



HELOÍSA HELENA DE ABREU MARTINS

**SINERGISMO ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS
ESSENCIAIS E NITRITO SOBRE *Clostridium
sporogenes* INOCULADO EM FIAMBRE DE
PEITO DE FRANGO**

LAVRAS – MG

2016

HELOÍSA HELENA DE ABREU MARTINS

**SINERGISMO ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
NITRITO SOBRE *Clostridium sporogenes* INOCULADO EM FIAMBRE
DE PEITO DE FRANGO**

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

Orientadora

Profa. Roberta Hilsdorf Piccoli

Coorientador

Prof. Eduardo Mendes Ramos

LAVRAS – MG

2016

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

Martins, Heloísa Helena de Abreu.

Sinergismo antimicrobiano de óleos essenciais e nitrito sobre
Clostridium sporogenes inoculado em fiambre de peito de frango /
Heloísa Helena de Abreu Martins. – Lavras: UFLA, 2016.

96 p.

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

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Anaeróbios. 2. Conservante natural. 3. Produto cárneo. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

HELOÍSA HELENA DE ABREU MARTINS

**SINERGISMO ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
NITRITO SOBRE *Clostridium sporogenes* INOCULADO EM FIAMBRE
DE PEITO DE FRANGO**

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

APROVADA em 23 de fevereiro de 2016.

Prof. Eduardo Mendes Ramos UFLA

Prof. João de Deus Souza Carneiro UFLA

Profa. Sandra Maria O. Morais Veiga UNIFAL

Profa. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

Prof. Eduardo Mendes Ramos
Coorientador

LAVRAS – MG

2016

Dedico este trabalho aos meus pais João Martins Neto e Magali de Abreu
Martins, pelo amor incondicional e dedicação com a qual me criaram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar meus passos e me dar forças para seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis. Agradeço por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho.

À minha família, pelo apoio e incentivo. Por estar sempre ao meu lado.

À minha orientadora Roberta, a qual sou eternamente grata pelos conhecimentos transmitidos com tanto carinho e paciência. Agradeço a amizade!

Às minhas queridas amigas Jéssica, Beth, Frô, e Cris, pela compreensão, amizade e convivência diária. Por serem minha segunda família e fazerem dos meus dias mais alegres.

À Janaína e João Paulo, por me ajudarem durante as análises microbiológicas e físico-químicas do experimento.

Ao Professor Eduardo Mendes e João de Deus, pela disponibilidade em ajudar para o engrandecimento do trabalho.

Ao Guilherme Manfredine e à Marília, por ajudarem com a estatística do trabalho.

A todos meus colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCA, pelos conhecimentos compartilhados e pela convivência. Aline, Tenille, Letícia, Rodrigo, Jorge, Rafael, Silas, Bruna, Janaína, João Paulo, Luara, Willian, Nayane e Eliane.

Ao Sérgio e ao Ronaldo, colegas de mestrado que se tornaram muito importantes nessa caminhada. E que tenho enorme consideração e amizade.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e 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 CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro na realização do experimento.

A todos que contribuíram para que este trabalho fosse realizado, muito obrigada.

RESUMO GERAL

Clostridium sporogenes são bacilos Gram-positivos, anaeróbios, esporulados, comumente relacionados com a deterioração dos alimentos. Devido à sua semelhança genética e fisiológica com as espécies de *Clostridium botulinum* Grupo I (proteolítico), *C. sporogenes* é frequentemente utilizado, como um substituto para este microrganismo em laboratório. A atual demanda dos consumidores por produtos naturais tem levado a investigação sobre novos agentes antimicrobianos a partir de plantas, para melhorar a segurança de produtos alimentícios, assim, os óleos essenciais de condimentos se destacam, pois possuem atividade antimicrobiana e a maioria é reconhecida como seguros à saúde (GRAS). Objetivou-se neste estudo determinar a concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Litsea cubeba*, *Myristica fragrans*, *Ocimum basilicum*, *Syzygium aromaticum*, *Piper nigrum* e *Citrus aurantifolia* bem como suas combinações e elaborar um produto cárneo, com redução de nitrito de sódio e adição de óleos essenciais, analisando o crescimento e esporulação de *C. sporogenes*, assim como o efeito sobre a cor, pH, Aw, oxidação lipídica e nitrito residual durante o tempo de armazenamento do produto, sob temperaturas de 7° e 14°C. Foram produzidos quatro tratamentos, sendo Tratamento1: 150 ppm de nitrito; Tratamento2: 75 ppm de nitrito; Tratamento3: 75 ppm + óleos essenciais de orégano (0,082%), Litsea (0,082%), noz moscada (0,027%) e cravo da Índia (0,027%); Tratamento4: 75 ppm de nitrito + óleos essenciais de manjeriço (0,054%), pimenta preta (0,054%), limão (0,054%), e tomilho (0,110%). Os óleos essenciais que apresentaram as menores CMB, 0,2%, foram os de orégano, manjeriço e pimenta preta, enquanto que para os óleos de pimenta chinesa, cravo da Índia e tomilho a CMB foi de 0,5%. Os óleos essenciais de noz moscada e limão apresentaram as maiores CMB, sendo esta de 1%. O Tratamento 4, aplicado ao fiambre, contendo 75 ppm de nitrito + óleos essenciais de manjeriço (0,054%), pimenta preta (0,054%), limão (0,054%), e tomilho (0,110%) foi o mais eficiente, apresentando redução de células vegetativas com o tempo de armazenamento, para as duas temperaturas analisadas. As combinações de óleos utilizadas impediram a esporulação. A utilização de óleos essenciais não promoveu alterações representativas na cor objetiva do fiambre de peito de frango. Houve redução do pH e aumento da atividade de água e da oxidação lipídica durante o armazenamento, além de redução significativa na quantidade de nitrito residual durante o tempo de armazenamento. A utilização de óleos essenciais como conservantes naturais em embutidos cárneos cozidos pode ser considerada uma alternativa promissora para a indústria de alimentos, já que os tratamentos com óleos essenciais não se diferenciaram dos tratamentos contendo apenas nitrito, na maioria das análises físicas – químicas realizadas.

Palavras-chave: Anaeróbios. Conservante natural. Produto cárneo.

GENERAL ABSTRACT

Clostridium sporogenes are Gram-positive, anaerobic, sporulating, commonly related to food spoilage. Due to their genetic and physiological similarity to the species of *Clostridium botulinum* Group I (proteolitical), *C. sporogenes* is widely used as a substitute for this microorganism in the laboratory. The current consumer demand for natural products has led to research on new antimicrobial agents from plants to improve the safety of food products, so the essential oils of spice stand out because they have antimicrobial activity and most are recognized as safe to health (GRAS). The aim of this study was to determine the minimum bactericidal concentration (CMB) of essential oils of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, cubeba *Litsea*, *Myristica fragrans*, *Ocimum basilicum*, aromaticum *Syzygium*, *Piper nigrum* and *Citrus aurantifolia* and combinations thereof and prepare a meat product with reduction of sodium nitrite and adding essential oils, analyzing the growth and sporulation of *C. sporogenes*, as well as the effect on color, pH, A_w , lipid oxidation and residual nitrite during the product storage time, the temperature under 7 ° and 14 ° C. Four treatments were produced, and treatment 1: 150 ppm nitrite; Tratamento2: 75 ppm nitrite; Treatment3: 75 ppm + essential oils of oregano (0.082%), *Litsea* (0.082%), nutmeg (0.027%) and clove (0.027%); Treatment4: 75 ppm nitrite + essential oils of basil (0.054%), black pepper (0.054 %%), lemon (0.054%) and thyme (0.110%). The essential oils showed the lowest CMB, 0.2%, were the oregano, basil and black pepper, while for the Chinese chili oil, clove and thyme CMB was 0.5%. The essential oils of nutmeg and lemon had the highest CMB, which is 1%. Treatment 4 applied to the ham, containing 75 ppm of nitrite + essential oil of basil (0.054%), black pepper (0.054 %%), lemon (0.054%) and thyme (0.110%) was the most efficient, down of vegetative cells with the storage time for the two temperatures studied. The oils used combinations prevent sporulation. The use of essential oils did not promote representing changes in the objective color of chicken breast ham. There was reduction of pH and increased water activity and lipid oxidation during storage. There was a significant reduction in the amount of residual nitrite during the storage time. The use of essential oils as natural preservatives embedded in cooked meat can be considered a promising alternative for the food industry, since the treatment with essential oils were not different treatments containing only nitrite in most of the physical - chemical analyzes conducted.

