacrol as a natural additive to improve the preservative effects of high pressure processing of low-sodium sliced vacuum-packed turkey breast ham.	Oliveira et al. (2015)
Antimicrobial activity of essential oils on <i>Clostridium perfringens</i> type A inoculated in mortadella.	Dias et al. (2015)
Viabilidade de <i>Clostridium difficile</i> em mortadela adicionada de óleos essenciais e teor reduzido de nitrito de sódio (Tese).	Dias (2015)
Análise química e potencial antimicrobiano de óleos essenciais sobre <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica na conservação de carne moída (Dissertação).	Souza (2015)
Efeito de óleos essenciais e compostos majoritários sobre endósporos de <i>Clostridium botulinum</i> inoculados em mortadela (Dissertação).	Aleixo (2014)
A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against <i>Salmonella</i> Enteritidis in ground beef during refrigerated storage.	Oliveira, Soares e Piccoli (2013)
Óleos essenciais de plantas condimentares com potencial anti- <i>Shigela flexneri</i> na conservação de carne moída (Dissertação).	Bittencourt (2014)
Atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre <i>Clostridium botulinum</i> inoculado em mortadelas (Dissertação).	Rodrigues (2014)
Atividade de antimicrobianos naturais sobre endósporos de <i>Clostridium perfringens</i> em mortadelas (Dissertação).	Martins (2013)
Sensitivity to organic acids <i>in vitro</i> and <i>in situ</i> of <i>Salmonella</i> spp. and <i>Escherichia coli</i> isolated from fresh pork sausages.	Ávila et al. (2013)
Inhibitory activity of <i>Syzygium aromaticum</i> and <i>Cymbopogon citratus</i> (D.C) Staph. Essential oils against <i>Listeria monocytogenes</i> inoculated in bovine ground meat.	Oliveira et al. (2013)

Antioxidant effects of <i>Satureja montana</i> L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite.	Oliveira et al. (2012)
Avaliações microbiológica e físico-química de mortadelas elaboradas com óleos essenciais e inoculados com <i>Clostridium perfringens</i> tipo A (Dissertação).	Dias (2011)
Antimicrobial activity of <i>Satureja montana</i> L. essential oil against <i>Clostridium perfringens</i> type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite.	Oliveira et al. (2011)
Atividade do óleo essencial de segurelha (<i>Satureja montana</i> L.) sobre <i>Clostridium perfringens</i> em sistemas de emulsão cárneas elaborados com diferentes níveis de nitrito (Dissertação).	Oliveira (2010)
Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente à <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis inoculada em carne moída bovina (Dissertação).	Soares (2010)

Martins (2016) analisou o efeito antimicrobiano sinérgico dos óleos essenciais e compostos majoritários de manjeriço, cravo-da-índia, limão Taiti, noz moscada, orégano, pimenta chinesa, tomilho e pimenta preta contra *C. sporogenes* inoculado em fiambre de peito de frango, observando que os tratamentos com estes óleos apresentaram representativa atividade antimicrobiana não alterando as características físico-química do produto. Simões (2016) avaliou o efeito antimicrobiano de misturas de óleos essenciais de canela, cravo-da-índia e orégano e seus respectivos compostos majoritários contra *C. sporogenes* inoculado em apresuntado, concluindo efeito sinérgico entre as combinações de óleos essenciais e compostos majoritários.

Apesar destes estudos comprovarem a ação antimicrobiana destes óleos essenciais, permitindo a utilização como conservantes naturais nos mais diversos produtos cárneos, sua aplicação ainda é limitada devido ao intenso aroma que pode levar a efeitos sensoriais negativos. Como forma de contornar esse problema, pesquisas, como encapsulamento de OE's em nanoemulsões e o uso combinado de óleos essenciais com lisozima, EDTA, nisina, etc., a fim de melhorar estabilidade microbiana e a qualidade sensorial das carnes e produtos cárneos tem sido realizadas (JAYASENA; JO, 2013).

2.3.3 *Atividade antioxidante dos óleos essenciais*

Produtos alimentares que contenham óleos ou gorduras em sua composição estão sujeitos a sofrerem oxidação lipídica, que pode ocorrer durante as seguintes etapas: armazenamento das matérias-primas, processamento, tratamento térmico e armazenamento dos produtos. É uma das principais causas da formação do ranço nos alimentos, levando a sua deterioração. Além disso, produtos da oxidação lipídica podem influenciar outros constituintes dos alimentos, resultando em alterações nas características sensoriais, como sabor e aroma (TOMAINO et al., 2005).

Existem diversos mecanismos de degradação lipídica oxidativa, destacando-se a fotoxidação, autooxidação, oxidação enzimática e reações hidrolíticas. A fotoxidação de gorduras insaturadas é promovida pela radiação UV em presença de sensibilizadores, como a clorofila, riboflavina e mioglobina, envolvendo a participação de oxigênio singleto como intermediário reativo. O que se observa no final é a formação de hidroperóxidos diferentes dos que se observam nos processos que não necessitam de luz e sensibilizadores. O segundo mecanismo citado, a autooxidação, é o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras, sendo um processo dinâmico, complexo e puramente químico, envolvendo reações radiculares capazes de auto-propagação e que dependem do pH, temperatura, radicais livres e íons metálicos. É dividida em três partes (iniciação, propagação e terminação) sendo possível distinguir três etapas de evolução oxidativa: desaparecimento dos substratos de oxidação; aparecimento de peróxidos e hidroperóxidos e aparecimento dos produtos secundários de oxidação como epóxidos e compostos voláteis e não voláteis. O terceiro mecanismo, oxidação enzimática, ocorre por ação da enzima lipoxigenase. Ela atua sobre ácidos graxos poli-insaturados, catalisando a adição de oxigênio a cadeia hidrocarbonada poli-insaturada. Há a formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas que podem levar a formação de diversos produtos. O último mecanismo citado, as reações hidrolíticas, são catalisadas pelas enzimas lipases ou por ação da umidade ou calor, levando a formação de ácidos graxos livres (RAMALHO; JORGE, 2006; SILVA; SILVA, 1999).

A oxidação lipídica leva a perda significativa do valor nutricional dos alimentos, já que leva a perda de vitaminas e ácidos graxos essenciais. Também afeta suas qualidades sensoriais (cor, textura e sabor), causando rejeição por parte dos consumidores e, assim, diminuindo sua vida útil. Como forma de reduzir essa taxa de oxidação, a indústria de alimentos utiliza a refrigeração, congelamento, e atmosfera modificada. Quando não se é possível utilizar estes

métodos, são adicionadas substâncias antioxidantes que agem sem alterar a qualidade do produto (VIUDA-MARTOS et al., 2010).

Os antioxidantes fenólicos sintéticos mais utilizados nos alimentos são BHT (butil hidroxitolueno), BHA (butil hidroxianisol), PG (propil galato), TBHQ (terc-butil hidroquinona) e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Este último atua como um agente quelante, podendo se ligar a metais redutores contribuindo para o processo (BREWER, 2011; VIUDA-MARTOS et al., 2010).

Apesar dos antioxidantes sintéticos apresentarem ampla aplicação, quando utilizados em doses elevadas podem interferir com a saúde do consumidor. Neste contexto, a busca por compostos naturais que exibam propriedades antioxidantes e que não apresentam efeitos nocivos à saúde humana tem se intensificado observando o aumento do interesse nas plantas aromáticas e medicinais como fontes de antioxidantes naturais em substituição dos sintéticos.

Óleos essenciais obtidos de diversas plantas apresentam atividade antioxidante. Essa atividade encontra-se intimamente relacionada com a presença de compostos fenólicos. Outros compostos como flavonóides e terpenóides (como timol, carvacrol e eugenol) também apresentam essa atividade (DEL RÉ; JORGE, 2012).

Os compostos fenólicos são poderosos antioxidantes, atuando nas reações de oxidação lipídica, na redução de oxigênio singlete e na quelação de metais. Estão naturalmente presentes nos vegetais, como frutas. São moléculas que interagem com as espécies radicalares sendo consumidos durante a reação. Atuam ainda como agente antipatogênico e contribuem para a pigmentação das plantas. Nos alimentos, eles são os responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa. Dentre os fenólicos mais comumente utilizados como antioxidantes, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; ANGELO; JORGE, 2007).

Oliveira et al. (2012) avaliaram os efeitos antioxidantes do óleo essencial de segurelha (*Satureja montana* L.) em diferentes concentrações (7,80; 15,60 e 31,25 $\mu\text{L/g}$) em mortadelas formuladas com diferentes níveis de nitrito de sódio (0; 100 e 200 mg/Kg) e armazenadas a 25°C por 30 dias, confirmando a atividade antioxidante deste óleo, uma vez que foram encontrados valores reduzidos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas mortadelas formuladas com 7,80 $\mu\text{L/g}$ do óleo essencial e sem nitrito adicionado, após 20 dias de armazenamento. A atividade antioxidante deste óleo essencial está relacionada à presença de compostos fenólicos, particularmente o timol e o carvacrol, que possuem seu impacto na oxidação lipídica reconhecidos.

Simões (2016) avaliou os efeitos na oxidação lipídica de diferentes combinações de óleos essenciais e seus compostos majoritários (canela, cravo-da-índia, orégano, cinamaldeído, eugenol e carvacrol) e nitrito de sódio em apresuntados armazenados a 4°C por 30 dias. Os valores de índice TBARS encontrados demonstraram que, para o tratamento com maior concentração de nitrito de sódio e sem adição de óleo essencial e composto majoritário, foram observados índices inferiores de TBARS, enquanto o tratamento composto por 0,1% óleo de canela, 0,14% óleo de orégano, 0,06% cinamaldeído e 0,16% carvacrol apresentou maior oxidação lipídica dentre todas as amostras ao final do período de estocagem, sugerindo que possam ter ocorrido interações entre os componentes presentes nos óleos essenciais e compostos majoritários, havendo a possibilidade de outros constituintes também terem sido quantificados no teste de TBARS, explicando assim o elevado nível de oxidação lipídica nos apresuntados contendo estes tratamentos.

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

2.4 Descrição botânica de plantas condimentares aromáticas

2.4.1 *Origanum vulgare*

O orégano é mundialmente utilizado como condimento. Pertence ao gênero *Origanum*, família *Lamiaceae*. Existem, aproximadamente, 38 espécies reconhecidas pelo mundo, sendo que a maioria delas está concentrada nas sub-regiões do Mediterrâneo Oriental. Crescem abundantemente em regiões rochosas numa vasta gama de altitudes (SAHIN et al., 2004).

Por possuírem fragrância picante, apresentam aplicação na agricultura, indústria farmacêutica e cosmética, atuando como uma erva culinária, aromatizantes em produtos alimentares, bebidas alcólicas e perfumaria. É uma erva rica em compostos fenólicos com

forte poder antioxidante e antibacteriano (ALIGIANNIS et al., 2001; NOVAK et al., 2000; FIGIEL et al., 2010).

Por ser uma espécie geneticamente heterogênea, devido a polinização natural cruzada, há uma grande variação no seu conteúdo fenólico, o que limita sua utilização como um ingrediente em alimentos funcionais. Normalmente, os óleos essenciais de orégano são constituídos por timol e carvacrol, sendo que o primeiro normalmente se apresenta em menores concentrações do que o segundo, γ -terpineno e *p*-cimeno. Estes componentes variam numa concentração de 80,2 a 98,4% do total dos óleos essenciais, sendo considerados compostos majoritários (FLEISHER; SNEER, 1982; BAMPIDIS et al., 2005).

Tanto o carvacrol quanto timol são aditivos alimentares aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration – USA. Por serem hidrofóbicos, atuam, principalmente, na membrana celular bacteriana, tornando-a permeável. Além disso, é possível que núcleos aromáticos presentes em sua estrutura e que contêm um grupo polar possam estabelecer ligações de hidrogênio com enzimas microbianas, o que provavelmente favorece a atividade antimicrobiana. Apesar destes componentes serem os mais expressivos, a atividade antimicrobiana não se deve somente a presença deles, mas também a presença de outros componentes que, em baixas concentrações, interagem com o carvacrol e timol, podendo provocar interações aditivas, sinérgicas ou antagônicas (LAMBERT et al., 2001; DORMAN; DEANS, 2000; CHORIANOPOULOS et al., 2004; CHAVAN; TUPE, 2014; LIMA et al., 2017).

As propriedades antimicrobianas principalmente do carvacrol vêm sendo demonstradas em diversos trabalhos, comprovando a eficácia deste composto contra o crescimento de diferentes microrganismos. Estudos comprovam que ele possui atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Shigella* sp., *B. cereus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Vibrio cholerae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *E.coli*, entre outros (NOSTRO et al., 2004; BAGAMBOULA; UYTTENDAELE; DEBEVERE, 2004; CHAVAN; TUPE, 2014; ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002).

O timol possui estrutura química muito semelhante ao carvacrol, sendo um isômero de posição, diferenciado apenas pela posição da hidroxila no anel aromático. Por se tratar também de um composto fenólico, possui ação muito semelhante a este, atuando sobre a membrana celular. Ele se liga as proteínas hidrofóbicas da membrana por meio de pontes de hidrogênio e, conseqüentemente, altera suas características de permeabilidade. Além disso, o timol atua sobre os lipopolissacarídeos que constituem a membrana externa de bactérias Gram-Negativas,

umentando assim a permeabilidade desta. Possui elevada ação antifúngica, aparecendo também como excelente agente antioxidante (LAMBERT et al., 2001; GARCÍA-GARCÍA; LÓPEZ-MALO; PALOU, 2011; RAMOS et al., 2012).

Diversos trabalhos têm demonstrado a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de orégano. Santurio et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola e concluíram que o óleo de orégano apresentou maior atividade, seguido do óleo de tomilho e de canela. Souza et al. (2007) analisaram a eficácia do óleo essencial de orégano (*O. vulgare* L.) na inibição do crescimento de algumas leveduras reconhecidas como potenciais deterioradoras de alimentos, tendo este demonstrado eficiência satisfatória. Fasseas et al. (2007) analisaram a atividade antioxidante de óleos essenciais de orégano e sálvia em carnes bovinas durante o período de armazenamento, obtendo como resultado uma diminuição significativa na oxidação das carnes.

2.4.2 *Cinnamomum zeylanicum*

A canela (*Cinnamomum zeylanicum*) é uma planta medicinal e aromática pertencente à família *Lauraceae*, sendo endêmica do Sri Lanka. Existem, aproximadamente, 250 espécies distribuídas na China, Índia e Austrália. No Brasil, ela é conhecida como canela do Ceilão ou canela-da-Índia (RANASINGHE; JAYAWARDENA; ABEYWICKRAMA, 2002; ZANARDO; RAMBO; SCHWANKE, 2014; LIMA et al., 2005).

Os óleos aromáticos estão presentes nas folhas e na casca, sendo a composição de ambos completamente diferente. A parte interna da casca do tronco e dos ramos, constitui a canela do comércio, com intenso uso mundial na perfumaria e na culinária, devido suas propriedades aromáticas e condimentares além de ser, popularmente, utilizada como estimulante, tônica, carminativa e antiespasmódica. O óleo de casca de canela é rico em cinamaldeído, b-cariofileno, linalol e outros terpenos. Sua casca seca contém, no mínimo, 1,2% de óleo volátil, contendo, no mínimo, 60,0% de trans-cinamaldeído. Andrade et al. (2012) identificaram 14 constituintes na casca seca do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*, sendo que os fenilpropanóides (E) - cinamaldeído (77,72%), acetato de (E) -cinamila (5,99%) e o monoterpênóide 1,8- cineol (4,66%), foram encontrados como componentes majoritários. Possui como características organolépticas aroma característico de aldeído cinâmico e sabor picante e adocicado (ZANARDO; RAMBO; SCHWANKE, 2014; LIMA et al., 2005).

O óleo obtido das folhas da canela apresenta outra utilização, especialmente no ramo de cosméticos e aromaterapia. É constituído, principalmente, por eugenol (60%), porém cerca de 23 constituintes também já foram identificados (GROSSMAN, 2005; LIMA et al., 2005).

Diversos trabalhos comprovam a eficácia do óleo essencial de canela contra microrganismos patogênicos e deteriorantes. Silva et al. (2009) avaliaram a ação antibacteriana *in vitro* de óleos essenciais de seis plantas (canela, gengibre, cravo da Índia, capim cidreira, alecrim e hortelã pimenta) frente a linhagens de *S. aureus* e *E. coli* isoladas de casos clínicos humanos, sendo o óleo essencial de canela o mais eficiente para controle de ambos os microrganismos. Foi possível verificar que os óleos essenciais testados foram efetivos no controle do desenvolvimento bacteriano, sendo o potencial antimicrobiano diferente em função da espécie bacteriana testada, sendo que a bactéria Gram-Positiva (*S. aureus*) se mostrou mais susceptível aos óleos testados que a Gram-Negativa (*E. coli*). Maíra (2011) avaliou a atividade antibacteriana dos óleos essenciais das folhas de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca) e *Cymbopogon flexuosus* (capim-limão da Índia Oriental) e da casca de *Cinnamomum cassia* (canela da China), utilizados sozinhos e em combinação, sobre células sésses e planctônicas de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* enteropatogênica, sendo o óleo essencial de canela o que apresentou maior destaque na eliminação de biofilmes de ambas as espécies bacterianas, alcançando atividade antibacteriana superior ou equivalente aos sanitizantes químicos tradicionalmente utilizados na indústria alimentícia. Moarefian, Barzegar e Sattari (2013) avaliaram as atividades antioxidantes e antimicrobianas do óleo essencial de canela em salsicha, contra duas bactérias que causam deterioração na carne (*E. coli* e *C. perfringens*), concluindo que o óleo essencial de canela apresenta elevada atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados.

2.4.3 *Citrus aurantifolia*

O limão Taiti (*Citrus aurantifolia*) é um fruto pertencente à família *Rutaceae*, sendo um representante do gênero *Citrus*. Não é, na realidade, um limão verdadeiro e sim uma lima ácida. Originário de regiões tropicais úmidas e subtropicais do continente asiático, apresenta larga aplicação no comércio mundial (BRAZ, 2007).

No Brasil, o fruto representa uma das espécies cítricas de maior importância comercial, estimando-se que sua área plantada ultrapasse os 40 mil hectares (COELHO et al., 1998). É um fruto rico em nutrientes como vitamina C, ácido fólico, niacina e piridoxina, além de compostos

fenólicos e compostos bioativos (antioxidantes) que despertam o interesse de grupos de diferentes áreas, podendo apresentar aplicação tanto na indústria alimentícia quanto farmacêutica (VIANA, 2010).

Os óleos essenciais de *Citrus* apresentam ampla aplicação em uma variedade de segmentos industriais, que variam desde a indústria de alimentos e bebidas até a de cosméticos, sendo muito utilizados como fragrâncias (TRANCHIDA et al., 2012). Apresentam em sua constituição compostos voláteis (85 - 99%) e compostos não voláteis (1 - 15%) que contribuem para as suas características organolépticas. Os voláteis são constituídos por uma mistura de monoterpenos (limoneno), sesquiterpenos e seus derivados oxigenados, que incluem aldeídos, cetonas, ácidos, álcoois e ésteres (FISHER; PHILIPS, 2008; ARCE; SOTO, 2008).

São conhecidos, aproximadamente, 50 diferentes compostos presentes nas cascas destes frutos cítricos, sendo o limoneno o constituinte principal, apresentando propriedades antimicrobianas principalmente contra bactérias Gram-Positivas. Por possuírem constituição tão variada, apresentam uma série de funções, como ação anti-inflamatória, antisséptica, diurética, carminativa, antioxidante e antiespasmódica (KUMMER et al., 2013; COLECIO-JUÁREZ et al., 2012).

2.4.4 *Elettaria cardamomum*

O cardamomo (*Elettaria cardamomum*) é uma planta herbácea perene da família *Zingiberaceae* que cresce nas florestas tropicais do sul da Índia, Sri Lanka e outros países tropicais. É muito utilizado como especiaria (conhecida como a “rainha das especiarias”), sendo esta produzida por secagem e trituração das sementes. É um tipo de especiaria doce, sendo uma das maiores commodities comercializadas em todo o mundo, apresentando larga aplicação na indústria alimentícia, conferindo sabor a doces, produtos cozidos e até café. Além disso, a fruta do cardamomo apresenta vasta aplicação médica, no combate a distúrbios cardíacos, cálculos renais e vesiculares, dispepsia, debilidade, anorexia, asma, bronquite, halitose e distúrbios gastrointestinais (MEHYAR et al., 2014; HUSAIN; ALI, 2014).

O óleo essencial de cardamomo é o extrato concentrado das sementes do cardamomo (especiaria) usado, principalmente, para aromatizar uma ampla gama de alimentos processados, condimentos, gelatina e bebidas na sua forma triturada (BURT, 2004). A composição química do óleo essencial de cardamomo varia consideravelmente com variedade, região e idade da planta. O conteúdo de óleos voláteis presentes nas sementes depende fortemente das condições

de armazenamento. Dentre todos os seus constituintes, o eucaliptol tem sido apontado como o principal composto responsável pela atividade antimicrobiana deste óleo (MORSY, 2015; NAVEED et al., 2013).

Os efeitos antimicrobianos e antioxidantes do óleo essencial de cardamomo vêm sendo amplamente estudados. Malti, Mountassif e Amarouch (2007) determinaram o efeito antimicrobiano deste óleo sobre diferentes microrganismos patogênicos (bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas), concluindo que o extrato de cardamomo foi muito eficaz inibindo o crescimento de todas as estirpes testadas da maioria dos patógenos. Abdullah et al. (2017) investigaram o potencial antimicrobiano do óleo essencial de cardamomo contra patógenos alimentares, concluindo que este apresentou elevada atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *Salmonella Typhi*, *E. coli*, *Streptococcus mutans* e *C. albicans*.

2.4.5 *Litsea cubeba*

Litsea cubeba é uma planta pertencente à família *Lauraceae* amplamente distribuída no Sudeste Asiático, sul da China, Japão e Taiwan. Pode ser usada como aromatizante ou fitoterápico, apresentando propriedades antimicrobianas e antioxidantes comprovadas, além de apresentar utilização no tratamento de diversas doenças. Como agente aromatizante, essa planta fornece um sabor único semelhante ao de uma mistura constituída por pimenta, gengibre e citrinos. É muito utilizada como um intensificador de sabor em alimentos, cosméticos e cigarros (LIU; YANG, 2012).