Keywords: Anaerobic. Preservative natural. Products meat.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	10
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	<i>Clostridium</i> sp.....	13
2.1.1	<i>Clostridium botulinum</i>	13
2.1.2	<i>Clostridium sporogenes</i>	17
2.2	Controle de <i>C. botulinum</i> em alimentos.....	17
2.3	Importância do nitrito em produtos cárneos curados.....	19
2.4	Óleos Essenciais	21
2.5	Óleos essenciais em alimentos e sua atividade antimicrobiana	22
2.6	Aplicação dos óleos essenciais em produtos cárneos	26
2.7	Descrição botânica e óleos essenciais	28
2.7.1	Basilicão/Manjericão (<i>Ocimum basilicum</i>)	28
2.7.2	Cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i>)	29
2.7.3	Limão Taiti (<i>Citrus aurantifolia</i>)	30
2.7.4	Nóz Moscada (<i>Myristica fragrans</i>).....	30
2.7.5	Orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	31
2.7.6	Pimenta Chinesa (<i>Litsea cubeba</i>).....	32
2.7.7	Pimenta Preta (<i>Piper nigrum</i>).....	32
2.7.8	Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	33
2.8	Fiambre de Peito de Frango	34
	REFERÊNCIAS	36
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	46
	ARTIGO 1 Controle de <i>Clostridium sporogenes</i> inoculados em fiambre de peito de frango por misturas de óleos essenciais	46
1	INTRODUÇÃO	49
2	MATERIAL E MÉTODOS	52
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	88

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Surtos de toxinfecções alimentares têm ganhado ampla divulgação na mídia nos últimos tempos, mostrando sua importância e o aumento de consciência do consumidor sobre os riscos aos quais estão sujeitos, ao consumirem alimentos contaminados. Dentre as diversas doenças veiculadas por alimentos destaca-se o botulismo, toxinose causada pela ingestão da neurotoxina botulínica pré-formada no alimento, sendo a bactéria responsável pela sua produção conhecida como *Clostridium botulinum*.

Clostridium botulinum é bactéria anaeróbia obrigatória, Gram-positiva, formadora de endósporos resistentes ao calor. As neurotoxinas produzidas por *C. botulinum*, denominadas de A, B e E são as responsáveis pelo botulismo em humanos, possuindo elevada taxa de morte devido à paralisia dos músculos respiratórios quando não tratado adequadamente. Embora não seja muito comum, o botulismo é considerado uma doença de emergência pública, devido a sua severidade, que é mostrada por dados apresentados pelo Centro de Referência do Botulismo onde, entre os anos de 1979 e 2002 foram notificados em fontes oficiais de registro, 125 casos de botulismo com 75 óbitos, observando-se assim, taxa de morte de 60% (EDUARDO; SIKUSAWA, 2003).

Dentre os alimentos envolvidos em surtos de botulismo encontram-se os produtos cárneos curados cozidos, pois propiciam ambiente anaeróbico ao microrganismo, pH possui valores superiores a 4,5 e por serem cozidos, têm sua microbiota diminuída, restando, entretanto, endósporos de *C. botulinum*, que podem se desenvolver sem competição.

O controle de *C. botulinum* nesse tipo de produto ocorre pela adição de sais de nitrito. A utilização de sal de cura, que é constituído dentre outros por

nitrito em produtos curados, se dá devido sua capacidade em desenvolver cor, textura e sabores únicos; vida útil prolongada com excelente estabilidade no armazenamento e controle efetivo do ranço, os quais não são obtidos pela utilização de nenhum outro sal. Entretanto, em 2006, a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) concluiu que o nitrato ou nitrito ingeridos, sob condições que resultam em formação de nitrosaminas são provavelmente carcinogênico para humanos (GROSSE et al., 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2006). Assim, buscaram-se substâncias alternativas para a redução de nitrito que não interfiram na atividade antimicrobiana e antioxidante. Nesse contexto, destacam-se os óleos essenciais de plantas condimentares e especiarias, substâncias naturais com atividades antimicrobianas e antioxidantes conhecidas.

Os óleos essenciais são alternativas seguras e eficazes aos conservantes e antioxidantes sintéticos, podendo garantir a inocuidade dos alimentos e prolongar sua vida útil. Estudos mostram que o nitrito pode ser parcialmente substituído por óleos essenciais em embutido cárneo cozido, pois apresentaram atividades antioxidante e anti-clostridial semelhantes a concentração usual de nitrito (DIAS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011). Entretanto, as concentrações efetivas a serem utilizadas ainda são elevadas.

Buscando a redução da concentração final de óleos essenciais a serem utilizados como conservante, estudos do efeito sinérgico devem ser realizados, e, assim viabilizar sua utilização nos alimentos.

Embora seja *C. botulinum* o objeto do problema, esse microrganismo é de alto risco biológico, assim, *Clostridium sporogenes* tem sido utilizado como seu modelo. *C. sporogenes* é um microrganismo na forma de bacilos Gram-positivos, anaeróbio, esporulado, que difere de *C. botulinum* apenas por não produzir neurotoxinas. Tem sido amplamente utilizado para a validação de processos térmicos para alimentos, bem como modelo de pesquisa para as

estirpes proteolíticas de *C. botulinum* (BROWN; TRAN-DINH; CHAPMAN, 2012).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito antimicrobiano sinérgico de misturas de óleos essenciais e nitrito de sódio sobre *Clostridium sporogenes* inoculado em fiambre de peito de frango; bem como sua influência sobre as características físicas e químicas do produto durante seu armazenamento a 7°C e 14°C.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Clostridium* sp.

Bactérias do gênero *Clostridium* são Gram positivas, anaeróbias, formadoras de endósporos. Existem bactérias de vida livre, bem como patógenos, que infectam seres humanos e animais. Devido à sua exigência anaeróbia, espécies de *Clostridium* têm um ciclo de vida complexo e estritamente regulamentado, que leva à formação de um tipo de esporo altamente resistente (OLGUÍN-ARANEDA et al., 2015).

A maioria das espécies patogênicas é conhecida por produzir toxinas, que são responsáveis por uma ampla gama de doenças e sintomas (HATHEWAY, 1990). Um exemplo é *Clostridium botulinum*, que produz neurotoxinas que causam botulismo, uma doença caracterizada por paralisia flácida descendente (SOBEL, 2005)

2.1.1 *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum é anaeróbio obrigatório, cujos endósporos apresentam elevada resistência ao calor, com valores de D_{121} 0,1 a 0,25 min (ADAMS; MOSS, 2002). Em alimentos processados, refrigerados, de vida útil prolongada, tradução de *Refrigerated Processed Foods of Extended Durability* (REFPEDs), a inibição deste microrganismo ocorre com a combinação de um processamento térmico ligeiro (90°C /10 min ou outro de letalidade equivalente a uma redução de 6 D), manutenção da cadeia de frio e uso de conservantes, que provocam o aumento da fase lag de crescimento por um período de tempo que pode ir de alguns dias até 3 meses (DAY, 2000; MEMBRÉ; KAN-KING-YU; BLACKBURN, 2008; RYBKA-RODGERS, 2001; RAJKOVIC et al., 2006).

É um importante patógeno associado a toxiose alimentar, pois produz potente neurotoxina que interfere na liberação da acetilcolina no sistema de transmissão e ampliação do estímulo nervoso para os músculos, danificando-o e, dessa forma, provoca paradas cardíacas e, principalmente, respiratórias, levando à morte se ingerida em concentrações de 1 µg (TOMPKIN, 1986). A toxina botulínica é absorvida através do trato gastrointestinal (TGI), atingindo a corrente sanguínea e é transportada até os terminais neuromusculares; liga-se à membrana neuronal, na terminação nervosa em nível da junção neuromuscular e desloca-se para o citoplasma do terminal axônico, onde bloqueia a transmissão sináptica excitatória, provocando paralisia flácida (ARAÚJO, 2008).

Com base nas propriedades sorológicas das toxinas, as estirpes de *C. botulinum* são divididas em tipos sorológicos que vão de A à G, sendo divididas em quatro sub – grupos (I, II, III e IV). As cepas que causam botulismo humano pertencem ao grupo I e II, sendo que as do grupo I consistem de microrganismos que produzem enzimas proteolíticas e toxinas do tipo A, B e F (Tabela 1). As cepas pertencentes a esse grupo têm temperatura ótima de crescimento entre 35 a 37°C e não apresentam crescimento abaixo de 10°C (LINDSTROM; KIVINIEMI; KORKEAL, 2006).

Tabela 1 Subdivisão fisiológica de *Clostridium botulinum*

Grupo	Toxina	Proteolítico	Lipolítico	Sacarolítico	T min °C	Aw	Resistência ao calor	Patogenicidade
I	A,B,F	+	+	+	10-12	0,94 (10%)	+	Humano
II	B,E,F	-	+	+	3-5	0,975 (5%)	-	Humano
III	C1,C2,D	-	+	+	15	3%	+/-	Animais
IV	G	+	-	-	12	>3%	ND	Humano

Fonte: Adaptado de Adams e Moss (2002)

Por ser amplamente distribuído na natureza, *C.botulinum* chega facilmente aos alimentos, contaminando tanto alimentos de origem vegetal quanto animal. Entretanto, o grande problema da presença dos esporos é quando contaminam alimentos de baixa acidez ($\text{pH} > 4,6$), como embutidos cárneos, enlatados ou conservas que não sofrem tratamento térmico adequado ou que não contém conservante.