Ela também é conhecida como pimenta-chinesa ou may-chang. Seu óleo essencial apresenta composição variada de acordo com cada estrutura (raízes e frutas, caules, folhas, botões de flores, flores e frutos). Normalmente, o citral é encontrado em elevada concentração principalmente no óleo essencial obtido das raízes e frutas. Já o β -terpineno costuma ser encontrado em elevadas concentrações no óleo essencial obtido das flores (WANG; LIU, 2010).

O geraniol, um dos compostos majoritários do óleo essencial de pimenta-chinesa, apresenta sua atividade antimicrobiana descrita em diversos trabalhos. Friedman; Henika; Mandrell (2002) avaliaram a atividade antimicrobiana de 96 óleos essenciais e 23 componentes majoritários contra microrganismos encontrados em alimentos, sendo o geraniol o mais ativo contra *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. enterica*. Coutinho et al. (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana do geraniol e cariofileno contra *S. aureus*, comprovando a atividade antibacteriana deste composto.

Li et al. (2016) investigaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. cubeba* em *Aspergillus flavus* e atividade inibitória da aflatoxina B1 produzida em alcaçuz, encontrando uma forte atividade antifúngica contra o crescimento micelial de *A. flavus* e contra a síntese da aflatoxina B1 *in vitro*. Além disso, os resultados encontrados demonstraram que o óleo essencial de *L. cubeba* pode, efetivamente, inibir o acúmulo de aflatoxina B1 em alcaçuz contaminado com *A. flavus*. Dessa forma, o uso de óleos essenciais tem possibilidade de ser usado como um fungicida alternativo para o controle do crescimento de fungos toxigênicos.

Nguyen et al. (2018) investigaram os efeitos e mecanismos antibacterianos do óleo essencial de *L. cubeba* extraído das folhas contra o crescimento de *E. coli*, observando um forte efeito bactericida após um curto período de exposição: 2h e 4h. O óleo essencial testado levou a alterações na morfologia celular, perda de integridade e permeabilidade da membrana celular, bem como perda de DNA, que foram demonstradas pela análise microscópica das culturas de *E. coli* afetadas.

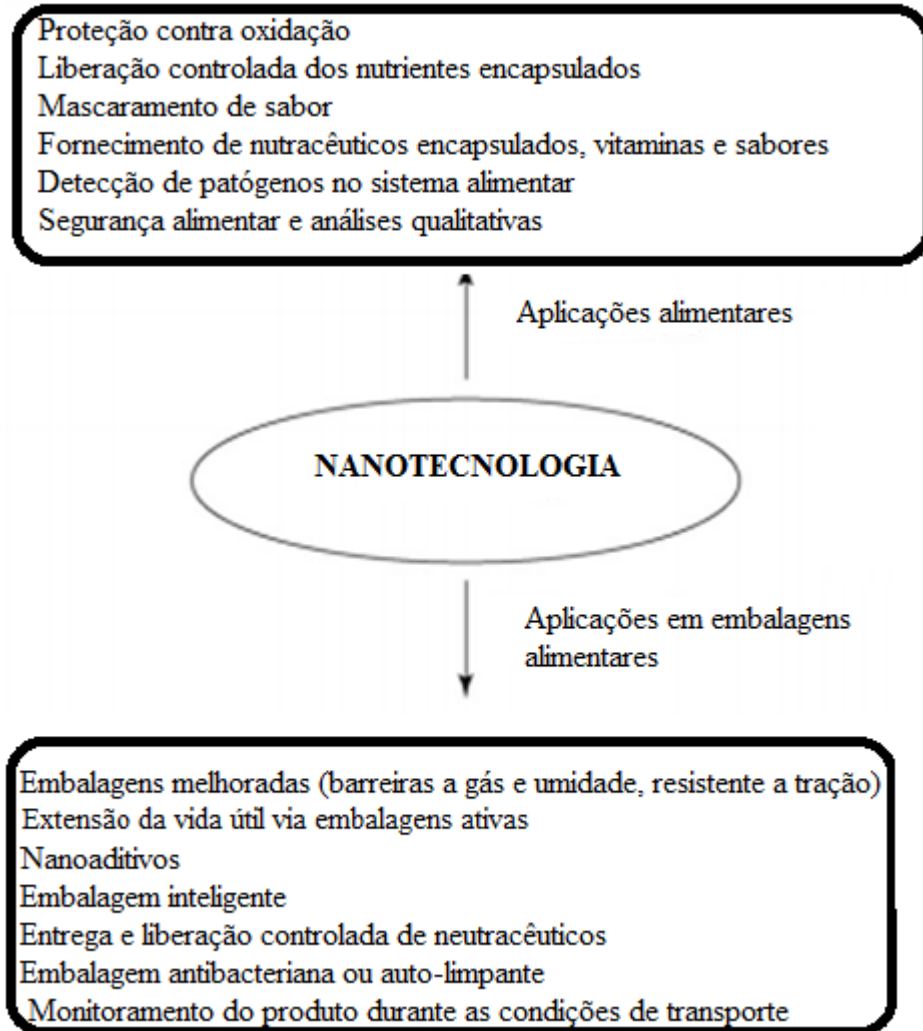
2.5 Nanoemulsão de óleos essenciais

A nanotecnologia é uma tecnologia multidisciplinar que vem apresentando rápido desenvolvimento. Apresenta utilização em áreas como a biologia, física, engenharia e química, permitindo o desenvolvimento de novos materiais. Ela permite que os cientistas possam medir, controlar e manipular materiais com dimensões muito pequenas, de nanômetros (10^{-9} m), alterando assim suas funções e propriedades físicas, químicas e biológicas, tais com solubilidade, absorção pelas células e o tempo de residência no trato gastrointestinal. Essa diminuição no tamanho da partícula proporciona uma maior superfície de contato que confere as nanopartículas características únicas e, dessa forma, seu enorme potencial para aplicações (DURÁN; MARCATO, 2013; BROMBERG, 2010; SOZER; KOKINI, 2009).

Na indústria de alimentos, ela tem apresentado uma série de aplicações que visam trazer melhorias para o consumidor. Algumas destas incluem possível redução na utilização de conservantes, sal, gordura e surfactantes em produtos alimentícios; desenvolvimento de novos sabores, texturas e sensações bucais; melhorias na absorção e biodisponibilidade de nutrientes e suplementos; embalagens de alimentos que contenham nanomateriais inorgânicos que funcionam como barreira a passagem de gases, ou que contenham ação antimicrobiana, ou que

protejam de forças mecânicas (CHAUDHRY; CASTLE, 2011). A Figura 9 traz, de forma resumida, as diferentes aplicações que esta tecnologia pode ter.

Figura 9 - Potenciais aplicações da nanotecnologia nas indústrias de alimentos e embalagens.



FONTE: SOZER; KONINI (2009) com modificações.

A utilização destas nanopartículas como micelas, nanoemulsões, nanopartículas biopoliméricas e biosensores tem permitido a indústria de alimento desenvolver processos e produtos mais seguros do ponto de vista microbiológico (SOZER; KOKINI, 2009).

Uma emulsão consiste na mistura de dois líquidos imiscíveis, com um dos líquidos sendo disperso em pequenas gotículas esféricas no outro. Normalmente, emulsões convencionais possuem tamanho de partículas superiores a 100 nm (140 – 200 nm). Na maioria dos alimentos, o diâmetro das partículas se situa entre 100 nm e 100 µm, porém tem-se observado crescente aumento do interesse por emulsões com tamanho de partículas menores do

que 100 nm, devido a suas propriedades físico-químicas. Logo, de acordo com o tamanho do diâmetro de suas gotículas, as emulsões podem ainda ser classificadas em nanoemulsões (escala nanométrica) ou microemulsões (escala micrométrica) (McCLEMENTS; JULIAN, 2015).

Nanoemulsões são emulsões (dispersão de um líquido em outro imiscível) sendo as do tipo óleo em água (O/A) mais comuns (óleo é a fase dispersa e a água a fase contínua), cujo tamanho das gotículas varia entre 20 a 500 nm. Dependendo do tamanho da gotícula, podem apresentar aparência translúcida (tamanho inferior a 200 nm) ou aparência leitosa (tamanho superior 200 nm). O fato de apresentar partículas tão pequenas faz com que haja forte redução da força gravitacional, permitindo que o movimento Browniano (movimento aleatório das partículas microscópicas imersas em um fluido) seja suficiente para superar a gravidade, evitando a sedimentação durante o armazenamento, além de também evitarem a floculação das gotículas. Em contraste com as microemulsões (10^{-6} m), elas podem ser diluídas em água sem que o tamanho das partículas se altere. Apresentam como desvantagem a exigência de surfactantes e / ou agentes tensoativos para que as formulações sejam estabilizadas, obtendo o tamanho de partícula desejado (SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010; CAPEK, 2004; FERNANDEZ et al., 2004; TADROS et al., 2004; SANTIAGO; CASTRO, 2016).

As nanoemulsões não são sistemas em equilíbrio, logo não podem ser formadas espontaneamente. Necessitam de alta energia para sua formação, que é proveniente de aparelhos mecânicos (normalmente métodos de alta energia) ou do potencial químico dos componentes (normalmente métodos de baixa energia). Do ponto de vista mecânico, essa alta energia necessária para promover taxa de cisalhamento capaz de alterar a partícula pode ser alcançada pelo uso de homogeneizadores de alta pressão ou geradores de ultrassom. Já do ponto de vista químico, normalmente são utilizados os métodos de emulsificação espontânea e o método da temperatura de inversão de fases (SOLANS et al., 2005; KOURNIATIS; SPINELLI; MANSUR, 2010; HOLKEM et al., 2015).

Homogeneizadores de alta pressão são muito utilizados para formação das nanoemulsões e normalmente trabalham com pressões entre 50 e 100 MPa. O líquido, sob elevadas pressões, é conduzido por meio de uma abertura estreita. O fluido acelera em distância muito curta com velocidade muito rápida, o que acaba por alterar o tamanho das partículas, formando gotículas cada vez menores (ASSIS et al., 2012).

A utilização do ultrassom é um método eficiente e rápido, que forma nanoemulsões estáveis e com partículas de tamanho menores. Consiste na produção de ondas de elevadas e intensas vibrações ultrassônicas capazes de romper as gotículas primárias da emulsão,

formando então as gotículas de tamanho nanométricos (ASSIS et al., 2012; HOLKEM et al., 2015).

A utilização de óleos essenciais de forma direta nos alimentos, como agentes antimicrobianos e antioxidantes, apesar de apresentar uma série de vantagens encontra algumas limitações, principalmente relacionadas a natureza hidrofóbica, reativa e volátil dos componentes que os constituem, além de possuírem baixa solubilidade em água e, quando utilizados em elevadas concentrações, alteram as características sensoriais do produto, podendo inclusive apresentar toxicidade quando utilizados em elevadas concentrações. Logo, a encapsulação dos óleos essenciais em escala nanométrica resultando em nanoemulsão, representa uma abordagem viável e eficiente para modular sua liberação, aumentar a estabilidade física, proteger das reações de oxidação com o ambiente e das interações com os ingredientes alimentares, diminuir a volatilidade, aumentar a bioatividade devido a diminuição do tamanho das partículas e reduzir a toxicidade. Alguns exemplos de compostos comumente encapsulados são os óleos essenciais e especiarias, óleo de atum, ácidos graxos, azeite, óleo de soja ou girassol (DONSÍ et al., 2012; RODRÍGUEZ et al., 2016).

As nanoemulsões podem interagir com as células microbianas por meio de quatro mecanismos principais: transporte passivo através da membrana celular em que o óleo essencial é transportado para a superfície da membrana celular por meio das pequenas gotas de nanoemulsões, permitindo a ruptura da membrana celular e aumentando a acessibilidade as células microbianas; fusão das gotículas de nanoemulsões com a bicamada fosfolipídica da membrana celular fazendo com que os óleos essenciais sejam liberados de forma direcionada; partição na fase aquosa em que a liberação prolongada dos óleos essenciais pelas nanoemulsões conduzida pela partição do óleo essencial entre as gotículas de óleo e a fase aquosa faz com que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais seja prolongada e a interação eletrostática com a membrana celular, o que permite o aumento da ação dos óleos essenciais devido a interação entre as partículas carregadas positivamente das gotículas das nanoemulsões com as partículas carregadas negativamente da parede celular microbiana) (LOVISON, 2017).

Bolzan et al. (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano livre e em nanoemulsões em testes *in vitro* contra *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Salmonella enteritidis* e *Pseudomonas aeruginosa* comprovando a eficácia deste óleo nas duas formas. Bhargava et al. (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano em nanoemulsão contra microrganismos patogênicos em alfaces frescos,

demonstrando que a aplicação do óleo essencial de orégano desta forma é estratégia promissora e eficaz no controle antimicrobiano. Maté, Periago e Palop (2015) avaliaram o efeito antibacteriano de nanoemulsões dos compostos naturais D-limoneno e nisina contra *L. monocytogenes* em Caldo Triptona de Soja, peito de frango e creme de vegetais. Os resultados encontrados mostraram maior eficácia da aplicação do D-limoneno em forma de nanoemulsão do que sua aplicação direta nos alimentos, e ao usar ambos os compostos juntos, os efeitos antimicrobianos foram maiores. Além disso, o crescimento de *L. monocytogenes* foi inibido com a combinação de antimicrobianos. Logo, os resultados obtidos indicaram que as nanoemulsões de óleos essencial de orégano encapsulado são adequadas para serem incorporadas em formulações alimentares para prevenir e controlar crescimento microbiano, prolongando sua vida útil.

2.6 Matriz Alimentar: Mortadela

Os produtos cárneos embutidos ou também conhecidos como produtos de salsicharia ocupam posição privilegiada na indústria de alimentos, sendo de intenso consumo por boa parte da população brasileira. São obtidos a partir de matérias primas cárneas submetidas a trituração, seguida de mistura com diferentes ingredientes e acondicionados em tripas naturais ou artificiais, com ou sem cozimento. Podem ainda ser curados ou não, defumados e dessecados ou não. Nesse grupo, incluem-se as linguiças, paio, presunto, salame, salsicha, salsichão, mortadela, entre outros (OLIVEIRA, 2014; DUARTE, 2010).

Segundo a Legislação Brasileira, a mortadela é definida como um produto cárneo industrializado, obtido de uma emulsão das carnes de animais de açougue, acrescido ou não de toucinho, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, em diferentes formas, e submetido ao tratamento térmico adequado (BRASIL, 2000). É um produto cozido curado, podendo ser elaborada a partir de carnes de diferentes animais, o que faz com que seja um produto de amplo consumo.

A emulsão cárnea pode ser entendida como uma mistura na qual os componentes da carne são fracionados em finas porções e dispersos de modo semelhante a uma emulsão de gordura/óleo em água (O/A), sendo que a gordura é a fase dispersa e a solução aquosa de sais e proteínas a fase contínua. Os produtos cárneos emulsionados são fabricados a partir da trituração de carnes e demais ingredientes até a obtenção de uma massa homogênea (emulsão

cárnea), sendo a emulsão cárnea produzida pela cominuição da carne com o sal e outros ingredientes, formando uma dispersão constituída de água, gordura e proteína. De forma resumida, a emulsão cárnea é elaborada pela mistura de carne, tecido adiposo, gelo, água e aditivos (ORDÓÑEZ, 2005; VIDAL, 2015; MOREIRA et. al. 2006).

Para a formação de emulsão cárnea é preciso ativar as proteínas presentes na carne através da ruptura do sarcolema provocando a liberação das proteínas miofibrilares, posteriormente solubilizadas e extraídas por sais e fosfatos. Essas proteínas atuam como agentes emulsificantes, as quais conferem estabilidade ao sistema (VIDAL, 2015).

Por se tratar de um produto cozido curado, a mortadela possui em sua constituição os chamados sais de cura que contribuem para a coloração rósea característica, textura e sabor específicos e desempenham efeito conservante, principalmente contra *C. botulinum*, sendo o nitrito um dos componentes cruciais do processo (AL-SHUIBI; AL-ABDULLAH, 2002).

Os produtos cárneos, especialmente embutidos e enlatados, representam um dos principais alimentos vinculados aos surtos de botulismo em todo o mundo. Em 1793, foram registrados 30 casos de botulismo confirmados na Alemanha devido ao consumo de um tipo de salsicha fervida e defumada conhecida como “Blunsen”. No Brasil, a primeira epidemia de botulismo foi registrada em 1958, no Estado do Rio Grande do Sul, onde sete pessoas faleceram após consumo de conserva caseira de peixe. Em 1982, dois casos foram registrados no Estado do Rio de Janeiro, em que uma das pessoas foi levada a óbito, devido a ingestão de patê de galinha armazenado em condições inadequadas de refrigeração. Em 1986, um surto de botulismo de origem alimentar envolvendo oito pessoas de uma mesma família devido a ingestão de carne suína conservada em condições rústicas sob a forma de linguiça ou enlatado caseiro foi registrado na região no Triângulo Mineiro (Minas Gerais). Um ano depois, em 1987, um novo surto ocorreu neste mesmo Estado, envolvendo sete pessoas também de uma mesma família, devido a ingestão de carne suína conservada na forma de enlatado caseiro. Em 2002, na região de Campinópolis, Mato Grosso, foram registrados quatro casos de botulismo por ingestão de carne suína enlatada. Todos na mesma família. Em 2011, foi relatado um surto de botulismo no Estado do Ceará, onde três pessoas de uma mesma família consumiram torta de frango caseira desenvolvendo a doença. Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, a maior parte dos casos de botulismo entre 1999 e novembro de 2005, ocorreu devido a ingestão de produtos de origem suína (“carne de lata”, patê de fígado suíno e linguiça curada industrializada) (SILVA; PESSOA, 2015; OLIVEIRA et al., 2013).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais utilizados foram o de orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), limão Taiti (*Citrus aurantifolia*), cardamomo (*Elettaria cardamomum*) e pimenta-chinesa (*Litsea cubeba*). A escolha destes óleos se deve ao fato de que o presente trabalho se apresenta como uma continuação dos estudos realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos – UFLA), dentro de uma linha de pesquisa que busca estudar/avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais contra microrganismos patogênicos e deterioradores, onde a utilização destes óleos se mostrou eficiente no controle de uma série de microrganismos patogênicos, especialmente os do gênero *Clostridium*. Eles foram adquiridos da empresa FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda.

3.2 Microrganismo, padronização e manutenção do inóculo

A cepa utilizada para realização do trabalho foi *Clostridium sporogenes* INCQS 00004 (ATCC 11437) cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e mantida no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA.

Utilizou-se o meio *Differential Reinforced Clostridium Base Broth* (DRCBB), suplementado com 0,5% de solução estéril de sulfato de sódio (4%) e citrato férrico (7%) para reativação da cultura congelada. A incubação foi realizada a 37°C/48h em anaerobiose gerada pela adição de óleo mineral estéril. Decorrido esse período, centrifugou-se a cultura a 605 G-force (3000 rpm) por 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante e adicionando-se o meio de congelamento (glicerol: 15 mL; peptona bacteriológica: 0,5g; extrato de levedura: 0,3g; NaCl: 0,5g; água destilada: 100 mL). As culturas estoques foram armazenadas congeladas a -18°C.

Para reativação da cultura estoque, o meio DRCBB suplementado com 0,5% de solução estéril de sulfato de sódio e citrato férrico foi utilizado. As condições de incubação foram a 37°C por 48h em anaerobiose. Repetiu-se este procedimento por duas vezes consecutivas. Padronizou-se o inóculo a 10^7 UFC/mL por meio de uma curva de crescimento em meio

DRCBB onde a absorbância foi medida (D.O. 600 nm) e a contagem em placa realizada, utilizando-se o ágar *Reinforced Clostridium Base* (extrato de levedura: 1,5g/L; peptona bacteriológica: 10g/L; extrato de carne: 10g/L; glicose: 1g/L; amido solúvel: 1g/L; acetato de sódio: 5g/L; cloridrato de L-cisteína: 0,5g/L; ágar:15,5g/L). As placas foram incubadas em 37°C/48h em anaerobiose, gerada pela adição de geradores de anaerobiose ANAEROBAC (Probac do Brasil®).

3.3 Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A determinação das concentrações mínimas bactericidas dos óleos essenciais foi realizada por meio da técnica de diluição em caldo (NCCLS, 2006). O Caldo *Differential Reinforced Clostridium Base Broth* (DRCBB) acrescido de 0,5% (v/v) de Tween 80 (agente tensoativo) foi utilizado para a diluição dos óleos essenciais.

Alíquotas de 50µL da cultura padronizada (10^7 UFC/g) foram transferidas para tubos de rosca, contendo 5 mL do meio DRCBB acrescido de 0,5% de Tween 80 e óleos essenciais nas seguintes concentrações: 0; 0,05; 0,1; 0,12; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,5; 1; 1,25; 1,50; 1,75; e 2,0%. O controle positivo foi constituído do meio DRCBB acrescidos de 0,5% (v/v) de Tween 80, e o controle negativo, de DRCBB e cloranfenicol 0,1% (m/v). Após homogeneização, os tubos foram incubados a 37°C/24h em condições de anaerobiose (gerada por óleo mineral). Após esse período, alíquotas de 100 µL das culturas foram transferidas para placas de Petri contendo Ágar *Reinforced Clostridium Base*, empregando-se a técnica do plaqueamento em profundidade com sobrecamada. As placas foram armazenadas em sacos plásticos de poliamida selados, contendo geradores de anaerobiose, e incubadas a 37°C/48h (FIGURA 10). Foram consideradas CMB dos óleos essenciais a menor concentração de cada óleo em que não se observou o crescimento do microrganismo nas placas após incubação. O plaqueamento foi realizado em triplicata e três repetições.

Figura 10 - Plaqueamento e incubação em condições de anaerobiose.



FONTE: Do autor (2017).

3.4 Combinações entre óleos essenciais

Os óleos essenciais de orégano, canela, limão Taiti, pimenta-chinesa e cardamomo foram testados em dois experimentos utilizando suas concentrações mínimas bactericidas (CMB) obtidas nos ensaios *in vitro*, originando assim duas combinações com quatro óleos cada. As combinações foram definidas por pré-testes, visando diminuir o impacto sensorial quando aplicados na mortadela. A combinação 1 foi elaborada com base em 25% das CMB dos óleos essenciais de canela, limão Taiti, cardamomo e pimenta-chinesa. A combinação 2 foi constituída com base em 50% das CMB dos óleos essenciais de orégano, canela, cardamomo e pimenta-chinesa. Nas Tabelas 4 e 5, encontram-se as diferentes proporções de óleos essenciais que foram utilizados em cada ensaio para cada combinação. As tabelas foram geradas utilizando delineamento DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) no programa *Chemoface versão 1.5*, utilizando “*Experimental design*”. As variáveis +2 e -2 foram calculadas de acordo com a CMB.