A conversão do esporo em célula vegetativa envolve três etapas: ativação, germinação e crescimento. A ativação pode ser alcançada por aquecimento a temperaturas subletais, respondem também ao pH, ao álcool e a diversos nutrientes como aminoácidos, açúcares, lactato e nicotinamida (PAREDES-SABJA et al., 2008). As células vegetativas se multiplicam produzindo toxina durante a fase logarítma de crescimento, a liberando no alimento (SCARCELLI; PIATTI, 2002), durante a lise celular e liberação do endósporo.

O botulismo é uma doença de distribuição mundial e acomete pessoas em casos isolados ou em surtos familiares. É considerado um problema de saúde pública por sua alta gravidade e letalidade. De ocorrência súbita, se caracteriza por manifestações neurológicas e alta mortalidade (BARBOZA; SANTOS; SOUSA, 2011). Nos Estados Unidos ocorrem por ano em média, 100 casos. Em Taiwan, num período de 20 anos, foram relatados cinco casos que estavam em sua maioria, associados ao consumo de comida fermentada, alimento característico do país (TSENG et al., 2009).

No Brasil, no período de 1999 a 2006, foram confirmados 30 casos de botulismo por critério laboratorial e/ou clínico epidemiológico, dos quais 29 de origem alimentar e um por ferimento. Dos 20 casos de botulismo alimentar com confirmação laboratorial (presença de toxina identificada em amostras de soro do paciente e/ou alimento implicado), 15 foram devido à toxina tipo A (75%), quatro devido a dois tipos de toxina, A e B (20%), e um, sem identificação do

tipo da toxina (EDUARDO, 2007). Segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 1998), de 2000 a 2014, do total de doenças transmitidas por alimentos, 0,3% foram causadas por *C. botulinum*.

2.1.2 *Clostridium sporogenes*

Clostridium sporogenes está incluído no grupo dos clostrídios Sulfito Redutores a 46°C. Sua importância não se dá pela patogenicidade, mas sim, por estar fortemente relacionado à presença de *C. botulinum*, causador do botulismo e por apresentar elevada resistência térmica, maior que as espécies *C. perfringens* e *C. botulinum*. É um microrganismo putrefativo, decompondo proteínas com subsequente produção de amônia e ácido sulfúrico (BROWN, 2000).

Quando comparado ao *C. botulinum*, *C. sporogenes* apresenta algumas vantagens: não produz neurotoxina; é de fácil detecção através do odor ou formação de gás; apresenta similaridade genética com cepas proteolíticas de *C. botulinum*; culturas de esporos com alta resistência térmica podem ser produzidas com facilidade; possui resistência térmica um pouco acima da de *C. botulinum*, o que o caracteriza como bom substituto para validar processos térmicos (BROWN; TRAN-DINH; CHAPMAN, 2012).

2.2 Controle de *C. botulinum* em alimentos

Clostridium botulinum não é um bom competidor na presença de outros microrganismos; pH inferior a 4,5 impede sua multiplicação; atividade de água menor que 0,93 é limitante; concentrações de NaCl maiores que 8% impedem a produção da toxina (GELLI et al., 2002).

O desenvolvimento do *Clostridium botulinum* em alimentos é condicionado por vários fatores de natureza física e/ou química, aos quais chamamos de barreiras. O controle da atividade de água - Aa (limitando o teor de água disponível no alimento), a acidez, a utilização de temperaturas elevadas de processamento, a estocagem em baixa temperatura, o uso de cloreto de sódio e de nitritos ou outros conservadores são algumas das barreiras mais comumente utilizadas (CERESER, 2008).

Os esporos, embora termorresistentes podem ser destruídos por tratamento térmico. A temperatura máxima de crescimento das bactérias botulínicas é de 50 °C e em temperaturas superiores, o crescimento é inibido (BRESSAN; GALINDO; SANTOS, 1999).

Em relação à segurança microbiológica, o *C. botulinum* representa um perigo em potencial para alimentos embalados a vácuo, principalmente produtos cárneos, de baixa acidez. Assim, embalagens com atmosfera modificada, onde o O₂ não é totalmente retirado tornam-se mais eficientes. A presença de O₂ no início pode favorecer o crescimento de microbiota competitiva como bactérias ácido-láticas, e, desse modo, ajudar a prevenir o desenvolvimento de patógenos anaeróbicos, principalmente *Clostridium botulinum* (CHURCH, 1994; OORAIKUL, 2003).

A ação do nitrito, como conservante, merece menção especial, em sua eficácia que contrasta com o risco decorrente da formação de nitrosaminas, consideradas cancerígenas. O nitrito na carne mantém um elevado potencial de oxi-redução. Isto faz com que o produto conserve condições de aerobiose, a ponto de se tornar o meio impróprio ao desenvolvimento de anaeróbios (PARDI et al., 2006).

2.3 Importância do nitrito em produtos cárneos curados

Um dos aditivos mais importantes no processamento de carnes é o nitrito. De acordo com a legislação brasileira (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 1998), o nitro de sódio e de potássio são considerados conservantes, embora tenham outras funções tecnológicas, conferindo as características distintivas da carne curada (CASSENS, 1990).

A ação do nitrito em carnes curadas é uma mistura complexa de reações químicas interativas, que envolvem várias substâncias diferentes (HONIKEL, 2004).

O nitrito tem elevada ação inibitória sobre bactérias anaeróbicas, especialmente sobre *C. botulinum* e contribui para o controle de outros microrganismos, como *Listeria monocytogenes*. Os efeitos do nitrito e o mecanismo inibitório, provavelmente diferem entre espécies bacterianas (TOMPKINS, 2005). Entretanto, sabe-se que a eficácia do nitrito como agente antibotulínico é dependente de vários fatores intrínsecos como o pH, a concentração de cloreto de sódio, redutores e teor de ferro, entre outros (TOMPKINS, 2005). Trabalhos realizados com *C. botulinum* Tipo A e com *Clostridium sporogenes* mostraram que ambas as espécies obtêm energia por fosforilação em nível de substrato, pela reação fosforoclástica (Figura 1), sendo a atividade das enzimas, ferro-enxofre ferredoxina e piruvato-ferredoxina oxireductase, inibidas pelo óxido nítrico produzido a partir de nitrito, resultando na rápida redução do ATP intracelular (CARPENTER; REDDY; CORNFORTH, 1987; WOODS; WOOD; GIBBS, 1990).

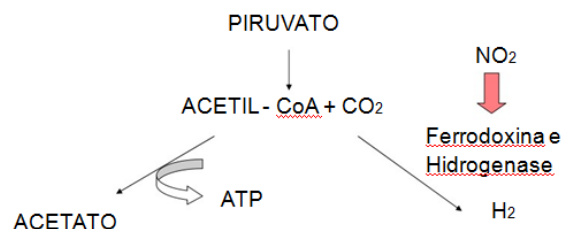


Figura 1 Esquema simplificado do sistema fosforoclático (clivagem oxidativa do piruvato a acetato)

O termo "cura" em relação à carne processada é universalmente entendido como a adição de nitrito ou nitrato, sal e outros ingredientes para melhorar a preservação de carne (PEGG; SHAHIDI, 2000).

A aparência visual dos produtos alimentares, especialmente a cor, influenciam na avaliação dos consumidores quanto ao frescor e a qualidade da carne e seus derivados. A cor de produtos cárneos é determinada pela combinação de diferentes fatores, incluindo a umidade e o conteúdo de gordura, mas o mais importante é a forma química e a concentração das hemoproteínas, especialmente a de mioglobina (Mb). Haldane (1901) sugeriu pela primeira vez que o óxido nítrico (NO) associado com a mioglobina da carne, forma o pigmento responsável pela cor de carne curada e a geração de óxido nítrico, a partir de nitrito foi depois determinada como passo essencial no processamento de carne (CASSENS, 1990).

O nitrito também é capaz de retardar ou inibir reações de oxidação. Sua atividade antioxidante é baseada na formação de compostos estáveis entre pigmentos heme e nitrito (oxidante), com reduções do Fe^{3+} para Fe^{2+} que reduz o número de íons ferro livre Fe^{3+} catalisadores da oxidação lipídica, sendo necessários cerca de 20 a 60 ppm de nitrito para que este atue como antioxidante (PEGG; SHAHIDI, 2000).

O nitrito em concentrações elevadas é tóxico para os seres humanos. Desempenha papel importante na formação de N-nitrosaminas carcinogênicas. O ácido nitroso, oriundo da hidratação do óxido de nitrito produzido pela redução do nitrito de sódio, pode reagir com aminas em produtos cárneos curados, para formação de compostos N-nitrosos, em especial as nitrosaminas. A formação desses compostos é um processo complexo que depende de vários parâmetros associados a diferentes condições de preparação, armazenamento e, ou, tratamento térmico da carne (RYWOTYCKI, 2002).