Foi realizada a análise *in vitro* da atividade antimicrobiana dos ensaios baseados nas combinações testadas por meio da técnica de Diluição em Caldo (NCCLS, 2006) com modificações. Utilizou-se o meio *Differential Reinforced Clostridium Base Broth* acrescido de 0,5% (v/v) de Tween 80 para a diluição dos óleos essenciais. Após homogeneização, os tubos foram incubados a 37°C/24h em condições de anaerobiose. Decorrido esse período, alíquotas de 100 µL das culturas foram transferidas para placas de Petri contendo *Ágar Reinforced*

Clostridium Base, empregando-se a técnica do plaqueamento em profundidade com sobrecamada. As placas foram incubadas a 37°C/48h em condições anaeróbicas. O experimento foi realizado em três repetições com triplicata.

Tabela 4 - Proporções (em porcentagem) utilizadas na combinação 1 (óleos essenciais de canela limão Taiti, cardamomo e pimenta-chinesa).

Ensaio	Variáveis codificadas				% de óleos essenciais			
	A	B	C	D	canela	limão	cardamomo	pimenta
1	-1	-1	-1	-1	0,00125	0,0575	0,0575	0,00125
2	-1	-1	-1	1	0,00125	0,0575	0,0575	0,00375
3	-1	-1	1	-1	0,00125	0,0575	0,1725	0,00125
4	-1	-1	1	1	0,00125	0,0575	0,1725	0,00375
5	-1	1	-1	-1	0,00125	0,1725	0,0575	0,00125
6	-1	1	-1	1	0,00125	0,1725	0,0575	0,00375
7	-1	1	1	-1	0,00125	0,1725	0,1725	0,00125
8	-1	1	1	1	0,00125	0,1725	0,1725	0,00375
9	1	-1	-1	-1	0,00375	0,0575	0,0575	0,00125
10	1	-1	-1	1	0,00375	0,0575	0,0575	0,00375
11	1	-1	1	-1	0,00375	0,0575	0,1725	0,00125
12	1	-1	1	1	0,00375	0,0575	0,1725	0,00375
13	1	1	-1	-1	0,00375	0,1725	0,0575	0,00125
14	1	1	-1	1	0,00375	0,1725	0,0575	0,00375
15	1	1	1	-1	0,00375	0,1725	0,1725	0,00125
16	1	1	1	1	0,00375	0,1725	0,1725	0,00375
17	-2	0	0	0	0	0,115	0,115	0,0025
18	2	0	0	0	0,005	0,115	0,115	0,0025
19	0	-2	0	0	0,0025	0	0,115	0,0025
20	0	2	0	0	0,0025	0,23	0,115	0,0025
21	0	0	-2	0	0,0025	0,115	0	0,0025
22	0	0	2	0	0,0025	0,115	0,23	0,0025
23	0	0	0	-2	0,0025	0,115	0,115	0
24	0	0	0	2	0,0025	0,115	0,115	0,005
25	0	0	0	0	0,0025	0,115	0,115	0,0025
26	0	0	0	0	0,0025	0,115	0,115	0,0025
27	0	0	0	0	0,0025	0,115	0,115	0,0025

A = variável codificada para Óleo Essencial A (Óleo Essencial de canela); e B = variável codificada para Óleo Essencial B (Óleo Essencial de limão Taiti), C = variável codificada para Óleo Essencial C (Óleo Essencial de cardamomo); D= variável codificada para Óleo Essencial D (Óleo Essencial de pimenta-chinesa). As porcentagens foram baseadas em 25% da CMB de cada óleo utilizado.

Tabela 5 - Proporções (em porcentagem) utilizadas na combinação 2 (óleos essenciais de orégano, canela, cardamomo e pimenta-chinesa).

Ensaio	Variáveis codificadas				% de óleos essenciais			
	A	B	C	D	orégano	canela	cardamomo	pimenta
1	-1	-1	-1	-1	0,00125	0,0075	0,12	0,0075
2	-1	-1	-1	1	0,00125	0,0075	0,12	0,0225
3	-1	-1	1	-1	0,00125	0,0075	0,36	0,0075
4	-1	-1	1	1	0,00125	0,0075	0,36	0,0225
5	-1	1	-1	-1	0,00125	0,0225	0,12	0,0075
6	-1	1	-1	1	0,00125	0,0225	0,12	0,0225
7	-1	1	1	-1	0,00125	0,0225	0,36	0,0075
8	-1	1	1	1	0,00125	0,0225	0,36	0,0225
9	1	-1	-1	-1	0,00375	0,0075	0,12	0,0075
10	1	-1	-1	1	0,00375	0,0075	0,12	0,0225
11	1	-1	1	-1	0,00375	0,0075	0,36	0,0075
12	1	-1	1	1	0,00375	0,0075	0,36	0,0225
13	1	1	-1	-1	0,00375	0,0225	0,12	0,0075
14	1	1	-1	1	0,00375	0,0225	0,12	0,0225
15	1	1	1	-1	0,00375	0,0225	0,36	0,0075
16	1	1	1	1	0,00375	0,0225	0,36	0,0225
17	-2	0	0	0	0	0,015	0,24	0,015
18	2	0	0	0	0,005	0,015	0,24	0,015
19	0	-2	0	0	0,0025	0	0,24	0,015
20	0	2	0	0	0,0025	0,03	0,24	0,015
21	0	0	-2	0	0,0025	0,015	0	0,015
22	0	0	2	0	0,0025	0,015	0,48	0,015
23	0	0	0	-2	0,0025	0,015	0,24	0
24	0	0	0	2	0,0025	0,015	0,24	0,03
25	0	0	0	0	0,0025	0,015	0,24	0,015
26	0	0	0	0	0,0025	0,015	0,24	0,015
27	0	0	0	0	0,0025	0,015	0,24	0,015

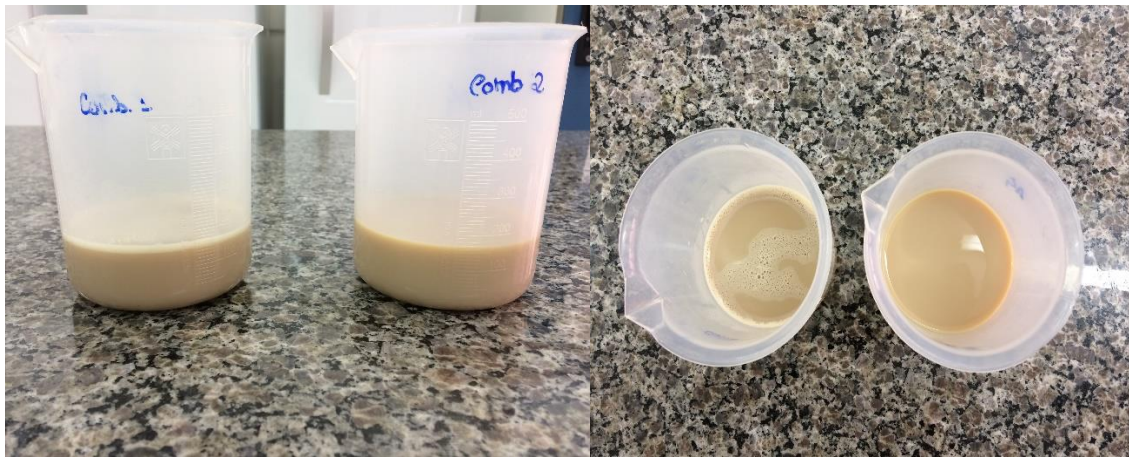
A = variável codificada para Óleo Essencial A (Óleo Essencial de orégano); e B = variável codificada para Óleo Essencial B (Óleo Essencial de canela), C = variável codificada para Óleo Essencial C (Óleo Essencial de cardamomo); D= variável codificada para Óleo Essencial D (Óleo Essencial de pimenta-chinesa). As porcentagens foram baseadas em 50% da CMB de cada óleo utilizado.

3.5 Preparo das nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas com os óleos de canela, limão Taiti, cardamomo e pimenta-chinesa utilizando ensaios de combinações de óleos essenciais selecionados na avaliação microbiológica *in vitro* (item 3.4), originando duas nanoemulsões diferentes:

nanoemulsão 1 (TRAT 3), composta pelos óleos essenciais de pimenta-chinesa, cardamomo e limão Taiti nas concentrações de 0,0225%; 1,035% e 1,035%, respectivamente; nanoemulsão 2 (TRAT 4), composta pelos óleos essenciais de cardamomo, pimenta chinesa e canela nas concentrações, respectivas, de: 1,8%; 0,1125% e 0,1125%. Utilizou-se como agente tensoativo não iônico a lecitina de soja (IMCOPA S / A, Brasil). As nanoemulsões foram preparadas mantendo-se a proporção de 1:3 (2% dos óleos essenciais, 6% do agente tensoativo e 92% de água destilada) em um volume de 200 mL (FIGURA 11).

Figura 11 - Nanoemulsões referentes as combinações 1 e 2 elaboradas.



FONTE: Do autor (2017).

O preparo das nanoemulsões contendo os óleos essenciais foi realizado de acordo com o método de Joe et al. (2012) com modificações. A fase dispersa das nanoemulsões óleo-em-água (O / A) é representada pelos óleos essenciais e o tensoativo lecitina de soja. Estes componentes foram misturados entre si e posteriormente misturados com água destilada (184 mL).

As amostras foram homogeneizadas por, aproximadamente, 10 minutos em aparelho Ultra-Turrax (Ika Labor Technik), sendo então transferidas para homogeneizador ultrassônico (Ultrassom digital Sonifier, Modelo 450, Brason Ultrasonic Corporation), no qual permaneceram por 40 minutos a 85 amplitude (FIGURA 12). A temperatura da emulsão (15°C) foi controlada por meio da utilização de gelo em torno do copo, sendo realizados intervalos a cada 10 minutos para que os gelos fossem substituídos e a emulsão se resfriasse. A temperatura final de cada emulsão foi aferida no final do processo.

Figura 12 – Preparo das nanoemulsões.



FONTE: Do autor (2017).

Após preparo das nanoemulsões, o tamanho das partículas foi medido em analisador de tamanho de partículas por dispersão de luz estática (DLS) (Mastersizer 3000, Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) para conferência do diâmetro médio das partículas em escala nanométrica (SILVA et al., 2012; KLANG et al., 2012). As amostras foram diluídas em água destilada (1:10) para evitar efeitos de espalhamento múltiplo. As análises foram feitas em temperatura ambiente (25°C) e os índices de refração utilizados para o óleo e a fase aquosa foram 1,47 e 1,33, respectivamente. Calculou-se o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas da amostra, representado como (DH), e o índice de polidispersividade (PDI) das nanoemulsões, por meio da Equação 1:

$$PDI = \frac{d_{90}-d_{10}}{d_{50}} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

d10: diâmetro das partículas em 10% de volume acumulado

d50: diâmetro das partículas em 50% de volume acumulado (diâmetro médio das partículas)

d90: diâmetro das partículas em 90% de volume acumulado

(d90-d10): intervalo de dados

3.6 Fabricação da Mortadela

Na Tabela 6 encontra-se a formulação da mortadela utilizada no experimento. Foram realizados 5 tratamentos, sendo todos adicionados de nitrito de sódio (75mg/Kg), variando-se apenas as combinações de óleos essenciais e suas nanoemulsões (baseadas nos ensaios microbiológicos *in vitro*), e quantidades de água/gelo adicionados durante a formulação do produto.

Tabela 6 - Formulação da mortadela utilizada no experimento e as porcentagens dos óleos essenciais, nitrito de sódio, água/gelo e nanoemulsão dos cinco tratamentos de mortadela.

Ingredientes	%	Tratamentos	Óleos (%)	Nitrito de sódio (%)	Água/gelo (%)**	Nanoemulsão (%)***
Carne suína	58,50	Controle	-	0,0075	20,00	-
Toucinho	14,00	Tratamento 1	Combinação 1*	0,0075	20,00	-
Sal	1,90	Tratamento 2	Combinação 2*	0,0075	20,00	-
Polifosfato	0,50	Tratamento 3	Nanoemulsão 1*	0,0075	8,50	11,50
Fécula de mandioca	5,00	Tratamento 4	Nanoemulsão 2*	0,0075	6,50	13,50
Ácido ascórbico	0,05					

* Controle; Combinação 1: 0,115% óleo de limão Taiti, 0,115% óleo de cardamomo, 0,0025% óleo de pimenta chinesa; Combinação 2: 0,015% óleo de canela, 0,24% óleo de cardamomo, 0,015% óleo de pimenta chinesa; Nanoemulsão 1: 0,0225% óleo de pimenta chinesa, 1,035% óleo de cardamomo, 1,035% óleo de limão Taiti (as concentrações de cada óleo essencial foram encontradas multiplicando-se as porcentagens obtidas no ensaio escolhido da combinação 1 por 9 para que a nanoemulsão elaborada estivesse a 2%); Nanoemulsão 2: 1,8% óleo de cardamomo, 0,1125% óleo de pimenta chinesa, 0,1125% óleo de canela (as concentrações de cada óleo essencial foram encontradas multiplicando-se as porcentagens obtidas no ensaio escolhido da combinação 2 por 7,5 para que a nanoemulsão elaborada estivesse a 2%)

** Os tratamentos contendo as nanoemulsões tiveram a porcentagem de água/gelo diminuída uma vez que estas possuem elevada concentração de água em sua composição. O tratamento 3, contendo a nanoemulsão correspondente a combinação 1 (nanoemulsão 1), apresentou 8,5% de água/gelo adicionado durante a formulação da mortadela e o tratamento 4, contendo a nanoemulsão correspondente a combinação 2 (nanoemulsão 2) apresentou 6,5% de água/gelo adicionado durante a formulação da mortadela.

***as nanoemulsões preparadas apresentam em sua formulação 6% de agente tensoativo lecitina de soja e 92% de água destilada.

A carne suína e o toucinho, previamente congelados, foram moídos em discos de 6 mm e transferidos para um *cutter* para homogeneização e adição dos demais ingredientes.

Inicialmente, adicionou-se a carne suína e o gelo ao *cutter*. Após homogeneização, foram adicionados os seguintes ingredientes, nesta ordem: polifosfato; sal e ácido ascórbico. A seguir, diminuiu-se a velocidade do *cutter*, adicionando-se a fécula de mandioca, o toucinho e o nitrito de sódio, misturando-os a mão. Ligou-se novamente o *cutter*, adicionando-se as misturas dos óleos essenciais ou das nanoemulsões. Após homogeneização, a massa foi embutida em tripa sintética (poliamida), de forma a se obter mortadelas com cerca de 500 g. A massa obtida foi mantida em câmara fria (4 °C), por 24 horas, para o processo de cura. A cocção foi realizada por imersão em banho-maria de acordo com a seguinte programação: 55°C por 30min, 65°C por 30min, 75°C por 30min e 85°C por 30min, quando a temperatura interna alcançou 72°C (medida com termopar). Todo o processo de cozimento foi monitorado com auxílio de um termômetro, com mensuração da temperatura do banho-maria. Após o cozimento, a mortadela foi mantida em aproximadamente, 4°C, por 24h. Decorrido este período, iniciaram-se as análises físico-químicas e microbiológicas. Foram produzidos no total 5 kg de mortadela, sendo 1 kg para cada tratamento (500g para as análises físico-químicas e 500g para as análises microbiológicas) (FIGURA 13). O experimento foi realizado com duas repetições em triplicata.

Figura 13 - Mortadelas elaboradas e porcionamento destas em fatias para as análises microbiológicas e físico-químicas.



FONTE: Do autor (2017).

Após cozimento, as mortadelas foram separadas em fatias de 25g para as análises microbiológicas, trituradas e inoculadas com 10^5 UFC/g de células vegetativas de *C. sporogenes*, sendo então embaladas em sacos plásticos, seladas à vácuo e armazenadas a $14^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (FIGURA 11). As amostras foram analisadas após 0, 5, 10, 15 e 20 dias de armazenamento para enumeração de células vegetativas e endósporos de *C. sporogenes*. As mortadelas utilizadas para as análises físico-químicas, após cozimento, foram separadas em porções de 60g em embalagens plásticas, seladas a vácuo e armazenadas a $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. As amostras foram analisadas após 1, 21 e 30 dias de armazenamento quanto a atividade de água, pH, oxidação lipídica, teor de nitrito residual e análise de cor objetiva.

3.7 Enumeração de *Clostridium sporogenes* nas mortadelas

As embalagens com as fatias de mortadelas inoculadas com *C. sporogenes* foram abertas de forma asséptica e adicionadas de 225 mL de água peptonada 0,1% (m/v), sendo homogeneizadas em *Stomacher Metroterm*® (490 golpes/min) por 3 minutos.

Imediatamente após a homogeneização, diluições seriadas em água peptonada 0,1% (m/v) foram realizadas para que se pudesse realizar a contagem das células vegetativas. Alíquotas de 500µL das diluições adequadas foram transferidas para placas de Petri contendo o SPS Ágar (Sulfite Polymyxin Sulfadiazine Agar), um meio diferencial para microrganismos sulfito redutores, com plaqueamento em profundidade com sobrecamada, e incubadas a 37°C/48h em condições anaeróbicas (FIGURA 14).

Figura 14 - Crescimento de células vegetativas de *C. sporogenes* em meio SPS ágar após incubação.



FONTE: Do autor (2017).

Os endósporos de *C. sporogenes* na mortadela foram quantificados por meio da técnica do Número Mais Provável (NMP). Após homogeneização, as amostras foram submetidas ao choque térmico, 75°C/15 min, seguido de banho de gelo para inativação das células viáveis. Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram transferidas para tubos de rosca contendo 5 mL do Caldo *Reinforced Clostridium* Base, e incubados a 37°C/48h em condições anaeróbicas, geradas pela adição de óleo mineral. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.8 Análises tecnológicas

3.8.1 *Atividade de Água*

A atividade de água da mortadela foi avaliada diretamente em aparelho Aqualab modelo Séries 3TE (Dacagon Devices Inc.). Aproximadamente 2g das amostras foram dispostas em recipientes plásticos para leitura. A temperatura foi controlada ($25 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$) durante as leituras. Estas foram realizadas em triplicata.

3.8.2 *pH*

Os valores de pH das mortadelas foram medidos, em triplicata, de forma direta por meio da inserção de um eletrodo combinado, acoplado a um potenciômetro (DM20-Digimed, São Paulo, SP, Brasil).

3.8.3 *Concentração de nitrito residual*

A determinação dos teores de nitrito residual seguiu o método oficial nº 973.31 da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1998) com pequenas alterações (procedimento de extração) e a metodologia proposta por Merino (2009) (quantificação). Aproximadamente, 5g de mortadela foram triturados e homogeneizados com 40 mL de água destilada aquecida a 80°C . A solução foi então transferida para um balão volumétrico de 250 mL. Sucessivas lavagens foram conduzidas com água quente, até que o volume aproximado de 150 mL fosse atingido. O balão volumétrico permaneceu em banho-maria, sendo agitado ocasionalmente, por, aproximadamente, duas horas, a uma temperatura de 80°C . Após o repouso, o balão foi resfriado à temperatura ambiente e seu volume completado para 250 mL com água destilada, sendo então a solução filtrada.

Preparou-se dois reagentes denominados de Cor I e Cor II para quantificação da concentração de nitrito residual:

- Reagente de Cor I: 0,5 g de sulfanilamida foram dissolvidos em 25 mL de água destilada sob aquecimento. A solução foi esfriada, sendo adicionado 26,5 mL de

ácido clorídrico 1,0 M., sob constante agitação. Completou-se o volume para 100 mL com água destilada.

- Reagente de Cor II: 0,05 g de N- (1-naftil) etilenodiamine hidrocloreto foram dissolvidos em 50 mL de água destilada.

Um volume de 2,0 mL do filtrado foi transferido para tubos de ensaio envoltos em papel alumínio para proteção contra a luz. Adicionou-se 1 de mL de água, misturando-se a solução. 0,2 mL de solução Cor I foram adicionados a mistura e homogeneizados. Os tubos foram mantidos no escuro, a temperatura ambiente, por, aproximadamente, 5 min. 0,2 mL de solução Cor II foram adicionados a solução, agitando-a. 6,6 mL de água foram adicionados a solução, sendo esta mantida no escuro por 15 min (temperatura ambiente) para o desenvolvimento da cor. Decorrido este período de tempo, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. As análises foram realizadas em duplicatas e a concentração de nitrito residual determinada utilizando-se de uma curva analítica de NO_2Na .

3.8.4 Oxidação lipídica (índice de TBARS)

A análise do Índice de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) foi determinada segundo metodologia proposta por Raharjo, Sofos e Schmidt (1992), com pequenas alterações.

Cerca de 5 g de amostra foram pesadas e misturadas a 20 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% e 0,5 mL do butil hidroxitolueno (BHT) 0,15% (em etanol). A solução foi homogeneizada em aparelho Ultra-Turrax (Ika Labor Technik), por, aproximadamente, 30 segundos e filtrada em papel de filtro em um balão volumétrico de 25 mL. O volume foi completado com TCA 5%. Em seguida, adicionou-se 2 mL do reagente ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,08M ao filtrado, sendo então submetida a solução ao banho-maria fervente por exato 5 minutos. Decorrido este período, as soluções foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos e uma alíquota foi retirada para a leitura da absorbância a 532 nm.

Determinou-se a concentração de malonaldeído (MAD) a partir de uma curva analítica de calibração utilizando o 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). Os resultados foram expressos em miligramas de malonaldeído, por quilograma de amostra (mg de MAD/kg).

3.8.5 Cor Objetiva

O colorímetro espectrofotométrico CM700 (Konica Minolta Sensings Inc, Japão) foi utilizado para análise objetiva da cor final das mortadelas. O iluminante utilizado foi o D65 com ângulo 10° para o observador, luz especular excluída e o sistema de cor CIELAB, seguindo as recomendações descritas por Ramos et al. (2009) para produtos curados.

Os índices de cor L^* , a^* e b^* foram obtidos de acordo com o valor médio de cinco leituras realizadas em diferentes pontos de superfície interna das fatias de mortadela. Os índices de saturação (C^*), ângulo de tonalidade (H^*) e diferença global (ΔE^*) foram calculados de acordo com as fórmulas descritas por Ramos e Gomide (2007):

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

$$H^* = \tan^{-1}(b^*/a^*); \quad \text{(Equação 3)}$$

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad \text{(Equação 4)}$$

A diferença global (ΔE^*) foi calculada com relação aos controles de cada período de estocagem analisado.

3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura

Amostras de, aproximadamente, 1g de mortadela de cada tratamento analisado no tempo de 5 dias foram coletadas, armazenando-as em tubos Eppendorf com solução fixativa (Karnovisk's modificado com pH 7,5) por um período de 30 dias. Decorrido este tempo, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato por três vezes de 10 min cada, para retirar os resíduos de glutaraldeído que podiam reduzir o tetróxido de ósmio presentes na solução fixativa. Em seguida, as amostras foram lavadas com gradientes de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%) por três vezes de 10 min cada, afim de ocorrer desidratação. Após este processo, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico para completar a secagem por, aproximadamente, 40 min. As amostras foram montadas em *stubs* e então cobertas com banho de ouro e levadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura (LEO EVO 40 XVP, Carl Zeiss) com sistema de microanálise de raios X da Bruker (Quantax EDS) e criosystem (Gatan) para observação.

3.10 Análises Estatísticas

A técnica empregada para avaliar a atividade antimicrobiana das diferentes combinações dos óleos essenciais foi a análise dos componentes principais (PCA). Utilizou-se o *software Chemoface* para uma prévia análise para que se obtivesse o melhor ajuste dos dados.

O modelo de planejamento composto central rotacional (DCCR) foi utilizado para análise das combinações dos óleos essenciais e compostos majoritários por meio do *software Statistica 8.0* (STASOFT, 2008).

O experimento foi realizado com base em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para as análises microbiológicas, utilizou-se o esquema fatorial (5x5), sendo cinco tratamentos em cinco tempos de armazenamento. Já para as análises físico-químicas utilizou-se o esquema fatorial (5x3), sendo cinco tratamentos em três tempos de armazenamento. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com *software SISVAR*, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais

A Tabela 7 traz as concentrações mínimas bactericidas (CMB) encontradas para os óleos essenciais testados *in vitro* sobre *Clostridium sporogenes* ATCC 11437. A concentração mínima bactericida (CMB) é definida como a menor concentração do antimicrobiano que irá impedir o crescimento microbiano, sendo utilizada por muitos pesquisadores como indicativo do desempenho do antimicrobiano testado (ANDREWS, 2001). Neste trabalho, ela fornece informações sobre o desempenho dos óleos essenciais analisados.

Tabela 7 - Concentração mínima bactericida (CMB), em percentagem, dos diferentes óleos essenciais testados sobre *Clostridium sporogenes* ATCC 11437.

Óleos essenciais		CMB (%)
Nome popular	Nome científico	
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	0,10
Limão Taiti	<i>Citrus latifolia</i>	1,00
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	0,05
Cardamomo	<i>Elettaria cardamomum</i>	1,00
Pimenta-chinesa	<i>Litsea cubeba</i>	0,10

O óleo essencial de orégano apresentou a menor CMB *in vitro*, sendo o agente antimicrobiano mais eficiente frente ao crescimento de *C. sporogenes*. Ele foi seguido pelos óleos essenciais de canela e pimenta-chinesa, sendo óleos essenciais de limão Taiti e cardamomo os que apresentaram as maiores CMB.

As diferenças da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais são explicadas pela presença de um grande número de constituintes em concentrações variadas que influencia na ação e nos mecanismos de ação de cada óleo essencial. Eles são constituídos por inúmeros componentes e apesar dos componentes majoritários estarem diretamente associados a ação antimicrobiana de cada óleo essencial, muitas vezes a bioatividade do óleo pode ser atribuída a presença de uma mistura de componentes em menores concentrações, juntamente com o componente majoritário, que modificam a atividade do óleo exercendo efeito sinérgico (CALO et al., 2015; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

O óleo essencial de orégano apresenta como compostos majoritários os compostos fenólicos carvacrol e timol ambos com ação, principalmente, na membrana celular bacteriana, alterando sua permeabilidade. Além disso, há evidências de que alguns componentes presentes em menores quantidade que os compostos fenólicos, como γ -terpineno e p-cimeno, interferem na atividade antimicrobiana por produzirem efeito sinérgico entre os demais componentes (SILVA et al., 2010).

O óleo essencial de canela tem sua atividade antimicrobiana relacionada, principalmente, a presença de dois componentes majoritários: cinamaldeído e eugenol, ambos podendo atuar na membrana celular do microrganismo, alterando sua permeabilidade e danificando-a (BALAGUER et al., 2013; SHREAZ et al., 2012; BANG et al., 2000). Além disso, o eugenol, conhecido por ser um forte antioxidante, pode penetrar nos lipopolissacarídeos da membrana celular de bactérias Gram-Negativas, alterando sua estrutura celular e levando ao vazamento de constituintes intracelulares, levando as células ao colapso. A inibição das funções de proteínas e enzimas, como ATPases, fundamentais para síntese de ATP, também são observadas na presença deste composto (DEVI et al., 2010; GILL; HOLLEY, 2006; MOON; KIM; CHA, 2011).

O óleo essencial de pimenta-chinesa apresenta como composto majoritário o geraniol que apresenta, principalmente, elevada atividade antifúngica. Esta pode ser atribuída a dois efeitos combinados: um aumento da bicamada lipídica e extravasamento de íons. Esses efeitos alteram o equilíbrio osmótico da célula, tornando as proteínas associadas a membrana ineficientes, levando a célula a morte (CHEN; VILJOEN, 2010).

O óleo essencial de cardamomo apresenta constituição variada, sendo seus compostos majoritários o eucaliptol e o terpinol. Gochev et al. (2012) determinaram a composição química do extrato advindo das sementes de cardamomo por meio de extração com tetrafluoretano, encontrando como compostos majoritários (concentração superior a 3%) acetato de terpinila (36,8%), 1,8-cineol (29,2%), acetato de linalilo (5,2%), sabineno (3,9%) e linalol (3,1%). Neste estudo, também se comprovou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de cardamomo contra espécies patogênicas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Salmonella* Abony.

Os óleos essenciais derivados de frutas cítricas, como o óleo essencial de limão Taiti, apresentam como principais compostos monoterpênicos o citral, linalol e limoneno. (COLECIO-JUÁREZ et al., 2012). Apesar dos efeitos antimicrobianos do citral serem bem conhecidos, os mecanismos de inibição do crescimento microbiano, lesão e inativação celular não são completamente elucidados. Danos e ruptura da membrana celular têm sido observados

em tratamentos com citral e outros terpenos, levando a um extravasamento de íons específicos que tem efeitos sobre a força próton motiva, os níveis de ATP intracelular e o funcionamento geral das células microbianas (SOMOLINOS et al., 2010).

Ouattara et al. (1997) demonstraram que os óleos essenciais que possuem como compostos majoritários o timol, carvacrol e eugenol (como o orégano e a canela) apresentam maior atividade antimicrobiana do que outros óleos constituídos por outros componentes majoritários, corroborando com os dados encontrados no presente trabalho.

Rodrigues (2014) avaliou a atividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais contra *C. botulinum* tipo E, obtendo melhor efeito antimicrobiano com a utilização dos óleos essenciais de orégano e canela, sendo este último o que apresentou melhor atividade antimicrobiana (CMB de 0,5%), seguido do óleo essencial de orégano. Os óleos essenciais testados no presente trabalho apresentaram concentrações mínimas bactericidas abaixo ou próximas dos valores encontrados por este autor, sugerindo que essa baixa concentração é viável para a indústria alimentícia, podendo ser adicionada sem alterar de forma exacerbada as características sensoriais dos produtos.

4.2. Concentração mínima bactericida das combinações dos óleos essenciais

Os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais de orégano, canela, limão Taiti, cardamomo e pimenta-chinesa foram analisados, em duas combinações diferentes, utilizando-se a concentração mínima bactericida encontrada para cada óleo essencial (Tabelas 8 e 9). Os ensaios seguiram o modelo estatístico Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), sendo avaliado se houve crescimento microbiano (+) ou inibição do crescimento microbiano (-) pelas combinações dos óleos essenciais testadas. Por meio da Análise dos Componentes Principais (PCA) é possível verificar quais óleos contribuíram mais a atividade antimicrobiana de cada combinação (FIGURAS 15 e 16).

Tabela 8 - Proporções (em porcentagem) utilizadas na combinação 1 (óleos essenciais de canela, limão Taiti, cardamomo e pimenta-chinesa) e resposta quanto a atividade antimicrobiana.

Ensaio	Óleos essenciais (%)				Crescimento microbiano
	canela	limão Taiti	cardamomo	pimenta-chinesa	
1	0,00125	0,0575	0,0575	0,00125	+
2	0,00125	0,0575	0,0575	0,00375	-
3	0,00125	0,0575	0,1725	0,00125	-
4	0,00125	0,0575	0,1725	0,00375	-
5	0,00125	0,1725	0,0575	0,00125	-
6	0,00125	0,1725	0,0575	0,00375	-
7	0,00125	0,1725	0,1725	0,00125	-
8	0,00125	0,1725	0,1725	0,00375	-
9	0,00375	0,0575	0,0575	0,00125	-
10	0,00375	0,0575	0,0575	0,00375	-
11	0,00375	0,0575	0,1725	0,00125	-
12	0,00375	0,0575	0,1725	0,00375	-
13	0,00375	0,1725	0,0575	0,00125	-
14	0,00375	0,1725	0,0575	0,00375	-
15	0,00375	0,1725	0,1725	0,00125	-
16	0,00375	0,1725	0,1725	0,00375	-
17	0	0,115	0,115	0,0025	-
18	0,005	0,115	0,115	0,0025	-
19	0,0025	0	0,115	0,0025	+
20	0,0025	0,23	0,115	0,0025	-
21	0,0025	0,115	0	0,0025	-
22	0,0025	0,115	0,23	0,0025	-
23	0,0025	0,115	0,115	0	-
24	0,0025	0,115	0,115	0,005	-
25	0,0025	0,115	0,115	0,0025	-
26	0,0025	0,115	0,115	0,0025	-
27	0,0025	0,115	0,115	0,0025	-

*As porcentagens foram baseadas em 25% da CMB de cada óleo utilizado; (+): houve crescimento microbiano; (-): houve inibição do crescimento microbiano.

Tabela 9 - Proporções (em porcentagem) utilizadas na combinação 2 (óleos essenciais de orégano, canela, cardamomo e pimenta-chinesa) e resposta quanto a atividade antimicrobiana.

Ensaio	Óleos essenciais (%)				Crescimento microbiano
	orégano	canela	cardamomo	pimenta chinesa	
1	0,00125	0,0075	0,12	0,0075	+
2	0,00125	0,0075	0,12	0,0225	+
3	0,00125	0,0075	0,36	0,0075	-
4	0,00125	0,0075	0,36	0,0225	+
5	0,00125	0,0225	0,12	0,0075	-
6	0,00125	0,0225	0,12	0,0225	-
7	0,00125	0,0225	0,36	0,0075	-
8	0,00125	0,0225	0,36	0,0225	-
9	0,00375	0,0075	0,12	0,0075	+
10	0,00375	0,0075	0,12	0,0225	-
11	0,00375	0,0075	0,36	0,0075	+
12	0,00375	0,0075	0,36	0,0225	-
13	0,00375	0,0225	0,12	0,0075	-
14	0,00375	0,0225	0,12	0,0225	-
15	0,00375	0,0225	0,36	0,0075	-
16	0,00375	0,0225	0,36	0,0225	-
17	0	0,015	0,24	0,015	-
18	0,005	0,015	0,24	0,015	-
19	0,0025	0	0,24	0,015	+
20	0,0025	0,03	0,24	0,015	-
21	0,0025	0,015	0	0,015	+
22	0,0025	0,015	0,48	0,015	-
23	0,0025	0,015	0,24	0	+
24	0,0025	0,015	0,24	0,03	-
25	0,0025	0,015	0,24	0,015	-
26	0,0025	0,015	0,24	0,015	-
27	0,0025	0,015	0,24	0,015	-

*As porcentagens foram baseadas em 50% da CMB de cada óleo utilizado. (+): houve crescimento microbiano; (-): houve inibição do crescimento microbiano.

Figura 15 - Pesos da Análise de Componente Principais (PCA) da ação bactericida sobre *Clostridium sporogenes* dos diferentes ensaios da combinação 1 (óleo essencial de canela, limão Taiti, cardamomo e pimenta-chinesa).

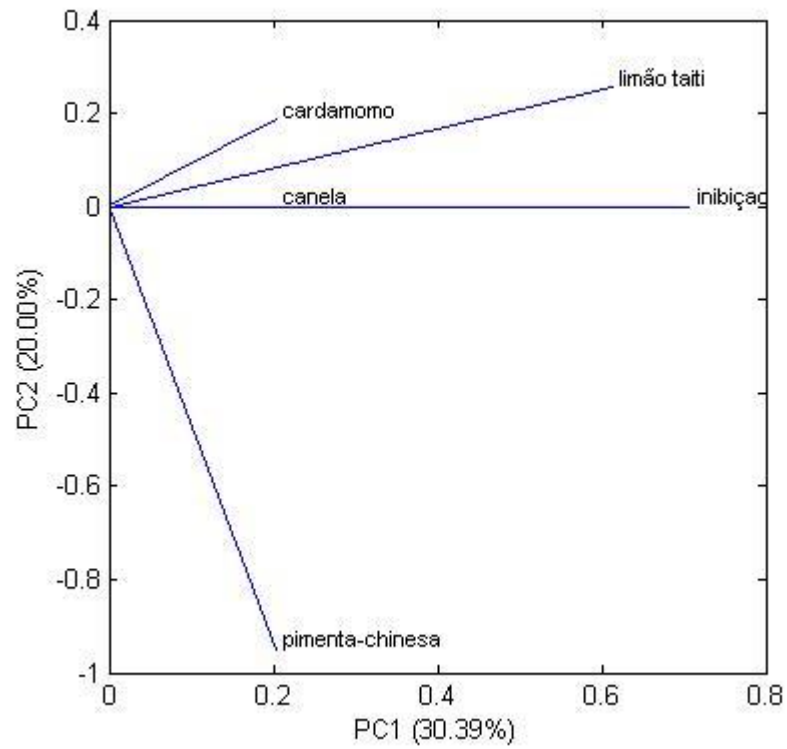
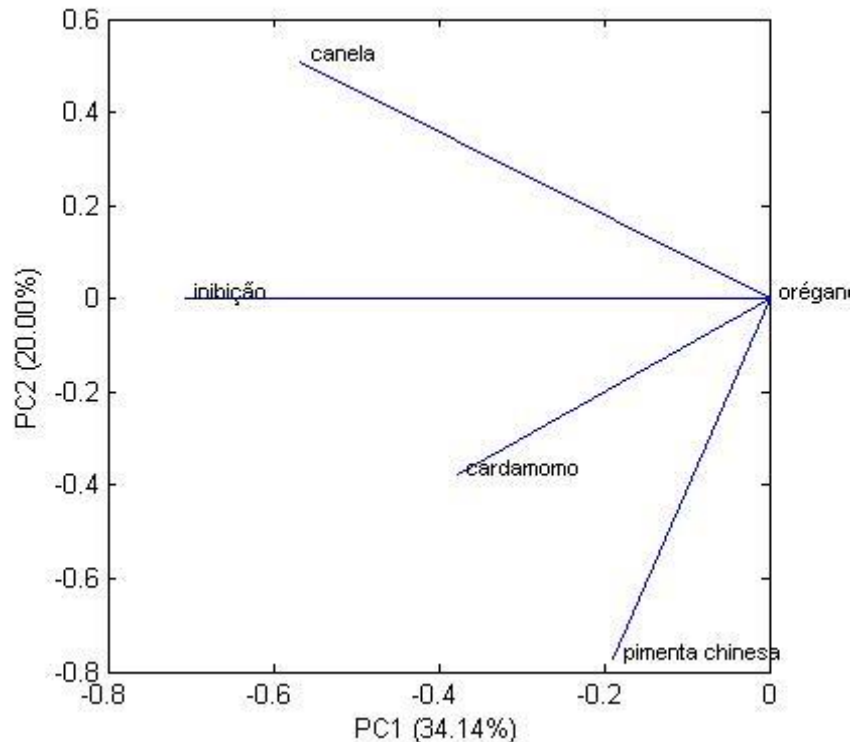


Figura 16 - Pesos da Análise de Componente Principais (PCA) para os diferentes ensaios da combinação 2 (óleo essencial de orégano, canela, cardamomo e pimenta-chinesa) sobre a inibição de *Clostridium sporogenes*.



Pode-se observar que, para a combinação 1 (com 25% da CMB de cada óleo), houve inibição do crescimento de *C. sporogenes* em praticamente todos os ensaios, com exceção dos ensaios de número 1 e 19, sugerindo um efeito sinérgico entre os óleos testados, uma vez que alcançaram elevada atividade antimicrobiana em baixas concentrações. Os ensaios onde se observou o menor crescimento microbiano (1 e 19) apresentaram as menores concentrações do óleo essencial de limão Taiti, 0,0575% e 0%, respectivamente, indicando que a ausência ou presença em baixas concentrações deste óleo favoreceu o crescimento microbiano, fato comprovado por meio da Análise dos Componentes Principais (PCA) na Figura 15, em que é possível constatar que o óleo essencial de limão Taiti foi o que apresentou maior contribuição para a inibição das células vegetativas de *C. sporogenes*, uma vez que ele se apresenta mais próximo da linha de inibição. Apesar deste óleo ter apresentado valor de CMB mais baixo (CMB de 1,00%) que os óleos essenciais de canela e pimenta-chinesa (ambos com CMB de 0,10%) quando utilizado sozinho nos ensaios *in vitro*, ao ser utilizado juntamente com esses óleos nesta combinação, foi potencializado, fazendo com que ele fosse o componente de maior influência sobre a inibição do crescimento de *C. sporogenes*. Ele foi seguido do óleo essencial

de cardamomo e canela que apresentaram atividades inibitórias intermediárias e semelhantes, sendo o óleo essencial de pimenta-chinesa o que apresentou menor contribuição na atividade bactericida.

Embora o óleo essencial de canela seja considerado um dos compostos antimicrobianos de maior atividade antimicrobiana, como a maioria dos estudos sugere uma vez que possui como compostos majoritários compostos fenólicos (eugenol e cinamaldeído), observou-se que ao ser utilizado com os óleos essenciais de limão Taiti, cardamomo e pimenta-chinesa nos ensaios da combinação 1, teve sua ação antimicrobiana diminuída, provavelmente devido a presença de algum outro componente majoritário ou até mesmo componentes encontrados em menores concentrações presentes nos demais óleos, o que levou a efeitos antagônicos (SAMARASEKERA; KALHARI; WEERASINGHE, 2005).

Para a combinação 2 (com 50% da CMB de cada óleo), observou-se que os ensaios 1, 2, 4, 9, 11, 19, 21 e 23 apresentaram crescimento de *C. sporogenes*. Nos demais ensaios, houve inibição. Apesar desta combinação ter apresentado efeitos antimicrobianos inferiores quando comparada a combinação 1, uma vez que se observou crescimento microbiano em 8 ensaios, a maioria dos ensaios apresentou atividade bactericida, o que sugere o sinergismo antimicrobiano entre os óleos essenciais. O óleo essencial de canela foi o que apresentou maior contribuição na inibição das células de *Clostridium sporogenes* nesta combinação, como mostra a Análise dos Componentes Principais (PCA) na Figura 16. Ele foi seguido dos óleos essenciais de cardamomo e pimenta-chinesa que apresentaram atividade bactericida semelhantes. Apesar do óleo essencial de orégano ser descrito na literatura como um dos antimicrobianos mais eficientes devido a presença do carvacrol (um composto fenólico) como composto majoritário, ao ser utilizado em conjunto com os óleos essenciais de canela, pimenta-chinesa e cardamomo, teve sua atividade antimicrobiana afetada, não influenciando de forma significativa na inibição do *C. sporogenes*, apresentando menor contribuição na atividade antimicrobiana (maior distância da linha de inibição) (BOUDINE et al., 2016; PESAVENTO et al., 2015).

O raciocínio sinérgico para o uso de óleos essenciais de forma combinada se baseia no fato de que os óleos combinados apresentam múltiplos modos de ação, respeitando o princípio de que a ação de um óleo combinado é maior do que a soma total dos componentes químicos conhecidos e desconhecidos. A sinergia representa uma forma de interação dinâmica em oposição a simples resposta de adição. Não é necessariamente sempre positiva, uma vez que o antagonismo também pode ocorrer e, ambas as situações, podem existir dentro de dado óleo

essencial e de mistura de óleos essenciais, dependendo da dose, aplicação e propriedades (HARRIS, 2002).

As diferenças encontradas quanto as atividades antimicrobianas dos diferentes óleos essenciais testados podem ser explicadas devido a natureza dos óleos, composição, grupos funcionais, e possíveis interações (sinérgicas ou antagônicas). Essas diferenças encontradas entre os óleos podem ser decorrentes de fatores ecológicos e de crescimento das plantas (CHANG; CHEN; CHANG, 2011).

Com base nos efeitos sinérgicos observados nas combinações, nos resultados bactericidas e nos possíveis impactos sensoriais da adição dos óleos na mortadela, foram selecionados um ensaio de cada combinação (ensaio 17 em ambas as combinações) para elaboração das nanoemulsões e adição no produto cárneo. Foram elas: combinação 1 (0% óleo de canela + 0,115% óleo de limão Taiti + 0,115% óleo de cardamomo + 0,0025% óleo de pimenta chinesa); combinação 2 (0% óleo de orégano + 0,015% óleo de canela + 0,24% óleo de cardamomo + 0,015% óleo de pimenta-chinesa).

4.3 Caracterização das nanoemulsões: diâmetro hidrodinâmico médio das partículas e índice de polidispersividade (PDI)

As duas nanoemulsões elaboradas (TRAT 3 e TRAT 4) foram caracterizadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio de partículas e ao índice de polidispersividade (PDI) (Tabela 10).

Tabela 10 - Caracterização do diâmetro médio das partículas para os TRAT 3 e TRAT 4.