Grandes quantidades de nitrito podem ser encontradas no meio ambiente, especialmente devido ao uso intensivo de fertilizantes químicos nitrogenados. Concentrações excessivas de nitrito na água potável e nos alimentos podem ter efeitos prejudiciais sobre a saúde humana, especialmente para crianças e gestantes, por isso a importância de monitorar o nitrito em produtos cárneos e águas naturais. No Brasil, os níveis permitidos de nitrito em águas naturais e produtos cárneos são $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ (N) (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA, 2005) e 150 mg kg^{-1} (NaNO_2) (BRASIL, 1998), respectivamente.

2.4 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos voláteis que são identificados por cheiro forte e são produzidos por plantas aromáticas como metabólitos secundários. Consistem em misturas de vários componentes ativos, extraídos dos botões florais, flores, galhos, folhas, cascas, madeira, frutos e raízes da planta (TEPE et al., 2004).

As plantas aromáticas e especiarias são comumente usadas em fitoterapia e os óleos essenciais apresentam diversas atividades, como antimicrobianas, antioxidantes, antifúngicas, carminativa, hepatoprotetora,

antiviral e atividades anticancerígenas, são protetores naturais de plantas e baixa toxicidade para mamífero nas concentrações utilizadas (BURT, 2004; ISMAN, 2000; KALEMBA; KUNICKA, 2003).

Devido suas várias características, pode ser utilizado como alternativa aos conservantes químicos sintéticos. Por ser considerado um produto natural, conhecidos como aditivos, geralmente seguros GRAS (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2014), classificado como aromatizante natural pela legislação brasileira (ANVISA, 2007), diminuir deteriorações, oxidações, apresentando eficiência nas funções antioxidantes, anti-radicais e antimicrobianas em alimentos (OUSSALAH, 2006; SACCHETTI et al., 2005) têm ganhado cada vez mais importância.

2.5 Óleos essenciais em alimentos e sua atividade antimicrobiana

Apesar das melhorias modernas na produção de alimentos e preservação, a segurança alimentar é preocupação crescente de saúde pública. A sobrevivência de microrganismos nos alimentos é um problema importante, que pode levar à deterioração e prejudicar a qualidade dos produtos alimentares, além das doenças transmitidas por alimentos (CELIK TAS et al., 2007).

Mesmo o conservante químico sendo utilizado há anos pelas indústrias, há muitas discussões e controvérsias a respeito de seu uso. Alguns estudos apontam os conservantes químicos sintéticos, como causadores de problemas respiratórios, dentre outros (FLEMING-JONES; SMITH, 2003). Portanto, é necessário encontrar novas maneiras de controlar os microrganismos nos alimentos.

Os óleos essenciais são utilizados em ampla variedade de alimentos, produtos farmacêuticos e indústrias de cosméticos devido ao seu aroma,

propriedades antioxidantes e antimicrobianos (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

Há um grande interesse da indústria alimentícia de incorporar óleos essenciais em alimentos como conservantes, devido ao seu reconhecimento como compostos naturais e seguros, sendo alternativa potencial para a produção de alimentos livres de aditivos sintéticos. No entanto, a incorporação de óleos essenciais antimicrobianos para alimentos, ainda apresenta vários inconvenientes, devido à sua fraca solubilidade em água, bem como a considerações toxicológicas e econômicas (BURT, 2004; SÁNCHEZ-GONZALEZ et al., 2011).

Vários estudos têm demonstrado que óleos essenciais de plantas medicinais, especiarias e ervas, inibem significativamente, ampla gama de microrganismos. Além disso, diferentes resultados em testes antimicrobianos foram observados (TURGIS et al., 2009). Considerando a sua excelente função antimicrobiana, os óleos essenciais possuem grande potencial como aditivos naturais para a conservação de alimentos.

Alterações de sabor no alimento podem ocorrer em virtude do uso de óleos essenciais, assim, efeitos sinérgicos da combinação entre óleos essenciais foram realizados com o intuito de obter eficácia na atividade antimicrobiana em concentrações suficientemente baixas, e sugerem que a combinação, pode reduzir o impacto sensorial negativo (DIAS et al., 2015; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009; MARTINS, 2013; RODRIGUES, 2014).

É possível que a atividade dos principais componentes, ou seja, dos compostos majoritários, seja modulada por outras moléculas pequenas, e, além disso, é provável que os vários componentes dos óleos essenciais desempenhem papéis diferentes, definindo a fragrância, a densidade, a textura, a cor e, acima de tudo, a penetração celular, ou atração lipofílica e hidrofílica, fixação em paredes e membranas celulares e distribuição celular. Esta última característica é

muito importante porque a distribuição do óleo na célula determina os diferentes tipos de reações de radicais produzidos, dependendo da sua compartimentação para a célula. Nesse sentido, para fins biológicos, é mais informativo estudar um óleo inteiro, em vez de alguns de seus componentes porque o conceito de sinergia pode ser mais significativo (CAL, 2006).

Alguns dos óleos essenciais de orégano, alecrim, salsa, cravo, erva-cidreira, sálvia e outros apresentaram propriedades antibacterianas e antioxidantes em carnes e produtos cárneos (HASAPIDOU; SAVVAIDIS, 2011).

O óleo essencial pode produzir a desnaturação das proteínas e a ruptura da estrutura da membrana, conduzindo à libertação de ATP intracelular e a morte celular (RHAYOUR et al., 2003).

Existe um grande número de diferentes grupos de compostos químicos presente nos óleos essenciais, assim é provável que sua atividade antibacteriana não seja atribuída a um mecanismo específico, mas sim a vários alvos na célula como demonstrado na Figura 2 (NAZZARO et al., 2013).

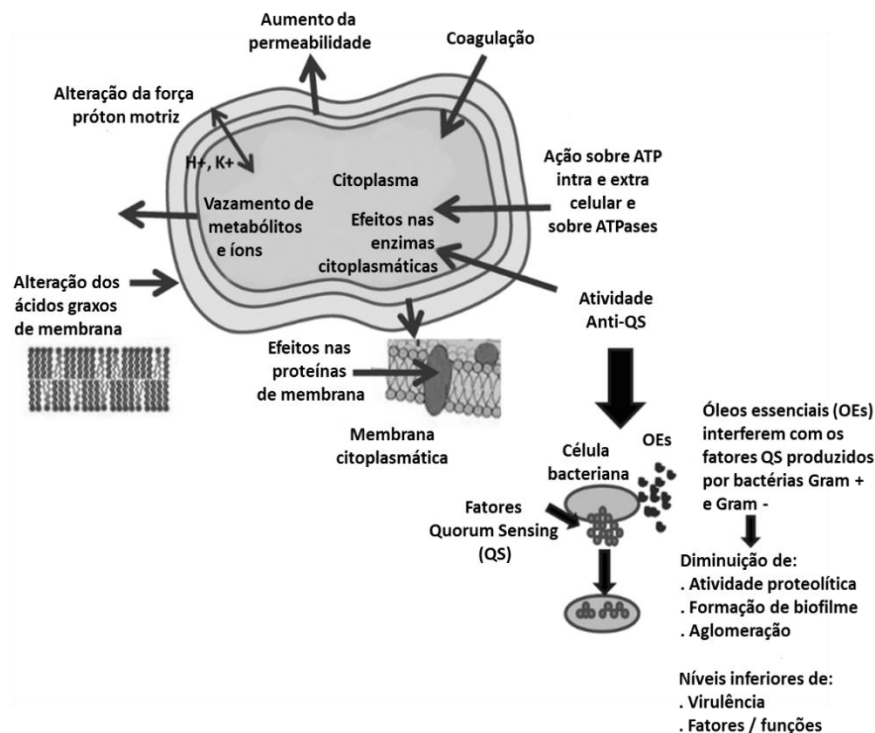


Figura 2 Localidades e mecanismos de ação de componentes dos óleos essenciais em células bacterianas. Danos à membrana citoplasmática e proteínas de membrana; fluxo de constituintes intracelulares; coagulação do citoplasma e depleção da força próton motiva

Fonte: Nazzaro et al. (2013) com modificações

Em resumo, os OE's degradam a parede celular, perturbam a camada dupla de fosfolipídio da membrana citoplasmática e danificam as proteínas da membrana levando ao aumento da permeabilidade e a perda de constituintes celulares. Danificam a força motriz de prótons, o fluxo de elétrons e o transporte ativo, podendo coagular o conteúdo das células (BURT, 2004).