Tratamentos*	DH (nm)	d10 (nm)	d50 (nm)	d90 (nm)	PDI
TRAT 3	47,3	2,10	6,60	22,9	3,15
TRAT 4	45,5	2,11	6,30	20,0	2,84

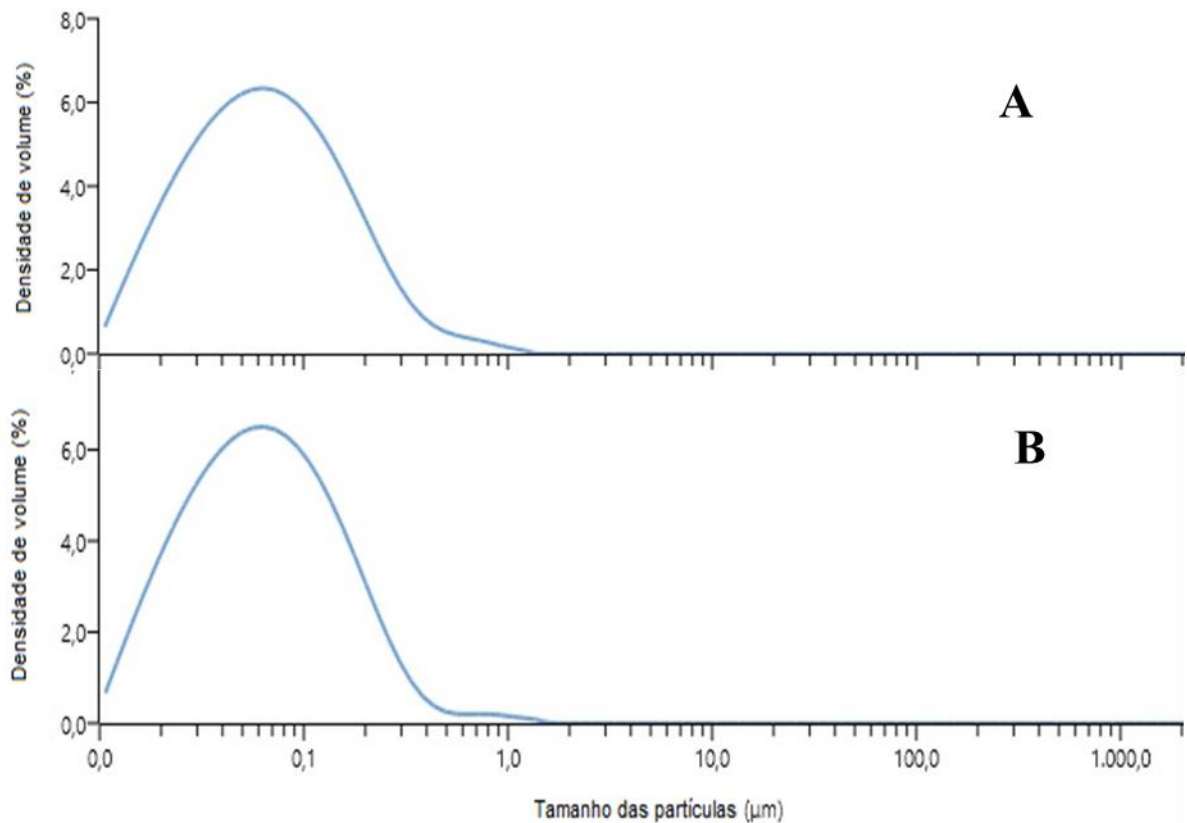
* TRAT 3: nanoemulsão constituída por 0,0225% óleo de pimenta chinesa, 1,035% óleo de cardamomo, 1,035% óleo de limão Taiti; TRAT 4: nanoemulsão constituída por 1,8% óleo de cardamomo, 0,1125% óleo de pimenta chinesa, 0,1125% óleo de canela.

O índice de polidispersividade (PDI) fornece informações sobre o grau de homogeneidade de uma amostra. Quanto menor o seu valor, maior será a homogeneidade do diâmetro de partículas no sistema e vice-versa (CHEONG; TAN, 2010; LIU; WU, 2010). Valores inferiores a 0,1 podem estar associados a elevada homogeneidade na distribuição do diâmetro das partículas. Já os valores superiores a 0,1, mostram ampla distribuição de tamanho

das partículas (GAUMET et al., 2008). Ambos os tratamentos apresentaram PDI superior a 0,1, indicando que há maior dispersão do tamanho das partículas das nanoemulsões elaboradas. Quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio das partículas (DH), ambos os tratamentos apresentaram DH em escala nanométrica, confirmando que a emulsão elaborada corresponde a uma nanoemulsão.

A Figura 17 mostra a variação da densidade de volume de amostra (%) em função dos diâmetros das partículas encontrados para cada nanoemulsão.

Figura 17 - Variação da densidade de volume da amostra (%) em função do diâmetro das partículas (μm) da (A) nanoemulsão 1 (TRAT 3) e (B) nanoemulsão 2 (TRAT 4).



Observa-se que, ambas as nanoemulsões elaboradas, apresentaram a maior parte das partículas com diâmetro em escala nanométrica (inferiores a $0,1\mu\text{m}$) (FIGURA 17).

O tamanho diminuto das partículas das nanoemulsões significa que elas geralmente possuem melhor estabilidade física contra a separação gravitacional, floculação e coalescência do que as emulsões convencionais. Além disso, à medida que o tamanho das partículas diminui, a atividade biológica dos compostos ativos encapsulados dentro de emulsões ou nanoemulsões

aumenta, fazendo com que haja uma maior interação entre os óleos essenciais e a membrana celular microbiana, levando a célula a morte. Além disso, os materiais encapsulantes fazem o escudo entre os óleos essenciais e a matriz alimentar, entregando-os em locais específicos (fases com alto teor de água, onde os microrganismos proliferam preferencialmente) com maior estabilidade e dispersibilidade. Além disso, os OE's podem agir sinergicamente com o agente transportador, aumentando assim a atividade antimicrobiana dos OE's nanoencapsulados (CHANG; McLANDSBOROUGH; McCLEMENTS, 2015; PRAKASH et al., 2018). Logo, a encapsulação de componentes funcionais em nanoemulsões se mostra, em muitos aspectos, muito eficiente, despontando como excelente ferramenta para o uso de antimicrobianos naturais nos alimentos.

Moraes-Lovison et al. (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano nanoemulsionado contra *S. aureus* e *E. coli*, *in vitro* e em patê de frango, comprovando efeito antimicrobiano da nanoemulsão, não tendo observado alterações nas características físico-químicas do produto à base de carne. Guerra-Rosas et al. (2017) verificaram a atividade antimicrobiana de nanoemulsões elaboradas com os óleos essenciais de tomilho, limão, orégano e pectina de alta metoxilação contra *E. coli* e *Listeria innocua* durante 56 dias de armazenamento, comprovando a eficácia das nanoemulsões no controle do crescimento microbiano, sendo a nanoemulsão composta por limão e pectina a que apresentou maior atividade antimicrobiana. Foi observada diminuição na atividade antimicrobiana durante o tempo de armazenamento, independentemente do tipo de óleo essencial utilizado, relacionando à perda de compostos voláteis ao longo do tempo.

4.4 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais combinados e das nanoemulsões incorporadas por eles sobre células vegetativas e endósporos de *Clostridium sporogenes* inoculado em mortadela

A contagem de células vegetativas foi afetada significativamente ($P < 0,05$) pelos tratamentos e pelo tempo de estocagem. Porém, não houve interação significativa entre os dois parâmetros ($P > 0,05$). Já a contagem de endósporos foi afetada de forma significativa ($P < 0,05$) apenas com os tempos de estocagem, não sendo afetada significativamente pelos tratamentos ($P > 0,05$). Não houve interação significativa entre os tratamentos e tempo de estocagem das mortadelas. A partir dos dados obtidos pela ANOVA, foi realizado o Teste de Tukey para os

parâmetros que influenciaram na contagem microbiana de forma significativa (TABELAS 11 e 12).

Tabela 11 - Efeito dos tratamentos e dos tempos de armazenamento sobre células vegetativas de *Clostridium sporogenes* (Log UFC/g) inoculadas em mortadelas adicionadas de 75 ppm de nitrito de sódio e combinações de óleos essenciais ou nanoemulsionados, armazenados a 14°C durante 20 dias.

Tratamentos	<i>Clostridium sporogenes</i> (Log UFC/g)
CONTROLE	5,15c ± 0,76
TRAT 1	4,50ab ± 0,76
TRAT 2	4,72bc ± 0,93
TRAT 3	4,19a ± 0,76
TRAT 4	4,40ab ± 0,96

Controle: sem adição de óleos essenciais; TRAT 1: 0,115% óleo de limão Taiti, 0,115% óleo de cardamomo, 0,0025% óleo de pimenta chinesa;; TRAT 2: 0,015% óleo de canela, 0,24% óleo de cardamomo, 0,015% óleo de pimenta chinesa; TRAT 3: nanoemulsão constituída por 0,0225% óleo de pimenta chinesa, 1,035% óleo de cardamomo, 1,035% óleo de limão Taiti; TRAT 4: nanoemulsão constituída por 1,8% óleo de cardamomo, 0,1125% óleo de pimenta chinesa, 0,1125% óleo de canela. Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Embora tenha ocorrido a adição de 75 ppm de nitrito nas mortadelas, este não inibiu o crescimento de *C. sporogenes*, uma vez que houve maior crescimento da bactéria no tratamento controle do que nos tratamentos contendo os óleos essenciais.

Os TRAT 1, TRAT 3, e TRAT 4 apresentaram as maiores atividades antimicrobianas, sendo os TRAT 3 e TRAT 4 constituídos por nanoemulsões dos óleos essenciais combinados. O TRAT 3 (contendo a nanoemulsão elaborada com os óleos essenciais de limão Taiti, cardamomo e pimenta-chinesa) foi o que apresentou maior redução no número de células vegetativas em relação ao tratamento controle (0,96 Log UFC/g), seguido do TRAT 4 (0,75 Log UFC/g) e TRAT 1 (0,65 Log UFC/g).

O TRAT 2 apresentou a menor atividade antimicrobiana entre todos os tratamentos analisados, não se diferenciando estatisticamente do tratamento controle, sendo condizente com os resultados encontrados na avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais combinados *in vitro*, onde a combinação 2 apresentou menor atividade bactericida.

Todos os tratamentos indicaram uma redução no número de células vegetativas de *Clostridium sporogenes* em relação ao tratamento controle, porém os TRAT 1, TRAT 3 e TRAT 4 apresentaram as maiores atividades antimicrobianas, sugerindo então que tanto a utilização

de óleos essenciais de forma livre quanto nanoemulsionados aponta como uma excelente alternativa ao controle microbiano no tipo de produto cárneo elaborado.

Ao se analisar a influência do tempo de estocagem (Tabela 12), percebe-se que logo após a inoculação (tempo de 0 dias) o número de células vegetativas de *C. sporogenes* foi o menor entre todos os tempos de análise, embora não tenha se diferenciado de forma significativa do tempo 20 dias. Esta baixa contagem se deve, provavelmente, ao fato de que as células inoculadas não se distribuíram de forma uniforme por toda a matriz alimentar, uma vez que esta é complexa, interagindo com constituintes alimentares, dificultando o plaqueamento.

Tabela 12 - Efeito do tempo de armazenamento sobre o número médio (\pm desvio padrão) de células vegetativas e endósporos de *Clostridium sporogenes* (Log UFC/g) inoculados em mortadelas adicionadas de 75 ppm de nitrito de sódio e combinações de óleos essenciais ou nanoemulsionados, armazenados a 14°C durante 20 dias.

Tempo (dias)	<i>Clostridium sporogenes</i> (Log UFC/g)	Endósporos de <i>Clostridium sporogenes</i> (Log UFC/g)
0	3,82a \pm 0,55	0b
5	5,68d \pm 0,39	-*
10	5,11c \pm 0,67	3,63a \pm 0,36
15	4,45b \pm 0,58	3,77a \pm 0,31
20	3,90a \pm 0,19	3,88a \pm 0,15

Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

*não foi possível realizar a contagem no tempo de 5 dias de armazenamento.

Na análise do tempo 5 dias, percebe-se que houve aumento no crescimento de *Clostridium sporogenes* em relação ao tempo 0 dias (1,86 Log UFC/g), sugerindo que os antimicrobianos testados ainda não começaram a atuar, permitindo seu crescimento.

Após o quinto dia de armazenamento, observa-se decréscimo na contagem microbiana, indicando que os antimicrobianos testados tiveram sua ação iniciada. Observa-se uma redução de 1,90 Log UFC/g na contagem microbiana no tempo 20 dias em relação ao tempo 5 dias, onde foi observada a maior contagem celular. Essa ação tardia pode ser explicada pelo fato de que a matriz alimentar complexa dificulta o acesso dos óleos essenciais as células microbianas, que estão espalhadas por todo o alimento, fazendo então com que estes óleos demorem um pouco mais para alcançar seus sítios alvo de ação. Um outro fator que também explicaria uma redução na contagem de células vegetativas de *Clostridium sporogenes* após o período de cinco

dias é a esporulação. Com relação a contagem inicial, tempo 0 dias, foi observado aumento médio na contagem de endósporos de 3,76 Log UFC/g ao longo do período de armazenamento da mortadela, sugerindo que nenhum dos tratamentos realizados foi eficiente no controle da formação de endósporos por *C. sporogenes*.

Endósporos bacterianos apresentam-se como estruturas biológicas altamente resistentes que sobrevivem a condições adversas. São formados por várias camadas protetoras que os confere elevada resistência. Sua resistência favorece sua sobrevivência em alimentos que não foram devidamente armazenados ou processados, permitindo que células vegetativas se multipliquem após o processo de germinação do endósporo em ampla faixa de temperaturas, pH e atividade da água, levando a deterioração de alimentos ou toxinfecções alimentares (principalmente por *Bacillus cereus*, *C. perfringens* e *C. botulinum*) (CARLIN, 2011).

O processo de germinação pode ser espontâneo, quando em condições favoráveis tais como a presença de nutrientes inorgânicos, aminoácidos e açúcares, ou ainda induzido por situações de stress como o calor, a pressão hidrostática, o baixo pH, agentes químicos ou pelo armazenamento durante meses a 4°C ou à temperatura ambiente (GOULD, 2006).

A esporulação é iniciada devido à escassez de nutrientes, que aumenta com o tempo de armazenamento e consequente utilização dos nutrientes pelas células vegetativas, ou alterações ambientais como temperatura, pH, disponibilidade de oxigênio. De forma geral, a esporulação é favorecida em condições de stress que acabam por diminuir o crescimento de células vegetativas (MITCHELL, 2001).

Dias et al. (2015) avaliaram os efeitos antimicrobianos de combinações de óleos essenciais sobre *Clostridium perfringens* em mortadelas adicionadas de 75 ppm de nitrito de sódio. Foram analisadas 3 combinações diferentes: 75 ppm de nitrito e 3,1% de óleo essencial de orégano; 75 ppm de nitrito e 1% de óleo essencial de capim-limão, 2% de óleo essencial de cravo-da-índia e 1% óleo essencial de tomilho; 75 ppm de nitrito e 2,5% de óleo essencial de orégano, 0,6% de óleo essencial de cravo-da-índia e 0,3% de óleo essencial de tomilho. Foi verificado uma redução no número de microrganismos nos tratamentos que continham os óleos essenciais, sendo o tratamento mais eficiente aquele contendo óleos essenciais de orégano (2,5%), tomilho (0,3%) e cravo-da-índia (0,6%) (concentrações superiores as que utilizadas no presente experimento).

Martins (2016) analisou o sinergismo antimicrobiano dos óleos essenciais de manjeriço, cravo-da-índia, limão Taiti, tomilho, pimenta-chinesa, pimenta-preta e noz-moscada, além de nitrito de sódio, sobre *C. sporogenes* ATCC 3584 inoculado em fiambre de

peito de frango e armazenados em duas temperaturas diferentes (14°C e 7°C) por 21 dias, verificando que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos, tempos e temperaturas de estocagem no crescimento de *C. sporogenes*. Os tratamentos contendo óleos essenciais se diferenciaram do tratamento contendo apenas nitrito de sódio (75 ppm), sendo mais eficientes na redução de células vegetativas de *C. sporogenes* a 7°C. Não houve diferença significativa em relação ao tratamento contendo 150 ppm de nitrito. O tratamento de maior atividade antimicrobiana encontrado continha 75 ppm de nitrito de sódio e óleos essenciais de manjeriço (0,054%), pimenta-preta (0,054%), limão (0,054%) e tomilho (0,110%), alcançando elevada atividade antimicrobiana com o tempo em ambas as temperaturas analisadas.

Salvia-Trujillo et al. (2015) avaliaram as características físico-químicas e atividade antimicrobiana de emulsões e nanoemulsões incorporadas de diferentes óleos essenciais em sistemas alimentares, verificando que as nanoemulsões incorporadas com os óleos essenciais de limão, cravo, tomilho ou palmarosa foram aquelas com maior ação bactericida *in vitro* contra *E. coli*, após curto período de contato. Além disso, observou-se inativação microbiana mais rápida no caso de nanoemulsões contendo os óleos essenciais de limão ou de cravo em comparação com suas respectivas emulsões grosseiras. Dessa forma, evidenciou-se a vantagens de se usar nanoemulsões como sistemas de entrega de agentes aromatizantes e conservantes na indústria alimentícia.

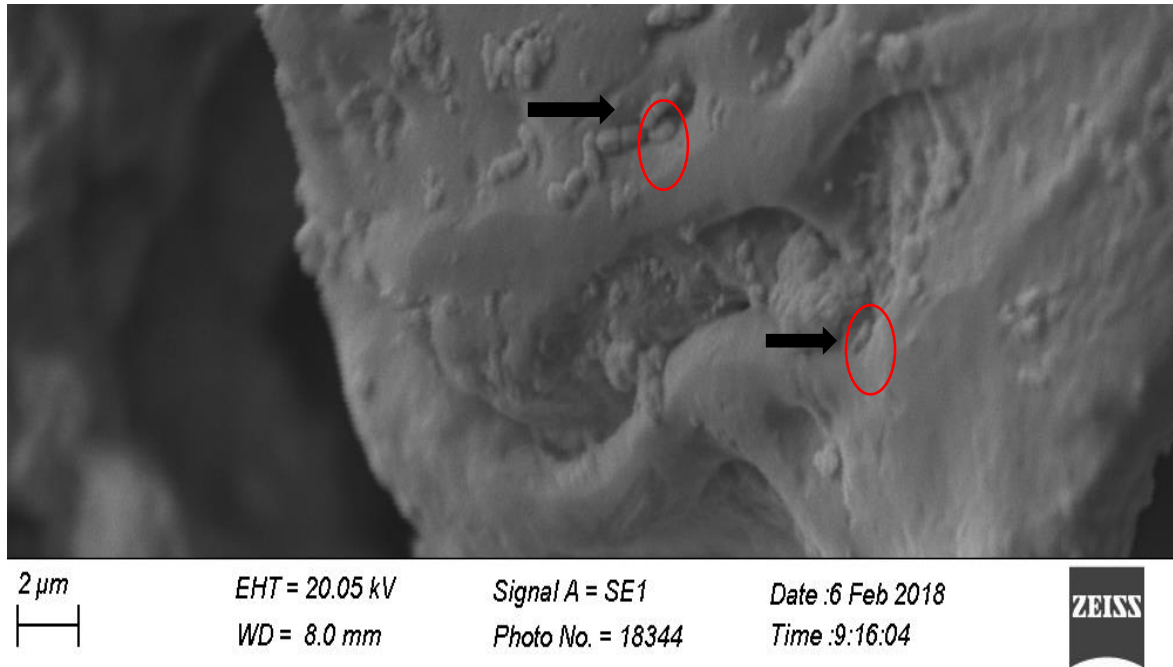
Oliveira et al. (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Satureja montana* L. contra *C. perfringens* Tipo A inoculado em mortadelas formuladas com diferentes concentrações do óleo essencial e de nitrito de sódio, armazenadas durante 30 dias, verificando uma diminuição significativa no número de células vegetativas com os tratamentos, porém, constataram um elevado número de endósporos ao final do período de estocagem para todos os tratamentos avaliados, em conformidade com o presente trabalho.

De maneira geral, o presente trabalho mostra que os tratamentos contendo os óleos essenciais se diferenciaram do tratamento controle, contendo 75 ppm de nitrito de sódio, sendo mais eficientes na redução de *Clostridium sporogenes*. Logo, a adição de compostos naturais como os óleos essenciais em produtos cárneos pode ser considerada uma alternativa viável no controle microbiano. Porém, concentrações mais elevadas destes óleos e nitrito devem ser avaliadas afim de se obter melhores resultados frente a inativação de endósporos de *C. sporogenes*.

A Figura 18 traz a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do tratamento 3 no tempo de 5 dias, nos quais são observadas células microbianas na mortadela. Os demais

tratamentos, por apresentarem superfícies muito irregulares, dificultaram a análise microscópica, não sendo por isso apresentadas imagens neste trabalho.

Figura 18 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da mortadela tratada com a nanoemulsão 1 (TRAT 3) no período de 5 dias de armazenamento com um aumento de 6220x.



Setas indicam células de *Clostridium sporogenes* visíveis ao MEV.
Fonte: Do autor (2017).

4.5 Análises Tecnológicas

Os valores médios (\pm desvio padrão) de pH e atividade de água encontrados para cada tratamento e para os tempos de estocagem estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores médios (\pm desvio padrão) de pH e atividade de água (A_w) para os tratamentos e tempos 1, 21 e 30 dias.

Tratamentos	pH	A_w
CONTROLE	6,50 \pm 0,20	0,966 \pm 0,0040
TRAT 1	6,45 \pm 0,19	0,968 \pm 0,0064
TRAT 2	6,46 \pm 0,18	0,968 \pm 0,0038
TRAT 3	6,48 \pm 0,17	0,969 \pm 0,0040
TRAT 4	6,57 \pm 0,16	0,966 \pm 0,0039
Tempo (dias)	pH	A_w
1	6,58 \pm 0,19	0,964 \pm 0,0040
21	6,48 \pm 0,14	0,967 \pm 0,0036
30	6,41 \pm 0,15	0,970 \pm 0,0040

Controle: sem adição de óleos essenciais; TRAT 1: 0,115% óleo de limão Taiti, 0,115% óleo de cardamomo, 0,0025% óleo de pimenta-chinesa; TRAT 2: 0,015% óleo de canela, 0,24% óleo de cardamomo, 0,015% óleo de pimenta chinesa; TRAT 3: nanoemulsão constituída por 0,0225% óleo de pimenta-chinesa, 1,035% óleo de cardamomo, 1,035% óleo de limão Taiti; TRAT 4: nanoemulsão constituída por 1,8% óleo de cardamomo, 0,1125% óleo de pimenta-chinesa, 0,1125% óleo de canela.

O conteúdo de água livre, umidade e pH são fatores que influenciam nas modificações físicas e químicas de produtos cárneos curados, além de também influenciarem na multiplicação dos microrganismos, afetando assim a qualidade e estabilidade desses produtos (TERRA; FREITAS; CICHOSKI, 2007).

Todos os tratamentos avaliados apresentaram valores muito próximos de pH e atividade de água, sendo o TRAT 4 o que apresentou maior pH e o TRAT 3 o que apresentou maior atividade de água, sendo ambos os tratamentos elaborados a partir de nanoemulsões de óleos essenciais.

A diminuição dos valores de pH durante o tempo de armazenamento do produto cárneo embalado a vácuo pode ser explicada devido a presença de bactérias do ácido lático, como *Lactobacillus* spp. e *Leuconostoc* spp., naturalmente presentes na carne, as quais são capazes de crescer até valores de pH de 3,8 em ambientes de anaerobiose, causando defeitos na carne como os “off-odours” e “off-flavours”, além de levarem a uma descoloração e perda de gás (BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996; FORSYTHE, 2002).

Observou-se um aumento na atividade de água dos tratamentos com relação ao tempo de estocagem. Fiorda e Siqueira (2009) avaliaram o pH e atividade de água de produtos cárneos comerciais com objetivo de avaliar a segurança destes produtos quanto ao desenvolvimento de patógenos, verificando uma atividade de 0,957 em mortadelas embaladas a vácuo durante o período de vida útil destes produtos. Valores semelhantes foram encontrados neste trabalho.

Segundo Rödel, Scheuer e Wagner (1990), embutidos em geral, apresentam atividades de água dessa ordem.

Espécies de *Clostridium* normalmente se desenvolvem em valores de pH superiores a 4,5 e em elevada atividade de água, entre 0,95 e 0,98 (HOSPITAL et al, 2016). O produto cárneo elaborado, a mortadela, apresentou valores de pH médio e atividade de água média nestas faixas, indicando condições físico-químicas favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos deste gênero, como *C. sporogenes* e *C. botulinum*, causador do botulismo.

Os teores médios de nitrito residual (\pm desvio padrão) encontrados para cada tratamento e para os tempos de estocagem estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14 - Teores médios (\pm desvio padrão) de nitrito residual encontrados para os tempos de armazenamento e para os tratamentos das mortadelas.

Tratamentos	Nitrito residual (mg/Kg de produto)
CONTROLE	33,55 \pm 2,74
TRAT 1	33,55 \pm 10,92
TRAT 2	33,21 \pm 11,18
TRAT 3	45,00 \pm 17,45
TRAT 4	56,86 \pm 11,00
Tempo (dias)	Nitrito residual (mg/Kg de produto)
1	52,45 \pm 13,63
21	35,38 \pm 12,10
30	33,47 \pm 7,87

Controle: sem adição de óleos essenciais; TRAT 1: 0,115% óleo de limão Taiti, 0,115% óleo de cardamomo, 0,0025% óleo de pimenta-chinesa;; TRAT 2: 0,015% óleo de canela, 0,24% óleo de cardamomo, 0,015% óleo de pimenta chinesa; TRAT 3: nanoemulsão constituída por 0,0225% óleo de pimenta-chinesa, 1,035% óleo de cardamomo, 1,035% óleo de limão Taiti; TRAT 4: nanoemulsão constituída por 1,8% óleo de cardamomo, 0,1125% óleo de pimenta-chinesa, 0,1125% óleo de canela.

Em todos os tratamentos observou-se diminuição nos níveis de nitrito com relação a quantidade adicionada inicialmente (75 ppm), independente da combinação de óleos essenciais utilizada. Os tratamentos compostos pelas nanoemulsões (TRAT 3 e TRAT 4) apresentaram menor redução nos níveis de nitrito, sugerindo que esses tratamentos apresentaram maior estabilidade do nitrito adicionado, dificultando sua reação com outros componentes químicos presentes no produto cárneo.

Os teores de nitrito residual encontrados para os dias de estocagem das mortadelas demonstraram uma diminuição nos níveis de nitrito com o tempo de armazenamento. Quando o nitrito de sódio é adicionado em produtos cárneos, ele reage com uma série de componentes químicos (como proteínas, lipídios, mioglobina entre outros), diminuindo seus níveis, até que

estes se tornem indetectáveis (SINDELAR; MILKOWSKI, 2011). A reação de nitrito de sódio com outros constituintes acarreta uma diminuição nos níveis de nitrito residual e consequente diminuição nos níveis de nitrosaminas, fato benéfico a saúde do consumidor. Porém, um menor teor de nitrito residual no produto cárneo apresenta menor atividade antimicrobiana, podendo não inibir de forma eficiente o crescimento do microrganismo de interesse.

Além do tempo de estocagem, outros fatores como pH, tratamento térmico e adição de ascorbato ou polifosfatos influenciam nos níveis de nitrito residual encontrados nos produtos cárneos, favorecendo sua diminuição. Valores de pH mais baixos favorecem a diminuição nos teores de nitrito. Quanto maior o aquecimento, maior é a perda de nitrito. Aproximadamente, dois terços de nitrito de sódio são perdidos durante o período de tempo entre sua adição e o final do tratamento térmico. A adição de ascorbato ou polifosfatos busca uma diminuição nos níveis de nitrosaminas uma vez que reagem com nitrito em uma ampla faixa de pH. Além disso, o ascorbato diminui a produção da toxina botulínica produzida por cepas proteolíticas de *Clostridium botulinum* tipo A e B (HONIKEL, 2008; HUSTAD et al., 1973; CASSENS; 1997; SEN; BADDOO, 1997).

Para que o controle antimicrobiano ocorra, são necessários, aproximadamente, 10mg/Kg de nitrito residual no produto cárneo final, sendo que a adição de concentrações inferiores a 150 mg/Kg no produto cárneo é considerada insuficiente para que estes níveis de nitrito residual sejam alcançados (CASSENS; 1997). Apesar de terem sido adicionados 75 mg/Kg de nitrito de sódio em todos os tratamentos, observou-se concentrações superiores a 10 mg/Kg de nitrito residual no produto cárneo em todos os tratamentos, sugerindo que esta concentração adicionada inicialmente é suficiente para que o controle microbiano ocorra.

O nitrito adicionado em produtos cárneos apresenta uma série de ações. Quanto aos mecanismos antimicrobianos, sabe-se que sua eficácia é dependente dos níveis de nitrito residual, pH, concentração de sal, agentes redutores presentes, teor de ferro, entre outros. Sua inibição contra bactérias ocorre de forma mais efetiva em baixos pH, sugerindo que a ação antimicrobiana do nitrito está associada com a geração de óxido nítrico ou ácido nitroso. Logo, é provável que as reações de nitrito relacionadas ao desenvolvimento da cor característica da carne curada também são importantes para as propriedades antimicrobianas atribuídas ao nitrito (SINDELAR; MILKOWSKI, 2012).

Simões (2016) ao avaliar os efeitos antimicrobianos de diferentes combinações de óleos essenciais e compostos majoritários em apresuntados inoculados com *C. sporogenes* observou a redução do nitrito residual, após 30 dias de armazenamento, de aproximadamente, 54% para

o controle adicionado inicialmente com 150 ppm de nitrito. No controle adicionado de 75 ppm de nitrito houve redução de 39%. Já os apresuntados adicionados inicialmente de 75 ppm, diferentes combinações de óleos essenciais e compostos majoritários, apresentaram redução de 34% (tratamento contendo 75 ppm de nitrito+ 0,085 % óleo de canela, 0,19% óleo de orégano, 0,05% cinamaldeído, 0,22% carvacrol) e 32% (tratamento contendo 75 ppm de nitrito +0,1% óleo de canela, 0,14% óleo de orégano, 0,06% cinamaldeído, 0,16% carvacrol), apresentando teores de nitrito residual próximos aos encontrados no presente trabalho.

Dias et al. (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais sobre *C. perfringens* tipo A inoculado em mortadelas e a influência destes óleos sobre a qualidade do produto cárneo, constatando que a adição de 150 ppm de nitrito de sódio e 75 ppm não foram totalmente eficientes no controle microbiano, porém os óleos essenciais apresentaram efeito inibitório significativo. Todos os tratamentos apresentaram redução no teor de nitrito com o tempo de armazenamento, sendo encontrados 10 ppm de nitrito residual em todos os tratamentos até o 10º dia de estocagem. As concentrações mais elevadas de nitrito residual foram encontradas em mortadelas contendo os óleos essenciais, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho em que os tratamentos contendo as combinações dos óleos essenciais apresentaram os maiores níveis de nitrito residual.

Os valores médios (\pm desvio padrão) encontrados para o Índice de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) para os tratamentos e tempos de armazenamento estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15 - Valores médios (\pm desvio padrão) do índice TBARS para os tratamentos e tempos de armazenamento das mortadelas.

Tratamentos	TBARS (mg MAD/Kg produto)
CONTROLE	1,35 \pm 0,78
TRAT 1	0,79 \pm 0,41
TRAT 2	1,13 \pm 0,40
TRAT 3	0,73 \pm 0,29
TRAT 4	0,89 \pm 0,56
Tempo (dias)	TBARS (mg MAD/Kg produto)
1	1,19 \pm 0,53
21	1,09 \pm 0,63
30	0,65 \pm 0,22

Controle: sem adição de óleos essenciais; TRAT 1: 0,115% óleo de limão Taiti, 0,115% óleo de cardamomo, 0,0025% óleo de pimenta chinesa;; TRAT 2: 0,015% óleo de canela, 0,24% óleo de cardamomo, 0,015% óleo de pimenta chinesa; TRAT 3: nanoemulsão constituída por 0,0225% óleo de pimenta chinesa, 1,035% óleo de cardamomo, 1,035% óleo de limão Taiti; TRAT 4: nanoemulsão constituída por 1,8% óleo de cardamomo, 0,1125% óleo de pimenta chinesa, 0,1125% óleo de canela.

A análise do Índice de Substâncias Reativas ao o Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) é um dos métodos mais utilizados para quantificação da oxidação lipídica em produtos cárneos. O teste quantifica o malonaldeído, produto secundário da oxidação lipídica, originado por meio da decomposição dos hidroperóxidos dos ácidos graxos poli-insaturados formados durante o processo oxidativo (KIRSCHNIK et al., 2013).

A oxidação lipídica é indesejável uma vez que altera as características sensoriais do produto, levando ao desenvolvimento de sabor e odor característicos de ranço, leva a perdas nutricionais e produção de compostos potencialmente tóxicos, diminuindo a vida útil do produto cárneo (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2009).

Tanto os óleos essenciais utilizados quanto o nitrito de sódio apresentam efeitos antioxidantes comprovados, podendo interferir com as reações de propagação; inibição dos sistemas enzimáticos envolvidos nas reações de iniciação; podem ainda atuar como captadores de radicais livres; na doação de hidrogênio; quelação de íons metálicos ou até mesmo atuarem como substrato de radicais, tais como superóxido ou hidroxí (VIUDA-MARTOS et al., 2010).

Dentre os tratamentos analisados, observa-se que os TRAT 3 e TRAT 1 (ambos elaborados a partir da mesma combinação de óleos essenciais) apresentaram os menores valores para o índice de TBARS, sendo o TRAT 3 (contendo a combinação dos óleos essenciais nanoemulsionados) o tratamento mais eficiente no combate a oxidação lipídica. O tratamento controle apresentou maior índice de TBARS, sendo o tratamento menos eficiente. Os resultados obtidos sugerem que a adição de óleos essenciais tanto na forma de nanoemulsões quanto na forma direta em mortadelas apresenta maior contribuição para diminuição da oxidação lipídica do que a adição de apenas nitrito de sódio. Também se observou uma diminuição no índice de TBARS com o período de estocagem das mortadelas.

A utilização de condimentos como agentes antioxidantes naturais tem se intensificado, uma vez que se observa demanda cada vez maior, por parte de consumidores, em consumir produtos cada vez mais naturais, sem adição de substâncias sintéticas, em substituição aos antioxidantes químicos normalmente utilizados.

Sharma et al. (2017) avaliaram os efeitos antimicrobianos e antioxidantes de 15 óleos essenciais sobre a qualidade de salsichas de frango por um período de 45 dias. Dos 15 óleos essenciais testados, 9 apresentaram atividade antimicrobiana significativa. O controle alcançou maior índice de TBARS, sendo o óleo essencial de cravo o que apresentou menor taxa de aumento de oxidação, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho.

Quanto a análise da cor objetiva, os valores médios (\pm desvio padrão) encontrados de luminosidade (L^*), índice de amarelo (b^*), índice de vermelho (a^*) e índice de saturação (C^*) para os tratamentos e tempos de estocagem estão descritos na Tabela 16.

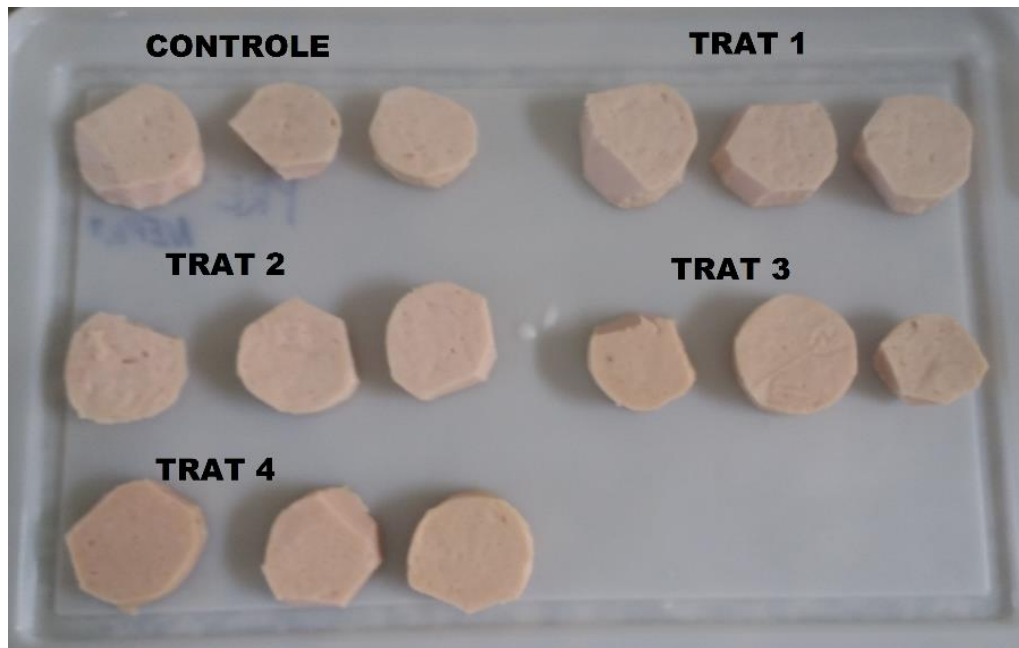
Tabela 16 - Valores médios (\pm desvio padrão) da luminosidade (L^*), índice de amarelo (b^*), índice de vermelho (a^*), índice de saturação (C^*) e ângulo de tonalidade (H^*) obtidos para os tratamentos e para os tempos de armazenamento das mortadelas a 4°C.

Tratamentos	Luminosidade (L^*)	Índice de amarelo (b^*)	Índice de vermelho (a^*)	Índice de saturação (C^*)	Ângulo de tonalidade (H^*)
CONTROLE	74,98 \pm 2,55	10,73 \pm 1,67	3,74 \pm 1,06	11,42 \pm 1,67	70,75 \pm 5,19
TRAT 1	73,35 \pm 3,44	10,33 \pm 2,40	3,90 \pm 1,05	11,08 \pm 2,45	69,02 \pm 4,46
TRAT 2	73,87 \pm 3,27	10,40 \pm 2,14	4,36 \pm 1,03	11,29 \pm 2,31	67,31 \pm 2,65
TRAT 3	72,44 \pm 1,45	13,15 \pm 2,07	4,79 \pm 1,17	14,02 \pm 2,23	70,07 \pm 3,35
TRAT 4	71,80 \pm 1,51	12,83 \pm 1,75	5,33 \pm 1,00	13,91 \pm 1,88	67,47 \pm 3,00
Tempo (dias)	Luminosidade (L^*)	Índice de amarelo (b^*)	Índice de vermelho (a^*)	Índice de saturação (C^*)	Ângulo de tonalidade (H^*)
1	72,65 \pm 2,85	10,82 \pm 3,37	3,43 \pm 0,85	11,37 \pm 3,44	71,85 \pm 2,87
21	73,69 \pm 3,45	11,91 \pm 1,38	4,71 \pm 1,08	12,84 \pm 1,50	68,48 \pm 2,02
30	73,53 \pm 2,52	11,74 \pm 1,57	5,13 \pm 0,81	12,82 \pm 1,68	66,44 \pm 2,55

Controle: sem adição de óleos essenciais; TRAT 1: 0,115% óleo de limão Taiti, 0,115% óleo de cardamomo, 0,0025% óleo de pimenta chinesa;; TRAT 2: 0,015% óleo de canela, 0,24% óleo de cardamomo, 0,015% óleo de pimenta chinesa; TRAT 3: nanoemulsão constituída por 0,0225% óleo de pimenta chinesa, 1,035% óleo de cardamomo, 1,035% óleo de limão Taiti; TRAT 4: nanoemulsão constituída por 1,8% óleo de cardamomo, 0,1125% óleo de pimenta chinesa, 0,1125% óleo de canela.

A luminosidade (L^*) é o parâmetro que caracteriza o grau de claridade da cor, podendo variar do preto ao branco, indo de 0 (escuro) a 100 (claro) (RAMOS; GOMIDE, 2007). Durante o armazenamento das mortadelas, foram encontrados valores médios muito próximos deste parâmetro para os tratamentos avaliados, indicando que todos os tratamentos influenciaram de maneira semelhante na luminosidade das mortadelas, que permaneceram com a mesma claridade durante todo o experimento (FIGURA 19). Dentre todos os tratamentos, o controle apresentou maior luminosidade e os tratamentos contendo as nanoemulsões de óleos essenciais as menores.

Figura 19 - Imagem das mortadelas elaboradas com os diferentes tratamentos após 1 dia de fabricação.



FONTE: Do autor (2017).

Resultados semelhantes foram encontrados por Dias (2011), onde não foi observada alterações significativas nos valores de luminosidade durante período de estocagem das mortadelas adicionadas de nitrito de sódio (75 ppm), nitrito de sódio (75 ppm) + 3,1% de óleo essencial de orégano; nitrito de sódio (75 ppm) + 2,5% de óleo essencial de orégano + 0,3% de óleo essencial de tomilho + 0,6% de óleo essencial de cravo.

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

Em produtos cárneos, as diferenças no parâmetro L^* têm sido associadas com diferenças no teor de água e seu movimento em direção a superfície; adição de aditivos; pH; quantidade intramuscular de gordura e capacidade de retenção de água (AMARAL et al., 2012).

O índice de amarelo (b^*) representa tonalidades que vão do azul (valores negativos) ao amarelo (valores positivos) no sólido de cor (RAMOS; GOMIDE, 2007). Dentre todos os tratamentos, os TRAT 3 e TRAT 4 apresentaram os maiores valores para esta coordenada, sugerindo que as mortadelas nestes tratamentos se apresentaram mais amarelas. O aumento neste parâmetro com o período de armazenamento indica uma perda na cor vermelha das mortadelas, sugerindo alterações físicas e microbiológicas no produto.

Martins (2016) encontrou valores semelhantes aos encontrados neste trabalho para o índice de amarelo (b^*) em seus tratamentos contendo diferentes óleos essenciais. O tratamento contendo 75 ppm de nitrito de sódio apresentou valor médio de b^* igual a 10,67; o tratamento contendo 75 ppm de nitrito de sódio + 0,082% de óleo essencial de orégano + 0,082% de óleo essencial de pimenta-chinesa + 0,027% de óleo essencial de noz moscada + 0,027% de óleo essencial de cravo-da-índia apresentou b^* igual a 10,8 e o tratamento contendo 75 ppm de nitrito de sódio + 0,054% de óleo essencial de manjeriço + 0,054% de óleo essencial de pimenta-preta + 0,054% de óleo essencial de limão + 0,110% de óleo essencial de tomilho apresentou b^* igual a 13,96.

Os valores de índice de amarelo (b^*) são influenciados, principalmente, pelas características dos alimentos. Porém, alterações no pH, oxidação, atividade de água, e tipo de óleo essencial utilizado também podem afetar esse parâmetro (COFRADES et al., 2004).

O índice de vermelho (a^*) é o parâmetro que representa a variação da intensidade da cor, variando do verde ao vermelho no sólido de cor. Valores positivos de a^* ou a^+ (de 0 a +50) representam a cor vermelha do produto. Já valores negativos de a^* ou a^- (de 0 a -50), representam a coloração verde (RAMOS; GOMIDE, 2007). O tratamento controle apresentou o menor valor para esta coordenada, seguido dos TRAT 1 e TRA2, sendo os TRAT 3 e TRA 4 os que apresentaram maiores valores.

Observou-se aumento no índice de vermelho (a^*) com o tempo de armazenamento (entre 1 e 21 dias). Segundo Ramos e Gomide (2007), a perda da cor curada (*fading*) resulta no aumento dos valores de a^* e/ou na redução dos valores de b^* , podendo ser acompanhada pela redução na razão a^*/b^* . O parâmetro mais sensível gerado pela análise instrumental da cor em produtos cárneos é o índice de vermelho (a^*) e, ao caracterizar a cor vermelha, avalia a estabilidade destes produtos (GARCÍA-ESTEBAN et al., 2003). Em carnes curadas, a formação da cor vermelha atrativa é favorecida em condições anaeróbicas (SAKATA, 2000).

O índice de saturação (C^*) permite determinar a intensidade da cor, sendo obtido em função de a^* e b^* . As cores que apresentam altos valores de índice de saturação são denominadas saturadas. Já as que apresentam baixos valores, são chamadas pálidas ou acinzentadas (ANDRADE et al., 2010; RAMOS; GOMIDE, 2007). Os tratamentos contendo os óleos essenciais nanoemulsionados apresentaram os maiores valores para este parâmetro. O TRAT 3 apresentou o maior valor de a^* e C^* , sugerindo que a mortadela deste tratamento apresentou coloração rósea mais intensa se comparada aos demais tratamentos.

Normalmente, o processo de descoloração das carnes e produtos cárneos é acompanhado por um aumento nos valores C^* com o passar do tempo, como observado no presente trabalho (ANDRADE et al., 2010).