Além disso, estes óleos podem prejudicar uma variedade de sistemas de enzimas, incluindo as enzimas envolvidas na regulação da energia e síntese de componentes estruturais (BURT, 2004) além de inativar ou destruir material

genético (SOLOMAKOS et al., 2008), fortalecendo suas atividades antimicrobianas. Os compostos fenólicos, como carvacrol, eugenol e timol, são os principais responsáveis para a atividade antimicrobiana por aumentar a permeabilidade das membranas celulares, levando à perda de constituintes celulares (JAYASENA; JO, 2013).

Vários óleos essenciais, derivados de plantas e especiarias utilizadas na culinária podem ser efetivamente utilizados em carnes e produtos derivados como alternativas naturais para aditivos alimentares sintéticos, especialmente como agentes antimicrobianos eficazes.

2.6 Aplicação dos óleos essenciais em produtos cárneos

A carne e os produtos processados a base de carne são altamente propensos à contaminação microbiana, devido à elevada quantidade de nutrientes essenciais e perecíveis. Isto é ainda mais acelerada por alguns fatores intrínsecos, incluindo pH e atividade de água de água (JAYASENA; JO, 2013).

A perda de produtos cárneos por deterioração acontece em grande número, todos os anos, em diferentes níveis da cadeia de produção, incluindo a preparação, armazenamento e distribuição. Além de oxidação lipídica e deterioração enzimática, a deterioração microbiana desempenha papel importante neste processo de deterioração que leva a impacto econômico e ambiental, substancial (DAVE; GHALY, 2011).

Em relação às carnes e derivados, a contaminação por diversos microrganismos patogênicos, incluindo *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp. *Aeromonas hydrophila* pode resultar em doenças de origem alimentar para os consumidores, se os produtos não forem preservados e tratados adequadamente (JAYASENA; JO, 2013).

Óleos essenciais têm demonstrado atividades antibacterianas e antifúngicas contra vários microrganismos associados à carne, incluindo as bactérias gram-negativas e gram-positivas (KARABAGIAS; BADEKA; KONTOMINAS, 2011). Conservantes contendo óleos essenciais já estão comercialmente disponíveis. “DMC base natural” é um conservante de alimentos produzido pela DOMC S.A, que contém uma mistura de 50% de óleo essencial de alecrim, sálvia e citrinos e 50% de glicerol (MENDOZA-YEPES et al., 1997).

Muitos estudos têm sido conduzidos para examinar os efeitos do OE obtido a partir de fontes como orégano, alecrim, tomilho, sálvia, manjerição, açafrão, coentro, gengibre, alho, noz-moscada, cravo, maçã, segurelha e funcho, quando usado sozinho ou em combinação com outros métodos de conservação, a fim de melhorar as qualidades sensoriais e estender a vida útil de carnes e produtos derivados (DIAS et al., 2011; GOULÀS; KONTOMINAS, 2007; OLIVEIRA et al., 2011).

Para a indústria de carnes, os extratos de plantas e as oleorresinas têm preferência sobre as especiarias, devido à sua melhor estabilidade durante o armazenamento, a segurança microbiológica, alta concentração de componentes de sabor, espaço de armazenamento reduzido, facilidade de manuseamento, disponibilidade e padronização (TIPSRISUKOND; FERNANDO; CLARK, 1998).

Incorporação de OE de orégano em carnes e produtos cárneos tem sido aplicada por ser eficaz contra a microbiota deteriorante (TSIGARIDA; SKANDAMIS; NYCHAS, 2000).

Solomakos et al. (2008) observaram o efeito antimicrobiano do tomilho em níveis de adição de 0,3%, 0,6%, e 0,9% sobre *E. coli* O157: H7 inoculada em carne moída. O potencial antimicrobiano do óleo de cravo da Índia sobre *L. monocytogenes* inoculado em carne de carneiro moída, armazenada a 30°C e

7°C, foi demonstrado por Menon e Garg (2001). Além disso, foi sugerido que níveis baixos de óleo de cravo podem ser suficientes para garantir a segurança da carne em situações reais em que as cargas bacterianas são baixas.

Os óleos essenciais podem ser aplicados em níveis mais baixos quando combinados com outras tecnologias de conservação, incluindo a baixa temperatura, acidez (SKANDAMIS; NYCHAS, 2001) e conservantes, por exemplo, nitrito, nisina, etc (ZHOU; XU; LIU, 2010), bem como modificações na embalagem. Essa combinação faz com que a microbiota seja estabilizada mantendo-se a qualidade sensorial de carnes e derivados.

2.7 Descrição botânica e óleos essenciais

Os óleos essenciais podem ser extraídos de grande diversidade de condimentos tais como basilicão, cravo-da-índia, limão taiti, noz - moscada, orégano, pimenta chinesa, pimenta preta e tomilho.

2.7.1 Basilicão/Manjericão (*Ocimum basilicum*)

O gênero *Ocimum* (*Lamiaceae*) inclui ervas, arbustos anuais e perenes nativas das regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, América Central e América do Sul (PATON; HARLEY; HARLEY, 1999).

O basilicão ou manjericão, como é mais conhecido (*Ocimum basilicum* L.) é uma erva aromática que é amplamente utilizada para adicionar um aroma e sabor aos alimentos. As folhas podem ser utilizadas frescas ou secas para utilização, como uma especiaria. Os óleos essenciais extraídos das folhas frescas e flores podem ser usados como aditivos de aroma em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos (JAVANMARDI et al., 2002).

Tradicionalmente, o manjeriço tem sido usado como planta medicinal no tratamento de dores de cabeça, tosse, diarreia, prisão de ventre, verrugas, vermes e mau funcionamento dos rins (SIMON et al., 1999).

Tem atividade antibacteriana, antifúngica, inseticida e atividade hepatoprotetora e contém substâncias antimicrobianas também. Tem efeito antioxidante e antiulcerogênico (HOLM, 1999).

A composição química do óleo essencial do manjeriço apresenta grande quantidade de compostos secundários, bem como de marcadores, o que confere a existência de diferentes quimiotipos. À exemplo dos compostos majoritários tem-se o eugenol e o linalol, que apresentam efeito antimicrobiano. Estes são biossintetizados por diferentes rotas biossintéticas: a rota do chiquimato e do mevalonato, respectivamente (SIMÕES; SPITZER, 1999).

2.7.2 Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*)

Syzygium aromaticum, vulgarmente conhecida como cravo é muito utilizado para conferir sabor aos alimentos e também como um remédio popular para os dentes, distúrbios respiratórios, dores de cabeça e dor de garganta na medicina tradicional dos países asiáticos (MISHRA; SINGH, 2008).

Seus botões florais secos são comumente conhecidos como dentes e têm sido relatados por ser rico em óleo volátil (aproximadamente 15-20%). O óleo de cravo é maioritariamente composto por quatro compostos: eugenol, β -cariofileno, α -humuleno e acetato eugenila (GUAN, 2007; HATAMI; MEIRELES; ZAHEDI, 2010).

Eugenol é o principal composto de óleo de cravo, o que representa mais de 50% da composição extraído no total e tem forte atividade biológica e antimicrobiana. Além do eugenol o β -cariofileno exhibe várias propriedades biológicas, incluindo antimicrobiana, anti-carcinogênica, anti-inflamatória e

antioxidante. Portanto, um método eficaz para preparar óleos de botões de cravo seria útil para utilização em alimentos e medicamentos para consumo humano (LIU et al., 2013).

2.7.3 Limão Taiti (*Citrus aurantifolia*)

O limão Taiti é um fruto de origem tropical, de exploração econômica relativamente recente. No contexto mundial, os principais produtores são o México, EUA (Flórida), Egito, Índia, Peru e Brasil. É uma das espécies de *Citrus* de maior precocidade, apresentando, já a partir do terceiro ano, uma produção significativa (COELHO, 1993). O Brasil se destaca como o segundo maior produtor de frutos cítricos e o maior exportador de sucos cítricos, tendo o limão Taiti como um dos seus frutos de maior relevância comercial.

Os óleos essenciais do gênero *Citrus* apresentaram como componentes principais o limoneno, alfa e beta pineno e sabineno (ATTAWAY; PIERINGER; BARABAS, 1966), concordando com Craveiro et al. (1981) que afirmam que a maioria dos óleos essenciais dos frutos possuem como componente principal o monoterpene limoneno.

2.7.4 Nóz Moscada (*Myristica fragrans*)

Noz-moscada é o núcleo duro da semente de uma árvore perene nativa das Molucas. O óleo essencial é obtido por destilação a vapor da noz moscada e é muito usado nas indústrias farmacêuticas e de perfumaria. Cerca de 10.000 toneladas por ano são produzidos e utilizados principalmente nos EUA, Japão, Europa e Índia. O óleo essencial é incolor ou amarelado e possui forte aroma e sabor, assim como a noz-moscada em pó. Ele contém numerosos componentes de interesse para a indústria oleoquímica e é usado como aromatizante de

alimentos naturais em produtos de panificação, xaropes (por exemplo, a Coca-Cola), bebidas, doces, etc. O óleo essencial da noz-moscada é bem conhecido por suas atividades biológicas, sendo bastante utilizado na medicina alternativa para combater doenças do sistema nervoso e digestivo (CALLISTE et al., 2010).