O ângulo de tonalidade (H^*) é definido como a grandeza que caracteriza a qualidade da cor (vermelho, verde, amarelo e azul), permitindo sua diferenciação (RAMOS; GOMIDE, 2007). Foram observados valores muito próximos de H^* em relação aos tratamentos, sendo o controle o que apresentou maior valor médio, sugerindo maior tonalidade vermelha. Observou-se diminuição no valor de H^* com o tempo de estocagem das mortadelas, indicando que a tonalidade das mortadelas se tornou mais avermelhada com o tempo de armazenamento.

O cálculo da diferença global da cor (ΔE^*) é um dos métodos mais utilizados para se determinar as diferenças de cor de uma amostra. Ela foi utilizada para comparar a cor de todos os tratamentos em relação ao controle de cada tratamento e em relação aos tempos de armazenamento das mortadelas. O valor de ΔE^* médio (\pm desvio padrão) encontrado para os tempos 1, 21 e 30 dias foram, respectivamente, $2,41 \pm 1,61$; $4,76 \pm 2,74$ e $3,63 \pm 1,15$. Os valores médios de ΔE^* alcançados para cada tratamento estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17 - Diferença global da cor (ΔE^*) encontrada para os tratamentos em relação ao controle de cada tempo de armazenamento das mortadelas.

Tratamentos	Diferença global da cor (ΔE^*)
TRAT 1	$3,20 \pm 2,98$
TRAT 2	$2,54 \pm 1,76$
TRAT 3	$4,18 \pm 1,63$
TRAT 4	$4,48 \pm 1,71$

TRAT 1: 0,115% óleo de limão Taiti, 0,115% óleo de cardamomo, 0,0025% óleo de pimenta chinesa;; TRAT 2: 0,015% óleo de canela, 0,24% óleo de cardamomo, 0,015% óleo de pimenta chinesa; TRAT 3: nanoemulsão constituída por 0,0225% óleo de pimenta chinesa, 1,035% óleo de cardamomo, 1,035% óleo de limão Taiti; TRAT 4: nanoemulsão constituída por 1,8% óleo de cardamomo, 0,1125% óleo de pimenta chinesa, 0,1125% óleo de canela.

Valores encontrados para a diferença global da cor (ΔE^*) entre 0,5 e 1,5 são considerados muito baixos e o olho humano é incapaz de detectar essas diferenças. Porém, acima de 1,5, as diferenças já são detectáveis ao olho humano e acima de 5,00 são evidentemente perceptíveis (OBÓN et al., 2009). Todos os valores encontrados no presente trabalho para os tratamentos durante armazenamento encontram-se acima de 1,5, porém abaixo de 5,00, sugerindo que as diferenças são detectáveis ao olho humano, porém não são altamente perceptíveis. Os TRAT 3 e TRAT 4 apresentaram os maiores valores, indicando que estes tratamentos apresentaram maiores diferenças em relação ao controle se comparados com os demais tratamentos.

De forma geral, a adição dos óleos essenciais nas mortadelas não afetou a cor final do produto durante o tempo de armazenamento, como mostra a Figura 20.

Figura 20 - Mortadelas elaboradas com os cinco tratamentos durante período de armazenamento (1, 21 e 30 dias).



FONTE: Do autor (2017).

5. CONCLUSÕES

O óleo essencial de orégano apresentou CMB 0,05%; os óleos essenciais de canela e pimenta-chinesa apresentaram CMB 0,10% e os óleos essenciais de cardamomo e limão Taiti apresentaram CMB 1,00%.

As combinações dos óleos essenciais testadas tanto *in vitro* quanto no produto cárneo elaborado apresentaram efeitos antimicrobianos satisfatórios. Os tratamentos adicionados das combinações dos óleos essenciais foram mais eficientes na redução de células vegetativas de *Clostridium sporogenes* na mortadela do que o tratamento controle (com apenas 75 ppm de nitrito de sódio), sendo que os tratamentos compostos por nanoemulsões apresentaram as maiores atividades antimicrobianas. Nenhum dos tratamentos analisados apresentou efeitos antimicrobianos sobre endósporos de *Clostridium sporogenes*. Não foram observadas alterações nas características físico-químicas das mortadelas com os tratamentos analisados.

O tratamento 3 (75 ppm de nitrito + nanoemulsão constituída por 0,0225% óleo de pimenta-chinesa, 1,035% óleo de cardamomo e 1,035% óleo de limão Taiti) apresentou maior redução no crescimento microbiano, comprovando que a elaboração de nanoemulsões de óleos essenciais influencia na bioatividade destes, aumentando seus efeitos antimicrobiano.

Logo, a adição de óleos essenciais em mortadelas se mostrou altamente viável, uma vez que estes agentes antimicrobianos naturais podem substituir parcialmente o nitrito normalmente utilizado, apresentando elevada atividade antimicrobiana sem alterar as características físico-químicas do produto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH.; ASGHAR, A.; BUTT, M. S.; SHAHID, M.; HUANG, Q. Evaluating the antimicrobial potential of green cardamom essential oil focusing on quorum sensing inhibition of *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 8, p. 2306-2315, Jul. 2017.
- ALABURDA, J.; NISHIHARA, L. Presença de compostos de nitrogênio em águas de poços. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 2, p. 160-165, Abr. 1998.
- ALEIXO, G. C. **Efeito de óleos essenciais e compostos majoritários sobre endósporos de Clostridium botulinum inoculados em mortadela**. 2014. 58 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168–4170, Aug. 2001.
- ALLISON, C.; MACFARLANE, G. T. Regulation of protease production in *Clostridium sporogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 11, p. 3485-3490, Nov. 1990.
- AL-SHUIBI, A. M.; AL-ABDULLAH, B. M. Substitution of nitrite by sorbate and the effect on properties of mortadella. **Meat Science**, v. 62, n. 4, p. 473-478, Dec. 2002.
- AMARAL, M. T.; VIANA, C. E.; ARANHA, B. C.; EPPING, N. C.; PRESTES, O. D.; AUGUSTI, P. R. Sistema CIELAB para avaliação da cor de produtos cárneos. In: **Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 4, n.1, 2012. *Anais...* Rio Grande do Sul, 2012.
- AMINZARE, M.; HASHEMI, M.; AZAR, H. H.; HEJAZI, J. The use of herbal extracts and essential oils as a potential antimicrobial in meat and meat products: a review. **Journal of Human, Environment, and Health Promotion**, v. 1, n. 2, p. 63-74, Jan. 2016.
- ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: composition, antioxidant and antibacterial activities. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, Apr./Jun. 2012.
- ANDRADE, P. L.; BRESSAN, M. C.; GAMA, L. T.; GONÇALVES, T. M.; LADEIRA, M. M.; RAMOS, E. M. Qualidade da carne maturada de bovinos Red Norte e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 8, p. 1791-1800, Ago. 2010.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 5-16, Jul. 2001.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Phenolic compounds in foods – A brief review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ARENDRT, B.; SKIBSTED, L. H.; ANDERSEN, H. J. Antioxidative activity of nitrite in metmyoglobin induced lipid peroxidation. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A**, v. 204, n. 1, p. 7-12, Jan. 1997.

ARCE, A.; SOTO, A. Citrus essential oils: extraction and dewatering. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, v.2, n. 1, p. 1-9, Dec. 2008.

ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, Abr./Jun. 2012.

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

ÁVILA, A. R. A., MARQUES, S. C., PICCOLLI, R. H., SCHWAN, R. F. Sensitivity to organic acids in vitro and in situ of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from fresh pork sausages. **Journal of Food Quality**, v. 36, n. 3, 155-163, Apr. 2013.

BAJPAI, V. K.; BAE, K. H.; KANG, S. C. Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 722-734, Mar. 2012.

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

BALAGUER, M. P.; LOPEZ-CARBALLO, G.; CATALA, R.; GAVARA, R.; HERNANDEZ-MUNOZ, P. Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 166, n. 3, p. 369-377, Sept. 2013.

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

BAMPIDIS, V. A.; CHRISTODOULOU, V.; FLOROU-PANERI, P.; CHRISTAKI, E.; SPAIS, A. B.; CHATZOPOULOU, P. S. Effect of dietary dried oregano leaves supplementation on performance and carcass characteristics of growing lamb. **Animal Feed Science and Technology**, v. 121, n. 3-4, p. 285-295, Jun. 2005.

BAGAMBOULA, C. F.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 33-42, Feb. 2004.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Journal of Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, Apr. 2012.

BERKEL, B. M.; BOOGAARD, B. V.; HEIJNEN, C. Preservation of fish and meat. **Agromisa Foundation, Wageningen**, v. 8, p. 78-80, 2004.

BHARGAVA, K.; CONTI, D. S.; ROCHA, S. R. P.; ZHANG, Y. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. **Food Microbiology**, v. 47, p. 69-73, May. 2015.

BITTENCOURT, W. J. M. **Óleos essenciais de plantas condimentares com potencial anti-*Shigella flexneri* na conservação de carne moída**. 2014. 70 p. Dissertação (Mestrado em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, Abr. 2009.

BOLZAN, A. A.; LOPES, L. Q.; MARIN, L. S.; SANTOS, R. C. V.; RAFFIN, R.; FAGAN, S. B.; BULHÕES, L. O. S. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo de orégano livre e em nanoemulsões. **Disciplinarum Scientia**. Série: Naturais e Tecnológicas, Santa Maria, v. 16, n. 2, p. 325-332, Dez. 2015.

BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 103-120, Nov. 1996.

BOUDINE, L.; BOUCHRA, L.; NOUREDDINE, E.; NAJAT, C.; FOUZIA, C. Antifungal activity of oregano essential oil and thymol against some fungi isolated from corn grains. **Journal of Innovation and Applied Studies**, v. 17, n. 4, p. 1120-1124, Sept. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 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.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n° 4, 31 de março de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade de mortadela. Diário Oficial da União, Brasília, abril de 2000. Seção 1, p. 6.

BRAZ, V. B. **Produção e qualidade de frutos da limeira “Tahiti” irrigada com diferentes frequências e lâminas de água**. 2007. 111 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews if Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221-247, Jun. 2011.

BREWER, M. S.; ZHU, L. G.; BIDNER, B.; MEISINGER, D. J.; McKEITH, F. K. Measuring pork color: effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. **Meat Science**, v. 57, n. 2, p. 169-176, Feb. 2001.

BROMBERG, R. Aspectos relacionados ao uso da nanotecnologia na indústria de alimentos. **Tecno Carnes Expresso**, p. 72-76, 2010.

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

BRUNT, J.; CROSS, K. L.; PECK, M. W. Apertures in the *Clostridium sporogenes* spore coat and exosporium align to facilitate emergence of the vegetative cell. **Food Microbiology**, v. 51, p. 45-50, Oct. 2015.

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

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O' BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, Aug. 2015.

CAMMACK, R.; JOANNOU, C. L.; CUI, X. Y.; MARTINEZ, C. T.; MARAJ, S. R.; HUGHES, M. N. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 475-488, May. 1999.

CAPEK, I. Degradation of kinetically stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, n. 2-3, p. 125-155, Mar. 2004.

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W. M. C. Parâmetros de qualidade em carnes comercializadas no Distrito Federal no período de 1997-2001. **Higiene Alimentar**, v. 17, p. 12-19, 2003.

CARDOSO, T.; COSTA, M.; ALMEIDA, H. C.; GUIMARÃES, M. Botulismo alimentar: estudo retrospectivo de cinco casos. **ACTA Médica Portuguesa**, v. 17, p. 54-58, 2004.

CARLIN, F. Origin of bacterial spores contaminating foods. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 177-182, Apr. 2011.

CARPENTER, C. E.; REDDY, D. S. A.; CORNFORTH, D. P. Inactivation of Clostridial Ferredoxin and Pyruvate-Ferredoxin Oxidoreductase by sodium nitrite. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 549-552, Mar. 1987.

CASSENS, R. G. Composition and safety of cured meats in the USA. **Food Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 561-566, Aug. 1997.

CERESER, N. D.; COSTA, F. M. R.; JÚNIOR, O. D. R.; SILVA, D. A. R.; SPEROTTO, V. R. Botulismo de origem alimentar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 280-287, Jan./Fev. 2008.

CHANG, S. T.; CHEN, P. F.; CHANG, S. C. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 123-127, Sept. 2011.

CHANG, Y.; McLANDSBOROUGH, L.; McCLEMENTS, J. Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). **Food Chemistry**, v. 172, n. 1, p. 298-304, Apr. 2015.

CHAUDHRY, Q.; CASTLE, L. Food applications of nanotechnologies: an overview of opportunities and challenges for developing countries. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, n. 11, p. 595-603, Nov. 2011.

CHAVAN, P. S.; TUPE, S. G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeast. **Food Control**, v. 46, p. 115-120, Dec. 2014.

CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 643-651, Oct. 2010.

CHEONG, J. N.; TAN, C. P. Palm-based functional lipid nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 5, p. 557-564, May. 2010.

CHORIANOPOULOS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; ALIGIANNIS, N.; MITAKU, S.; JOHNNYCHAS, G. Essential oils of *Satureja*, *Origanum* and *Thymus* Species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8261-8267, Dec. 2004.

COELHO, Y. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P.; MAGALHÃES, A. F. J.; PASSOS, O. S.; NASCIMENTO, A. S.; SANTOS FILHO, H. P.; SOARES FILHO, W. S. A cultura do limão-Taiti. **Coleção plantar**, 2. ed. Brasília: rev. e aum., 1998.

COFRADES, S.; SERRANO, A.; AYO, J.; SOLAS, M. T.; CARBALLO, J.; COLMENERO, F. J. Restructured beef with different proportions of walnut as affected by meat particle size. **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 3, p. 230-236, Feb. 2004.

COLECIO-JUÁREZ, M. C.; RUBIO-NÚÑEZ, R. E.; BOTELLO-ÁLVAREZ, J. E.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, G. M.; NAVARRETE-BOLAÑOS, J. L.; JIMÉNEZ-ISLAS, H. Characterization of volatile compounds in the essential oil of sweet lime (*Citrus limetta* Risso). **Chilean Journal of Agriculture Research**, v. 72, n. 2, p. 275-280, Apr./Jun. 2012.

COUTINHO, H. D. M.; FREITAS, M. A.; GONDIM, C. N. F. L.; ALBUQUERQUE, R. S.; FERREIRA, J. V. A.; ANDRADE, J. C. In vitro antimicrobial activity of Geraniol and Cariophyllene against *Staphylococcus aureus*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 1, p. 98-105, 2015.

DAVE, D.; GHALY, A. E. Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review. **American Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 6, n. 4, p. 486-510, 2011.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicações na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 389-399, Abr. 2012.

DELGADO, B.; FERNÁNDEZ, P. S.; PALOP, A.; PERIAGO, P. M. Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions. **Food Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 327-334, Jun. 2004.

DEVI, K. P.; NISHA, A.; SAKTHIVEL, S.; PANDIAN, K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107-115, Jul. 2010.

DIAS, N. A. A. **Avaliações microbiológica e físico-química de mortadelas elaboradas com óleos essenciais e inoculadas com *Clostridium perfringens* tipo A**. 2011. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

DIAS, N. A. A. **Viabilidade de *Clostridium difficile* em mortadela adicionada de óleos essenciais e teor reduzido de nitrito de sódio**. 2015. 123 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

DIAS, N. A. A.; RODRIGUES, L. T. S.; PALHARES, P. C.; RAMOS, E. M.; PICCOLI, R. H. Antimicrobial activity of essential oils on *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella. **Journal of Food Safety**, v. 35, n. 4, p. 466-472, Nov. 2015.

DONSÍ, F.; ANNUNZIATA, M.; VINCENSI, M.; FERRARI, G. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 4, p. 342-350, Jun. 2012.

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

DUARTE, M. T. **Avaliação do teor de nitrito de sódio em linguças do tipo frescal e cozida comercializadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil**. 2010. 87 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, Abr./Jun. 2006.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D. Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 6, p. 1127-1134, Jun. 2013.

DUTRA, C. B.; RATH, S.; REYES, F. G. R. Nitrosaminas voláteis em alimentos. **Alimentos e Nutrição** – Araraquara, SP, v. 18, n. 1, p. 111-120, Jan./Mar. 2007.

DUTRA, M. P.; RAMOS, E. M.; RAMOS, A. L. S.; FONTES, P. R.; CARDOSO, G. P.; LEAL, A. S. Radiação gama e tempo de armazenamento sobre a oxidação lipídica, cor objetiva, pigmentos heme e nitrito residual de mortadelas elaboradas com diferentes níveis de nitrito. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 12, p. 2203-2209, 2011.

FARIA, J. A. F.; FELÍCIO, P. E.; NEVES, M. A.; ROMANO, M. A. Formação e estabilidade da cor de produtos cárneos curados. **Revista Tecnologia de Carnes** – Campinas, SP, v. 3, n. 2, p. 16-22, Mar. 2001.

FASSEAS, M. K.; MOUNTZOURIS, K. C.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M.; ZERVAS, G. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 1188-1194, Feb. 2007.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHNLE, A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, v. 1-3, p. 53-58, Dec. 2004.

FIGIEL, A.; SZUMNY, A.; GUTIÉRREZ-ORTÍZ, A.; CARBONNEL- BARRACHINA, A. A. Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 2, p. 240-247, May. 2010.

FIORDA, F. A.; SIQUEIRA, M. I. D. Avaliação do pH e atividade de água em produtos cárneos. **Estudos**, Goiânia, v. 36, n. 5-6, p. 817-826, Maio/Jun.. 2009.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, n. 3, p. 156-164, Mar. 2008.

FLEISHER, A.; SNEER, N. Oregano spices and *Origanum* chemotypes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 33, n. 5, p. 441-446, May. 1982.

FORSYTHE, F. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 423 p.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Bacterial 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**, v. 65, n. 10, p. 1545-1560, Oct. 2002.

GARCÍA-ESTEBAN, M.; ANSORENA, D.; GIMENO, O.; ASTIASARÁN, I. Optimization of instrumental colour analysis in dry-cured ham. **Meat Science**, v. 63, n. 3, p. 287-292, Mar. 2003.

GARCÍA-GARCÍA, R.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. M95-M100, Mar. 2011.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, May. 2008.

GELLI, D. S.; JAKABI, M.; SOUZA, A. Botulism: a laboratory investigation on biological and food samples from cases and outbreaks in Brazil (1982-2001). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 6, p. 321-324, Nov./Dez. 2002.

GILL, A. O.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R. A. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 83-92, Feb. 2002.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 2, p. 170-174, Sept. 2006.

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

GOCHEV, V.; GIROVA, T.; STOILOVA, I.; ATANASOVA, T.; NENOV, N.; STANCHEV, V.; SOYANOVA, A. Low temperature extraction of essential oil bearing plants by liquefied gases. 7. Seeds from cardamom (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton). **Journal of BioScience & Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 135-139, 2012.

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

GOULD, G.W. History of science—spores. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n. 3, p. 507–13, Sept. 2006.

GUERRA, F. Q. S.; MENDES, J. M.; OLIVEIRA, W. A.; RODRIGUES, A. S.; SANTOS, B. H. C.; LIMA, E. O. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre cepas de *Acinetobacter spp.* multidrogas-resistentes. **Revista de Biologia e Farmácia**, v.7, n. 1, p. 1-10, 2012.

GUERRA-ROSAS, M. I.; MORALES-CASTRO, J.; CUBERO-MÁRQUEZ, M. A.; SALVIA-TRUJILLO, L.; MARTÍN-BELLOSO, O. Antimicrobial activity of nanoemulsions containing essential oils and high methoxyl pectin during long-term storage. **Food Control**, v. 77, p. 131-138, Jul. 2017.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 91-97, May. 2008.

HAAGSMA, J. Pathogenic anaerobic bacteria and the environment. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 10, n. 3, p. 749-764, 1991.

HELANDER, I. M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Permeability barrier of the Gram-Negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2-3, p. 153-161, Sept. 2000.

HARRIS, R. Synergism in the essential oil. **International Journal in Aromatherapy**, v. 12, n. 4, p. 179-186, 2002.

HERNÁNDEZ-OCHOA, L.; AGUIRRE-PRIETO, Y. B.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G.V.; GUTIERREZ-MENDEZ, N.; SALAS-MUÑOZ, E. Use of essential oils and extracts from spices in meat production. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 5, p. 957-963, May. 2014.

HOLKEM, A. T.; CODEVILLA, C. F.; SILVA, C. B.; MENEZES, C. R. Técnicas de preparação de sistemas nanotecnológicos aplicados a alimentos. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 87-96, Dez. 2015.

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

HOSPITAL, X. F.; HIERRO, E.; STRINGER, S.; FERNÁNDEZ, M. A study on the toxigenesis by *Clostridium botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 218, p. 66-70, Feb. 2016.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-24, Jan. 2012.

HUI, Y. H.; NIP, W. K.; ROGERS, R. Meat Curing Technology. **Meat Science and Applications**. New York: Marcel Dekker, 2001. 704 p.

HUSAIN, S. S.; ALI, M. Analysis of volatile oil of the fruits of *Elletaria cardamomum* (L.) Maton and its antimicrobial activity. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, n. 2, p. 1798-1808, Jan. 2014.

HUSTAD, G. O.; CERVENY, J. G.; TRENK, H.; DEIBEL, R. H.; KAUTTER, D. A.; FAZIO, T.; JOHNSTON, R. W.; KOLARI, O. E. Effect of sodium nitrite and sodium nitrate on botulinum toxin production and nitrosamine formation in wieners. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 22-26, Jul. 1973.

IAMARINO, L. Z.; OLIVEIRA, M. C.; ANTUNES, M. M.; OLIVEIRA, M.; RODRIGUES, R. O.; ZANIN, C. I. C.; SCHIMILE, M.; LIMA, A. A. Nitritos e nitratos em produtos cárneos enlatados e/ou embutidos. **Gestão em Foco**, v.7, p. 246-251, 2015.

JANGANAN, T. K.; MULLIN, N.; TZOKOV, S. B.; STRINGER, S.; FAGAN, R. P.; HOBBS, J. K.; MOIR, A.; BULLOUGH, P. A. Characterization of the spore surface and exosporium proteins of *Clostridium sporogenes*: implications for *Clostridium botulinum* group I strains. **Food Microbiology**, v. 59, p. 205-212, Oct. 2016.

JAYASENA, D. D.; JO, C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 34, n. 2, p. 96-108, Dec. 2013.

JING, L.; LEI, Z.; LI, L.; XIE, R.; XI, W.; GUAN, Y.; SUMNER, L. W.; ZHOU, Z. Antifungal activity of citrus essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 14, p. 3011-3033, Mar. 2014.

JOE, M. M.; CHAUHAN, P. S.; BRADEEBA, K.; SHAGOL, C.; SIVAKUMAAR, P. K.; SA, T. 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**, v. 23, n. 2, p. 564-570, Feb. 2012.

JUVEN, B. J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, n. 6, p. 626-631, Jun. 1994.

KEETON, J. T.; OSBBURN, W. N.; HARDIN, M. D.; BRYAN, N. S. A national survey of the nitrite/nitrate concentrations in cured meat products and non-meat foods available at retail. **Des Moines: American Meat Institute Foundations**, p. 1-74, 2009.

KIRSCHNIK, P. G.; TRINDADE, M. A.; GOMIDE, C. A.; MORO, M. E. G.; VIEGAS, E. M. M. Estabilidade em armazenamento da carne de tilápia-do-nilo mecanicamente separada, lavada, adicionada de conservantes e congelada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 8, p. 935-942, Ago. 2013.

KLANG, V.; MATSKO, N. B.; VALENTA, C.; HOFER, F. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterization and stability assessment. **Micron**, v. 43, n. 2-3, p. 85-103, Feb. 2012.

KOURNIATIS, L. R.; SPINELLI, L. S.; MANSUR, C. R. E. Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 295-300, Jan. 2010.

KUMMER, R.; FACHINI-QUEIROZ, F. C.; ESTEVÃO-SILVA, C. F.; GRESPAN, R.; SILVA, E. L.; BERSANI-AMADO, C. A. CUMAN, R. K. N. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Citrus latifolia* Tanaka essential oil and limonene in experimental mouse models. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sept. 2001.

LEGGETT, M. J.; McDONNELL, G.; DENYER, S. P.; SETLOW, P.; MAILLARD, J. Y. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 485-498, Sept. 2012.

LI, Y.; KONG, W.; LI, M.; LIUB, H.; ZHAOA, X.; YANGA, S.; YANG, M. *Litsea cubeba* essential oil as the potential natural fumigant: Inhibition of *Aspergillus flavus* and AFB1 production in licorice. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 186-193, Feb. 2016.

LIMA, D. S.; LIMA, J. C.; RAQUELINE MAIARA COSTA BEZERRA CALVACANTI, R. M. C. B.; BERNADETE HELENA CAVALCANTI DOS SANTOS, B. H. C. S.; LIMA, I. O. Study of the antibacterial activity of thymol and carvacrol monoterpenes against strains of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 1, p. 17-21, Jan./Mar. 2017.

LIMA, M. P.; ZOGHBI, M G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, T. M. D.; FERNANDES, C. S. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). **Acta Amazônica**, v. 35, n. 3, p. 363-366, 2005.

LIU, T. T.; YANG, T. S. 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**, v. 156, n. 1, p. 68-75, May. 2012.

LIU, C.H.; WU, C.T. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 353, n. 2-3, p. 149-156, Jan. 2010.

LOVISON, M. M. **Óleo essencial de orégano nanoemulsionado: produção, caracterização físico-química, atividade antimicrobiana e antioxidante in vitro e aplicação em patê de frango**. 2017. 152 p. Tese (Doutorado em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Pirassununga.

LOVISON, M. M.; MAROSTEGAN, L. F. P.; PERES, M. S.; MENEZES, I. F.; GHIRALDI, M.; RODRIGUES, R. A. F.; FERNANDES, A. M.; PINHO, S. C. Nanoemulsions encapsulating oregano essential oils: Production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken pâté. **LWT – Food Science and Technology**, v. 77, 233-240, Apr. 2017.

MAGWA, M. L.; GUNDIDZA, M.; GWERU, N.; HUMPHREY, G. Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 85-89, Jan. 2006.

MAH, J. H.; KANG, D. H.; TANG, J. Comparison of viability and heat resistance of *Clostridium sporogenes* stored at different temperature. **Food Science**, v.74, n. 1, p. 23-27, Jan./Feb. 2009.

MAÍRA, M. M. O. **Óleos essenciais no controle de biofilmes bacterianos: *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* enteropatogênica**. 2011. 138 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

MALTI, J. E.; MOUNTASSIF, D.; AMAROUCHE, H. Antimicrobial activity of *Elettaria cardamomum*: Toxicity, biochemical and histological studies. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1560-1568, 2007.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Lipid oxidation of chicken meat and the impact of the addition of sage (*Salvia officinalis*, L.) and garlic (*Allium sativum*, L.) as natural antioxidants. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 1-11, Abr. 2009.

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

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

MATÉ, J.; PERIAGO, P. M.; PALOP, A. Combined effect of a nanoemulsion of D-limonene and nisin on *Listeria monocytogenes* growth and viability in culture media and foods. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 2, p. 146-152, Mar. 2015.

McCLEMENTS; JULIAN, D. **Food emulsions: principles, practices, and techniques**. 3 ed. In: CRC Press. Taylor & Francis, Londres, 2015. 672 p.

MEHYAR, G. F.; AL-ISAMIL, K. M.; AL-GHIZZAWI, H. M.; HOLLEY, R. A. Stability of Cardamom (*Elletaria cardamomum*) essential oil in microcapsules made of whey protein isolate, guar gum, and carrageenan. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 10, p. C1939-C1949, Oct. 2014.

MENDOZA-YEPES, M. J.; SANCHEZ-HIDALGO, L. E.; MAERTENS, G.; MARIN-INIESTA, F. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. **Journal of Food Safety**, v. 17, n. 1, p. 47-55, Jun. 1997.

MERINO, L. Development and validation of a method for determination of residual nitrite/nitrate in foodstuff and water after zine reduction. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 3, p. 212-220, Sept. 2009.

MIRVISH, S. S. Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and *vivo* occurrence. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 31, n. 3, p. 325-351, Mar. 1975.

MITCHELL, W. J. General biology and physiology. In: BAHL, H.; DÜRRE, P. **Clostridia: biotechnology and medical applications**. New York, J. Willey, p.287, 2011.

MOAREFIAN, M.; BARZEGAR, M.; SATTARI, M. *Cinnamomum zeylanicum* essential oil as a natural antioxidant and antibacterial in cooked sausage. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 62-69, Feb. 2013.

MOON, S. E.; KIM, H. Y.; CHA, J. D. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 9, p. 907-916, Sept. 2011.

MORAES-LOVISON, M.; MAROSTEGAN, L. F.; PERES, M. S.; MENEZES, I. F.; GHIRALDI, M.; RODRIGUES, R. A.; FERNANDES, A .M; PINHO, S. C. Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken pâté. **LWT-Food Science and Technology**, v. 77, p. 233-240, Apr. 2017.

MOREIRA, G. M. S. G.; CUNHA, C. E. P.; SALVARANI, F. M.; GONÇALVES, L. A.; PIRES, P. S.; CONCEIÇÃO, F. R.; LOBATO, F. C. F. Production of recombinant botulism antigens: a review of expression systems. **Anaerobe**, v. 28, p.130-136, Aug. 2014.

MOREIRA, R. T.; LEMOS, A. L. S. C.; MENDES, E. S.; HONÓRIO, Y. F.; GUIMARÃES, J. L.; CRISTIANINI, M. Caracterização microestrutural de embutido emulsionado de tilápia (*Oreochromis niloticus* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 3, p. 217-221, Jul./Set. 2006.

MORSY, N. F. S. A short extraction time of high quality hydrodistilled cardamom (*Elettaria cardamomum* L. Maton) essential oil using ultrasound as a pretreatment. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 287-292, Mar. 2015.

MPOUNTOUKAS, P.; VANTARAKIS, A.; SIVRIDIS, E.; LIALIARIS, T. Cytogenic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2390-2393, Jul. 2008.

NAVEED, R.; HUSSAIN, I.; TAWAB, A.; TARIQ, M.; RAHMAN, M.; HAMEED, S.; MAHMOOD, M. S.; SIDDIQUE, A. B.; IQBA, M. Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 2-10, Oct. 2013.

NAZER, A. I.; KOBILINSKY, A.; THOLOZAN, J. L.; DUBOIS-BRISSENET, F. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. *Typhimurium*: a synergistic effect? **Food Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 391-198, Oct. 2005.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; MARTINO, L.; COPPOLA, R.; FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, Nov. 2013.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 2006.

NEDOROSTOVA, L.; KLOUCEK, P.; KOKOSKA, L.; STOLCOVA, M.; PULKRABEK, J. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. **Food Control**, v. 20, n. 2, p. 157-160, Feb. 2009.

NEVAS, M.; KORHONEN, A. R.; LINDSTRÖM, M.; TURKKI, P.; KORKEALA, H. Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 1, p. 199-202, Jan. 2004.

NGUEFACK, J.; TAMGUE, O.; DONGMO, J. B. L.; DAKOLE, C. D.; LETH, V.; VISMER, H. F.; ZOLLO, P. H. A.; NKENGFACK, A. E. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 377-383, Feb. 2012.

NGUYEN, H. V.; MEILE, J. C.; LEBRUN, M.; CARUSO, D.; CHU-KY, S.; SARTER, S. *Litsea cubeba* leaf essential oil from Vietnam: chemical diversity and its impacts on antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 207-214, Mar. 2018.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A. S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol, and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191-195, Jan. 2004.

NOVAK, J.; BITSCH, C.; LANGBEHN, J.; PANK, F.; SKOULA, M.; GOTSIOU, Y.; FRANZ, C. M. Ratios of *cis*- and *trans*-Sabinene Hydrate in *Origanum majorana* L. and *Origanum microphyllum* (Benth) Vogel. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, n. 7, p. 697-704, Aug. 2000.

OBÓN, J. M.; Castellar, M. R.; Alacid, M.; Fernández-López, J. A. 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**, v. 90, n. 4, p. 471-479, Feb. 2009.

OLIVEIRA, E. M. D. **Nitrato, nitrito e sorbato em produtos cárneos consumidos no Brasil.** 2014. 41 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2014.

OLIVEIRA, F. I. R. ***Clostridium estertheticum* em leite cru e em queijos parmesão e provolone.** 2007. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

OLIVEIRA, J. J.; REZENDE, C. S. M.; OLIVEIRA, A. P.; MOREIRA, N. M.; FREITAS, F. A. Surtos alimentares de origem bacteriana. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 9, n.17, p. 2416-2433, Dez. 2013.

OLIVEIRA, M. M. M. **Óleos essenciais no controle de biofilmes bacterianos: *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* enteropatogênica.** 2011. 138 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

OLIVEIRA, T. L. C. **Atividade do óleo essencial de segurelha (*Satureja montana* L.) sobre *Clostridium perfringens* em sistemas de emulsão cárneas elaborados com diferentes níveis de nitrito.** 2010.152 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

OLIVEIRA, T. L. C.; CARDOSO, M. G.; SOARES, R. A.; RAMOS, E. M.; PICCOLI, R. H.; TEBALDI, V. M. R. Inhibitory activity of *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Essential oils against *Listeria monocytogenes* inoculated in bovine ground meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 357-365, Aug. 2013.

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

OLIVEIRA, T. L. C.; SOARES, R. A.; PICCOLI, R. H. A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella Enteritidis* in ground beef during refrigerated storage. **Meat science**, v. 93, n. 3, p. 645-651, Mar. 2013.

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

OLIVEIRA, T. L. C.; LEITE JR., B. R. C.; RAMOS, A. L. S.; RAMOS, E. M.; PICCOLI, R. H.; CRISTIANINI, M. Phenolic carvacrol as a natural additive to improve the preservative effects of high pressure processing of low-sodium sliced vacuum-packed turkey breast ham. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1297-1308, Dec. 2015.

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos.** Porto Alegre: Artmed; 2005.

OUATTARA, B.; SIMARD, R. E.; HOLLEY, R. A.; PIETTE, G. J. P.; BÉGIN, A. Antibacterial activity of select fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, n. 2-3, p. 155-162, Jul. 1997.

PANESSA-WARREN, B. J.; TORTORA, G. T.; WARREN, J. B. Exosporial membrane plasticity of *Clostridium sporogenes* and *Clostridium difficile*. **Tissue & Cell**, v. 29, n. 4, p. 449-461, Aug. 1997.

PARTHASARATHY, D. K.; BRYAN, N. S. Sodium nitrite: the “cure” for nitric oxide insufficiency. **Meat Science**, v. 92, n. 3, p. 274-279, Nov. 2012.

PECK, M. W.; STRINGER, S. C.; CARTER, A. T. *Clostridium botulinum* in the post-genomic era. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 183-191, Apr. 2011.

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

PERRICONE, M.; ARACE, E.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M.; BEVILACQUA, A. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. **Frontiers in Microbiology**, v.6, n. 76, p. 1-7, Feb. 2015.

PESAVENTO, G.; CALONICO, C. BILIA, A. R.; BARNABEI, M.; CALESINI, F.; ADDONA, R.; MENCARELLI, L.; CARMAGNINI, L.; DI MARTINO, M. C.; NOSTRO, A. L. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, v. 54, p. 188-199, Aug. 2015.

PRAKASH, B.; KUJUR, A.; YADAV, A.; KUMAR, A.; SINGH, P. P.; DUBEY, N. K. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, v. 89, n.1, p. 1-11, July. 2018.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **Ciência de la carne y de los productos cárnicos**. Zaragoza: Acribia, 1994. 581p.

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

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

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Viçosa, MG: Editora UFV. 2007, 599p.

RAMOS, E. M.; RAMOS, A. L. S.; SCARPA, A. B. O.; CHINAIT, T. M. N.; GOMIDE, L. A. M.; FONTES, P. R. **Otimização da avaliação objetiva da cor de presuntos e apresuntados**. In: V CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 2009, São

Paulo. V CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES. Campinas: ITAL/CTC, 2009. v. CD-ROM.

RAMOS, M.; JIMÉNEZ, A.; PELTZER, M.; GARRIGÓS, M. C. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 3, p. 513-519, Apr. 2012.

RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 208-211, Sept. 2002.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, Dec. 2014.

RÖDEL, W.; SCHEUER, R.; WAGNER, H. Nuevo metodo para la determinacion de la actividad agua en produtos cárnicos. **Fleischwirtschaft**, v. 2, p.36-41, 1990.

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

RODRÍGUEZ, J.; MARTÍN, M. J.; RUIZ, M. A.; CLARES, B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v. 83, p. 41-59, May. 2016.

ROÇA, R. O. **Cura de carnes**. Laboratório de tecnologia dos produtos de origem animal, Botucatu: UNESP, 2000, p. 17.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T.; DEANS, S. G.; DORMAN, H. J. D. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. **Planta Medica**, v. 66, n. 8, p. 687-693, Dec. 2000.

RYWOTYCKI, R. The effect of selected functional additives and heat treatment on nitrosamine content in pasteurized pork ham. **Meat Science**, v. 60, n. 4, p. 335-339, Apr. 2002.

SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; DAFERERA, D.; SÖKMEN, A.; SÖKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; ÖZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 7, p. 549-557, Oct. 2004.

SAKATA, R. Studies on physicochemical characteristics of red pigments in meat products. **Animal Science Journal**, v. 71, n. 1, p. 1-16, 2000.

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

SANTIAGO, L. G.; CASTRO, G. R. Novel Technologies for the encapsulation of bioactive food compounds. **Current Opinion in Food Science**, v.7, p. 78-85, 2016.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 803-808, Maio/Jun. 2007.

SEBRANEK, J. G.; BACUS, J. N. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? **Meat Science**, v. 77, n. 1, p. 136-147, Sept. 2007.

SEN, N. P.; BADDOD, P. A. Trends in the levels of residual nitrite in Canadian cured meat products over the past 25 years. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 4714-4718, Dec. 1997.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: a pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v.1, n. 1, p. 24-32, Jan. 2010.

SHARMA, H.; MENDIRATTA, S. K.; AGRAWAL, R. K.; GURUNATHAN, K.; KUMAR, S.; SINGH, T. P. Use of various essential oils as bio preservatives and their effect on the quality of vacuum packaged fresh chicken sausages under frozen conditions. **LWT – Food Science and Technology**, v. 81, p. 118-127, Aug. 2017.

SHREAZ, S.; BHATIA, R.; HAN, N.; MAURYA, I. K.; AHMAD, S. I.; MURALIDHAR, S.; MANZOOR, N.; KHAN, L. A. Cinnamic aldehydes affect hydrolytic enzyme secretion and morphogenesis in oral *Candida* isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 52, n. 5, p. 251-258, May. 2012.

SILVA, B. F. T. C.; PESSOA, N. O. Botulismo por *Clostridium botulinum* na intoxicação alimentar animal e humana. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, n. 4, p. 733-747, Dez. 2015.

SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. Â.; VICENTE, A. A. Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 854–867, Apr. 2012.

SILVA, F. V. M.; GIBBS, P. A. *Clostridium botulinum* spores in low-acid cold-distributed foods and design of pasteurization processes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 2, p. 95-105, Feb. 2010.

SILVA, J. P. L.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PEREZ, D. V.; FRANCO, B. D. G. M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, s. 1, p. 136-141, maio. 2010.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Nutritional aspects of phytates and tannins. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 1, p. 5-19, Jan./Apr. 1999.

SILVA, M. T. N.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; CUNHA, M. L. R. S.; FERNANDES JUNIOR, A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de

Staphylococcus aureus e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n. 3, p.257-262, Maio. 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Porto Alegre: Ed. UFSC, p 1102, 2007.

SIMÕES, L. A. **Misturas de óleos essenciais e seus compostos majoritários na conservação de apresentados inoculados com *Clostridium sporogenes***. 2016. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

SMITH, L. A. Botulism and vaccines for its prevention. **Vaccine**, v. 27, s. 4, p. D33-D39, Nov. 2009.

SINDELAR, J. J.; MILKOWSKI, A. L. Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curing and examining the risk/benefit of its use. **American Meat Science Association White Paper Series**, n.3, p. 1-14, Nov. 2011.

SINDELAR, J. J.; MILKOWSKI, A. L. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. **Nitric Oxide**, v. 26, n. 4, p. 259-266, May. 2012.

SOARES, R. A. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente à *Salmonella enterica* Enteritidis inoculada em carne moída bovina**. 2010. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SOBEL, J. Botulism. **Food Safety**, v. 41, n. 8, p. 1167-1173, Oct. 2005.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, n. 3-4, p. 102-110, Oct. 2005.

SOMOLINOS, M.; GARCÍA, D.; CONDÓN, S.; MACKEY, B.; PAGÁN, R. Inactivation of *Escherichia coli* by citral. **Journal of Applied microbiology**, v.108, n. 6, p.1928-1939, Jun. 2010.

SOUZA, A. A. **Análise química e potencial antimicrobiano de óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica na conservação de carne moída**. 2015. 95 p. Dissertação (Mestrado em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, May. 2007.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N.; BARBOSA FILHO, J. M. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservations systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 4, p. 549-558, Jul. 2005.

SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of foodgrade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 547-556, Jan. 2015.

SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 82-89, Feb. 2009.

STATISTICA, 2008. **Data Analysis Software System**. Disponível em: www.stasoft.com.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, May. 2004.

TERRA, N. N.; FREITAS, R. J. S.; CICHOSKY, A. J. Atividade de água, pH, umidade, e desenvolvimento de *Staphylococcus xylosus* durante o processamento e armazenamento da paleta suína curada, maturada e fermentada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 756-760, Out./Dez. 2007.

TOMAINO, A.; CIMINO, F.; ZIMBALATTI, V.; VENUTI, V.; SULFARO, V.; DE PASQUALE, A.; SAIJA, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 549-554, Mar. 2005.

TRANCHIDA, P. Q.; BONACCORSI, I.; DUGO, P.; MONDELLO, L.; DUGO, G. Analysis of *Citrus* essential oils: state of the art and future perspectives. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, n. 2, p. 98-123, Mar. 2012.

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

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Food status list. Silver Spring: FDA, 2006.
VALERIANO, C.; PICCOLI, R. H.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.

VIANA, D. S. **Lima ácida (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. Tahiti, de cultivos convencional e orgânico biodinâmico: avaliação da capacidade antioxidante dos sucos in natura e clarificados por membranas de microfiltração**. 2010. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

VIDAL, V. A. S. **Efeito da redução de cloreto de sódio e fosfato sobre as propriedades funcionais de emulsões cárneas adicionadas de sais substitutos**. 2015. 128 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

VIUDA-MARTOS, M.; NAVAJAS, Y. R.; ZAPATA, E. S.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 1, p. 13-19, Jan./Feb. 2010.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of mortadella. **Meat Science**, v.85, n.3, p. 568-576, Jul. 2010.

WANG, H.; LIU, Y. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from different parts of *Litsea cubeba*. **Chemistry and Biodiversity**, v.7, p. 229-235, 2010.

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

YANG, W.W.; PONCE, A. Rapid endospore viability assay of *Clostridium sporogenes* spores. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 3, p. 213-216, Aug. 2009.

YETIM, H.; KAYACIER, A.; KESMEN, Z.; SAGDIC, O. The effects of nitrite on the survival of *Clostridium sporogenes* and the autoxidation properties of the Kavurma. **Meat Science**, v. 72, n. 2, p. 206-210, Feb. 2006.

ZANARDO, V. P. S.; RAMBO, D. F.; SCHWANKE, C. H. A. Cinnamon (*Cinnamomum sp*) and its effect on the components of metabolic syndrome. **Perspectiva, Erechim**. v. 38, Edição Especial, p. 39-48, Mar. 2014.

7. APÊNDICES

APÊNDICE A - Análise de Variância (ANOVA) para a contagem de células vegetativas de *Clostridium sporogenes* durante o experimento.

	SQ	GL	QM	Fc	P
INTERCEPTO	1054,415	1	1054,415	7457,072	0,000000
TRATAMENTO	5,422	4	1,356	9,586	0,000077
TEMPO	25,492	4	6,372	45,072	0,000000
TRAT*TEMPO	2,412	16	0,151	1,066	0,431244
ERRO	3,535	25	0,141		

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; QM: quadrados médios; Fc: valor da estatística F; P: p-valor

APÊNDICE B – Análise de Variância (ANOVA) para a contagem de endósporos de *Clostridium sporogenes* durante o tempo de armazenamento das mortadelas.

	SQ	GL	QM	Fc	P
INTERCEPTO	318,0396	1	318,0396	4612,445	0,000000
TRATAMENTO	0,2247	4	0,0562	0,815	0,530723
TEMPO	16,3338	3	35,4446	514,044	0,000000
TRAT*TEMPO	0,6093	12	0,0508	0,736	0,702432
ERRO	1,3791	20	0,0690		

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; QM: quadrados médios; Fc: valor da estatística F; P: p-valor.