Os principais componentes químicos do óleo de noz-moscada são borneol, geraniol, linalool, terpineol, eugenol, miristicina, safrol, canfeno, dipenteno e pineno (TAINTER; GRENIS, 2001).

2.7.5 Orégano (*Origanum vulgare*)

Espécies *Origanum* da família *Lamiaceae* é importante erva culinária no comércio mundial. É amplamente distribuída nos campos da China e alguns países da Ásia Central (HUDABERDI, 2004) e tem sido amplamente utilizada como um remédio tradicional para tratar várias doenças, tais como tosses convulsivas, desordens digestivas, e problemas menstruais (OZBEK et al., 2008).

O óleo essencial da planta possui propriedades antimicrobianas, fungicida e antioxidante (BOUHDID et al., 2008).

A composição do óleo essencial de *Origanum* spp. tem sido extensivamente investigada. Na última década, *Origanum vulgare* L. se mostrou uma fonte valiosa de produtos naturais para manter a saúde humana. As propriedades de aroma, sabor e farmacêuticas são atribuídas ao óleo essencial da planta, que consiste principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos (HUDABERDI, 2004).

Recentemente, Lee et al. (2005) encontraram no óleo essencial das folhas a presença dos componentes majoritários timol e carvacrol.

2.7.6 Pimenta Chinesa (*Litsea cubeba*)

Litsea cubeba é uma das mais antigas ervas conhecidas principalmente por seu aroma agradável, é distribuída no sul da China, Japão, assim como países do Sudeste Asiático. Seus frutos são utilizados na farmácia, perfumaria e em alimentos. As frutas secas de *L. cubeba* são usadas na medicina tradicional chinesa e em medicamentos populares, uma vez que é considerado um carminativo, diurético, expectorante, estimulante, estomacal, anti-asmática, sedativo e anti-séptico (COMISSÃO DA FARMACOPEIA CHINÊS - CHPC, 2010).

Litsea cubeba é conhecida também por may-chang, ou pimenta-chinesa e seu óleo essencial tem alta concentração de citral, similar ao da verbena e ao do lemongrass. O extrato da planta pode ser fonte de antioxidantes naturais de fácil acesso. O isolamento de compostos bioativos nos extratos ajudaria a determinar a potência individual dos compostos (JIM; SHA, 2004).

2.7.7 Pimenta Preta (*Piper nigrum*)

A espécie *P. nigrum* é uma planta perene com caule liso, redondo, nodoso e ramificado; as folhas são inteiras, lâminas ovaladas, ápice agudo, coriáceas e com sete nervuras principais; as flores são pequenas, brancas, dispostas em espigas; os frutos são globulares, vermelhos quando maduros que ao secarem, possuem uma superfície grossa e rugosa (MANUAL..., 2005).

A introdução da pimenta-do-reino no Brasil, pelos colonos portugueses no séc. 17, ficou restrita aos estados do litoral brasileiro que só foi estabelecida como cultivo racional após a introdução da cultivar Cingapura (ecotipo de Kuching) por imigrantes japoneses, em 1933. Mais tarde, os japoneses e os brasileiros introduziram o sistema de cultivo intensivo praticado na Malásia,

tornando o Brasil auto-suficiente, em 1950. Hoje, é cultivada em mais de 100 municípios nos Estados do Pará, Espírito Santo, Bahia, Maranhão, Ceará, Paraíba e 15 recentemente, no Estado do Amapá, alcançando o Brasil no ano de 2004 uma produção de 30.000 toneladas por hectare/ano (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2005).

As investigações fitoquímicas realizadas ao longo das últimas décadas em *P. nigrum*, revelaram uma ampla variedade de metabólitos especiais presentes nesta espécie, os quais se distribuem em diferentes classes de compostos: amidas/alcalóides, propenilfenóis, lignanas, neolignanana, terpenos, flavonas e miscelâneas de compostos, dos quais alguns são encontrados apenas nesta espécie (PARMAR et al., 1997).

2.7.8 Tomilho (*Thymus vulgaris*)

Thymus L. (Labiatae) consiste em cerca de 215 espécies de herbáceas perenes e sub-arbustos (NICKAVAR; MOJAB; DOLAT-ABADI, 2005). Espécies de *Thymus* estão bem adaptadas ao clima quente e seco da região do Mediterrâneo e são comuns nas partes áridas da Península Ibérica (HORWATH et al., 2008).

Várias espécies do gênero *Thymus* foram relatadas por serem fortemente antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes. Estas propriedades dependem da composição do óleo essencial. Óleo de tomilho é listado em farmacopeias da Europa, Alemanha e Reino Unido, sendo utilizado como conservante natural na indústria de alimentos. Os componentes voláteis são importantes na determinação da atividade biológica das espécies (NEZHADALI et al., 2010).

O tímolo, que é o principal componente do óleo de tomilho, tem sido relatado por atuar como antioxidante, antimicrobiano, antifúngico, para o

tratamento de doenças do trato respiratório, cicatrização de feridas, diurético, etc (NEZHADALI et al., 2010).

Recentemente, o tomilho tornou-se uma das plantas medicinais mais importantes, sendo também utilizada como aditivo natural em estudos com alimentos a base de aves e alimentação de gado (ABU-DARWISH; ABU-DIEYEH, 2009).

2.8 Fiambre de Peito de Frango

Os produtos cárneos embutidos, ou produtos de salsicharia ocupam posição de destaque nas indústrias alimentícias, além de apresentar grande consumo popular. Tais produtos são elaborados à base de carne e/ou miúdos comestíveis acrescidos ou não de especiarias e condimentos, submetidos à ação do calor, alcançando em seu interior, temperatura suficiente para conseguir a coagulação total das proteínas cárneas. Nesse grupo, encontram-se produtos como mortadela, salsichas, presunto cozido e fiambres (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Embutidos cárneos são definidos como produtos elaborados com carnes ou outros tecidos de animais comestíveis, curados ou não, defumados e dessecados ou não, tendo como envoltório, tripas naturais ou artificiais, ou envoltório plástico apropriado (DUARTE, 2010).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento entende-se por Fiambre “... produto cárneo industrializado, obtido de carne de uma ou mais espécies de animais de açougue, miúdos comestíveis, adicionado de ingredientes e submetido a processo térmico adequado” (BRASIL, 2000). O produto poderá receber outras denominações, de acordo com a sua tecnologia e forma de apresentação. São permitidos ingredientes opcionais tais como proteínas de origem animal e/ou vegetal, recheios (pistache, queijo, salame,

etc.), açúcares, malto dextrina, condimentos, aromas, especiarias e aditivos intencionais. Além disso, permite-se também o limite máximo, de 30,0% de adição de carne mecanicamente separada; 10,0% de miúdos comestíveis e 2,5% de proteínas não cárneas na forma agregada.

O fiambre de peito de frango é um diferencial, visto que a carne de frango merece destaque por seu valor nutritivo e baixo custo. O crescimento na produção tem sido acompanhado por uma maior diversificação de produtos, praticidade e valor agregado, em detrimento da comercialização de carcaças inteiras e cortes. Esta tendência dá-se em razão da mudança de hábitos da população, onde praticidade, qualidade nutritiva e segurança alimentar, com preços acessíveis, são condições básicas para a indústria alimentícia (OLIVO, 2006).

REFERÊNCIAS

ABU-DARWISH, M. S.; ABU-DIEYEH, Z. H. M. Essential oil content and heavy metals composition of *Thymus vulgaris* cultivated in various climatic regions of Jordan. **International Journal of Agricultural and Biological**, Faisalabad, v. 11, p. 59–63, 2009.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 2nd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2002. 479 p.

ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 25, n. 6, p. 407–426, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998 ementa não oficial: aprova o Regulamento Técnico: "Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos", constante do Anexo desta Portaria. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, de 14 de dezembro de 1998.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007**. Presidente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso das atribuições que lhe confere o Decreto de nomeação de 30 de junho de 2005 do Presidente da República e tendo em vista o disposto no inciso III do art. 16 e no inciso II, §§ 1º e 3º do art. 54 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Portaria nº 354 da ANVISA, de 11 de agosto de 2006, republicada no DOU de 21 de agosto de 2006. Disponível em: < http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/resolu%C3%A7%C3%A3o-2_2007.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2015.

ATTAWAY, J.; PIERINGER, A.; BARABAS, L. Origin of citrus flavor componentes. II. Identification of volatile componentes from citrus blossoms. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 5, n. 6, p. 1273-1279, Mar. 1966.

BARBOZA, M. M. O.; SANTOS, N. F.; SOUSA, O. V. Surto familiar de botulismo no Estado do Ceará: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n. 3, p. 400-402, 2011.

BOUHDID, S. et al. Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 7, p. 1563–1570, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 20, de 31 de julho de 2000. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de almôndega, de apresuntado, de fiambre, de hambúrguer, de kibe, de presunto cozido e de presunto. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 3 de agosto de 2000, Seção 1, p. 7. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1681>>. Acesso em: 9 fev. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria no. 1002/1004, de 11/12/98**. Regulamento técnico de atribuição de função de aditivos, e seus limites máximos de uso para a categoria 8- carne e produtos cárneos. Brasília, 1998.

BRESSAN, M. C.; GALINDO, G. M.; SANTOS, M. A. **O botulismo no homem, nos animais e em alimentos**. Lavras: [s. n.], 1999. 19 p.

BROWN, K. L. Control of bacterial spores. **British Medical Bulletin**, Edinburg, v. 56, n. 1, p. 158–171, 2000.

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

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

CAL, K. Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 72, p. 311–316, 2006.

CALLISTE, C. et al. A new antioxidant from wild nutmeg. **Food Chemistry**, London, v. 118, n. 2, p. 489-496, 2010.

CARPENTER, C. E.; REDDY, D. S. A.; CORNFORTH, D. P. Inactivation of clostridial ferredoxin and pyruvate-ferredoxin oxireductase by sodium nitrite. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 3, p. 549-552, 1987.

CASSENS, R. G. **Nitrite-cured meat**. Trumbull: Food and Nutrition, 1990.

CELIK TAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 2, p. 553–559, 2007.

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

CHINESE PHARMACOPOEIA COMMISSION. **Chinese pharmacopoeia**. Beijing: Chinese Medical Science and Technology, 2010. p. 219–220.

CHURCH, N. Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies. **Trends in Food Science e Technology**, Cambridge, v. 5, p. 345-352, 1994.

COELHO, I. S. **Lima ácida 'Tahiti' para exportação**: aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1993. 35 p.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 357/05**. Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. Brasília, 2005.

CRAVEIRO, A. A. et al. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981. 210 p.

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

DAY, B. Chilled storage of foods. In: ROBINSON, R.; BATT, C.; PATEL, P. **Encyclopedia of food microbiology**. Bath: Academic, 2000. p. 403-410.

DIAS, N. A. A. et al. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre clostridium perfringens tipo A**. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/site/higienistas/trabalhos/10076.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2015.

DIAS, N. A. A. et al. **Viabilidade de *Clostridium difficile* em mortadela adicionada de óleos essenciais e teor reduzido de nitrito de sódio** 2015. 124 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

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 f. Monografia (Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal Fluminense, 2010.

EDUARDO, M. B. P. Botulismo tipo A e B causado por torta comercial de frango com palmito e ervilhas no município de São Paulo, SP. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 4, n. 38, jan. 2007. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa38_botu.htm>. Acesso em: 21 set. 2015.

EDUARDO, M. B. P.; SIKUSAWA, S. O botulismo no Brasil e o trabalho desenvolvido pelo centro de referência do botulismo. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 1., 2003, Belo Horizonte. **Trabalhos apresentados...** São Paulo: GT, 2003. p. 60. (Encarte da Revista Higiene Alimentar).

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Pimenta do reino.** 2005. Disponível em: <http://bacuri.cpatu.embrapa.br/pimenta_do_reino/>. Acesso em: 20 jan. 2016.

FLEMING-JONES, M.; SMITH, R. Volatile organic compounds in foods: a five year study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Kansas, v. 51, n. 27, p. 8120–8127, Dec. 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr¼182.20>>. Acesso em: 26 mar. 2014.

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

GOULAS, A. E.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): biochemical and sensory attributes. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 287–296, 2007.

GROSSE, Y. et al. Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. **The Lancet Oncology**, London, v. 7, n. 8, p. 628–629, 2006.

GUAN, W. Q. et al. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. **Food Chemistry**, London, v. 101, p. 1558-1564, Apr. 2007.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 2, p. 142–150, Apr. 2009.

HALDANE, J. The red colour of salted meat. **The Journal of hygiene**. Oxford, v. 1, n. 1, p. 115-122, Jan. 1901.

HASAPIDOU, A.; SAVVAIDIS, I. The effects of modified atmosphere packaging, EDTA and oregano oil on the quality of chicken liver meat. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 1, p. 2751–2756, 2011.

HATAMI, T.; MEIRELES, M. A. A.; ZAHEDI, G. Mathematical modeling and genetic algorithm optimization of clove oil extraction with supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, Blacksburg, v. 51, n. 3, p. 331-338, Jan. 2010.

HATHEWAY, C. L. Toxigenic clostridia. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 3, p. 66–98, 1990.

HOLM, Y. Bioactivity of basil. Basil: the genus *Ocimum*. Medicinal and aromatic plants industrial profiles. **Harwood Academic Publishers**, Amsterdam, v. 10, p. 113-135, 1999.

HONIKEL, K. O. Curing agents. In: **ENCYCLOPEDIA of meat sciences**. Oxford: Elsevier, 2004. p. 195–201.

HORWATH, A. B. et al. Chemical characterization of wild populations of Thymus from different climatic regions in southeast Spain. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 36, p.117-133, 2008.

HUDABERDI, M. Pan introduction of *Origanum vulgare* L. (Sp. Pl.) of Xinjiang. In: _____. **Flora Xinjiangensis**. Xinjiang: Xinjiang Science & Technology Publishing House Public, 2004. t. 4, p. 333-335.

- ISMAN, B. M. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, p. 603–608, 2000.
- JAYASENA, D. D.; JO, C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: a review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 34, n. 2, p. 96–108, 2013.
- JAVANMARDI, J. et al. Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. **Food Chemistry**, London, v. 50, p. 5878–5883, 2002.
- JIM, Z.; SHA, W. The karyo type study on *Isodon japonica* var. *glauco* calyx and *Leonurus japonicus*. **Guangxi Sciences**, Oxford, n. 1, v. 11, p. 78-80, 2004.
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 10, p. 813–829, 2003.
- KARABAGIAS, I.; BADEKA, A.; KONTOMINAS, M. G. Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. **Meat Science**, Barking, v. 88, p. 109–116, 2011.
- LEE, S. T. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 1, p. 131-137, May 2005.
- LINDSTRÖM, M.; KIVINIEMI, K.; KORKEAL, A. H. Hazard and control of group II (non-proteolytic) *Clostridium botulinum* in modern food processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 92-104, Apr. 2006.
- LIU, D. C. et al. Effect of various levels of rosemary or Chinese mahogany on the quality of fresh chicken sausage during refrigerated storage. **Food Chemistry**, London, v. 117, n. 1, p. 106-113, Nov. 2013.
- MANUAL de plantas. 2005. Disponível em: <<http://www.mobot.org/manual.plantas/lista.html>>. Acesso em: 20 jan. 2016.
- MARTINS, E. M. F. et al. Products of vegetable origin: a new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, Barking, v. 51, p. 764–770, 2013.

MEMBRÉ, J.; KAN-KING-YU, D.; BLACKBURN, C. Use of sensitivity analysis to aid interpretation of a probabilistic *Bacillus cereus* spor lag time model applied to heat-treated chilled foods (REPFEDs). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 128, n. 1, p. 28-33, 2008.

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

MENON, K. V.; GARG, S. R. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. **Food Microbiology**, London, v. 18, p. 647–650, 2001.

MISHRA, R. K.; SINGH, S. K. Safety assessment of *Syzygium aromaticum* flower bud (clove) extract with respect to testicular function in mice. **Food Chemistry**, London, v. 46, p. 3333–3338, 2008.

NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

NEZHADALI, A. et al. Comparison of volatile organic compounds of *Thymus vulgaris* using hydrodistillation and headspace solid phase microextraction gas chromatography mass spectrometry. **Journal of the Chinese Chemical Society**, Peiping, v. 57, p. 40–43, 2010.

NICKAVAR, B.; MOJAB, F.; DOLAT-ABADI R. Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. **Food Chemistry**, London, v. 90, p. 609-611, 2005.

OLGUÍN-ARANEDA, V. et al. Recent advances in germination of *Clostridium* spores. **Research in Microbiology**, Paris, v. 66, n. 4, p. 236-243, 2015.

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

OLIVO, R. **O mundo do frango**: cadeia produtiva da carne de frango. Criciúma: Ed. do autor, 2006.

- OORAIKUL, B. Modified atmosphere packaging (MAP). In: ZEUTHEN, P.; BØGH-SØRENSEN, L. **Food preservation techniques**. Boca Raton: Woodhead Publishing Limited/CRC, 2003. Chap. 17.
- ORDÓÑEZ, J. A. (Org.). **Tecnología de alimentos**. Tradução de Fátima Murad. Porto Alegre: Artimed, 2005. v. 2.
- OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, p. 414-420, 2006.
- OZBEK, T. et al. Investigation of the antimutagenic potentials of the methanol extract of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* in the Eastern Anatolia Region of Turkey. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 32, p. 271–276, 2008.
- PARDI, M. C. et al. Intoxicações alimentares por microorganismos. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**, Goiânia, v. 1, p. 624, 2006.
- PAREDES-SABJA, D. et al. *Clostridium perfringens* spore germination: characterization of germinants and their receptors. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 4, p. 1190-1201, Feb. 2008.
- PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the Genus Piper. **Phytochemistry**, New York, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.
- PATON, A.; HARLEY, R. M.; HARLEY, M. M. *Ocimum*: an overview of classification and relationship. In: HOLM, Y.; HILTUNEN, R. (Ed.). **Ocimum: medicinal and aromatic plants: industrial profiles**. Amsterdam: Hardman, 1999. p. 1-38.
- PEGG, R. B.; SHAHID, F. **Nitrite curing of meat: the n-nitrosamine problem and nitrite alternatives**. 3rd ed. Trumbull: Food e Nutrition, 2000. 280 p.
- RAJKOVIC, A. et al. Prevalence and characterization of *Bacillus cereus* in vacuum packed potato puree. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 41, n. 8, p. 878-884, 2006.
- RHAYOUR, K. T. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 15, p. 356–362, 2003.

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.

RYBKA-RODGERS, S. Improvement of food safety design of cook-chill foods. **Food Research International**, Barking, v. 34, n. 5, p. 449-455, 2001.

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

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M. Patógenos emergentes relacionados à contaminação de alimentos de origem animal. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 123-127, jul./dez. 2002.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 4, p. 621-632, Aug. 2005.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. et al. Effect of Hydroxypropylmethylcellulose and Chitosan Coatings with and Without Bergamot essential oil on quality and safety of Cold-Stored grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 57-63, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. p. 387-415.

SIMON, J. A. et al. A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. In: JANICK, J. (Ed.). **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS, 1999. p. 499–505.

SOBEL, J. Botulism. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 41, n. 1, p. 1167–1173, 2005.

SOLOMAKOS, N. et al. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. **Meat Science**, Barking, v. 80, p. 159–166, 2008.

TAINTER, D. R.; GRENIS, A. T. **Spices and seasonings**. 2nd ed. New York: Wiley – VHC, 2001.

TEPE, B. et al. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (montbret et aucher ex benth) and *Salvia multicaulis* (vahl). **Food Chemistry**, London, v. 84, p. 519-525, 2004.

TIPSRISUKOND, N.; FERNANDO, L. N.; CLARKE, A. D. Antioxidant effects of essential oil and oleoresin of black pepper from supercritical carbon dioxide extractions in ground pork. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, p. 4329–4333, 1998.

TOMPKIN, R. B. Microbiology of ready-to-eat and poultry products. In: PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. (Ed.). **Advances in meat research**. Westport: AVI, 1986. v. 2, p. 89-121.

TOMPKIN, R. B. Nitrite. In: _____. **Antimicrobials in food**. 3rd ed. Boca Raton: Taylor and Francis, 2005. p. 169–236.

TSENG, C. K. et al. An outbreak of foodborne botulism in Taiwan. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 212, n. 1, p. 82-86, 2009.

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

TURGIS, M. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. **Food Control**, Guilford, v. 20, p. 1073–1079, 2009.

WOODS, L. F. J.; WOOD, J. M.; GIBBS, P. A. Nitrite. In: GOULD, G. W. (Ed.). **Mechanisms of action of food preservation procedures**. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 225-246.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ingested nitrates and nitrites, and cyanobacterial peptide toxins**. Lyon, 2006. v. 94.

ZHOU, G. H.; XU, X. L.; LIU, Y. Preservation technologies for fresh meat – a review. **Meat Science**, Barking, v. 86, p. 119–128, 2010.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO 1

Controle de *Clostridium sporogenes* inoculados em fiambre de peito de frango por misturas de óleos essenciais

RESUMO

Objetivou-se neste estudo determinar a concentração mínima bactericida (CMB) de diferentes óleos essenciais e suas combinações sobre *C. sporogenes*; identificar e quantificar componentes químicos dos óleos essenciais de orégano, noz moscada, pimenta chinesa, pimenta preta, manjerição, limão, cravo da Índia e tomilho; elaborar fiambre de peito de frango com redução de nitrito de sódio e adição de óleos essenciais, analisando o crescimento e células viáveis e esporulação de *C. sporogenes*, bem como caracterizar o produto através de análises físico-químicas de pH, atividade de água, cor objetiva, nitrito residual e oxidação lipídica. Os óleos essenciais de orégano, manjerição e pimenta preta apresentaram CMB 0,2%, enquanto a CMB dos óleos de pimenta chinesa, cravo da Índia e tomilho foi 0,5%; os óleos essenciais de noz moscada e limão apresentaram maior CMB, sendo esta de 1%. O carvacrol foi o composto majoritário encontrado no óleo de orégano; o alfa pineno no óleo de noz moscada; geranial e neral no óleo de pimenta chinesa; eugenol no óleo de cravo da Índia, metil chavicol no manjerição, E-cariofileno na pimenta preta, limoneno no óleo de limão e timol no tomilho. Foram utilizadas duas combinações de óleos essenciais, baseadas nas CMB's encontradas para elaborar o fiambre de peito de frango, e dois tratamentos contendo apenas nitrito de sódio. Tratamento1: 150 ppm de nitrito; Tratamento2: 75 ppm de nitrito; Tratamento3: 75 ppm + óleos essenciais de orégano (0,082%), Litsea (0,082%), noz moscada (0,027%) e cravo da Índia (0,027%); Tratamento4: 75 ppm de nitrito + óleos essenciais de manjerição (0,054%), pimenta preta (0,054%), limão (0,054%), e tomilho (0,110%). Os tratamentos contendo óleos essenciais foram mais eficientes na redução de células vegetativas quando as amostras de fiambre de peito de frango foram estocadas em temperatura de 7°C. As combinações de óleos utilizadas apresentaram ação contra a esporulação das células vegetativas. De modo geral, os tratamentos contendo óleos essenciais não se diferenciaram dos demais tratamentos nas análises físico químicas, ou seja, a adição dos óleos no fiambre de peito de frango não descaracterizou o

produto em relação a cor, pH e A_w , oxidação lipídica e nitrito residual. Sendo assim, a adição de óleos essenciais é uma alternativa promissora para aplicação conservante em produtos cárneos curados.

Palavras-chave: *C. sporogenes*. Aditivo alimentar. Óleos essenciais.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the minimum bactericidal concentration (CMB) of different essential oils and combinations of *C. sporogenes*; identify and quantify chemical components of the essential oils of oregano, nutmeg, Chinese pepper, black pepper, basil, lemon, clove and thyme; preparing ham chicken breast reduction of sodium nitrite and adding essential oils, and analyzing viable cells growth and sporulation of *C. sporogenes*. And to characterize the product through physical-chemical analysis of pH, water activity, objective color, residual nitrite and lipid oxidation. The essential oils of oregano, basil and black pepper showed CMB 0.2%, while the CMB of Chinese chili oil, clove and thyme was 0.5%; essential oils from nutmeg and lime had greater CMB, which is 1%. The carvacrol was the major compound found in oil of oregano; Alpha pinene in nutmeg oil; geranial and neral in Chinese chili oil; eugenol in clove oil India, methyl chavicol in basil, E-caryophyllene black pepper, limonene in lemon oil and thymol in thyme. We used two combinations of essential oils based on the CMB's found to prepare the ham chicken breast, and two treatments containing only sodium nitrite. Treatment 1: 150 ppm nitrite; Tratamento2: 75 ppm nitrite; Treatment3: 75 ppm + essential oils of oregano (0.082%), Litsea (0.082%), nutmeg (0.027%) and clove (0.027%); Treatment4: 75 ppm nitrite + essential oils of basil (0.054%), black pepper (0.054 %%), lemon (0.054%) and thyme (0.110%). Treatments containing essential oils were more effective in the reduction of vegetative cells when samples of chicken breast ham were stored at a temperature of 7 ° C. The combinations of oils used showed action against sporulation of vegetative cells. In general treatments containing essential oils were not different from the other treatments in the physicochemical analyzes, or the addition of oils chicken breast ham not misread the product with respect to color, pH and Aw, lipid oxidation and residual nitrite. Thus, the addition of essential oils is a promising alternative preservative for use in cured meat products.

Keywords: *C. sporogenes*. food additive. Essential oils.

1 INTRODUÇÃO

Clostridium é um gênero de bactéria em forma de bastonete, Gram-positiva anaeróbia, formadora de endósporos, que inclui mais de 150 espécies. Estas bactérias são amplamente distribuídas no ambiente e nas regiões anaeróbias do intestino de diversos animais, onde são normalmente encontrados na forma de endósporos, resistentes a estresses físicos e químicos e podem persistir por longos períodos de tempo, até que condições favoráveis permitam sua germinação (JOHNSON, 2008; POPOFF, 2013). Em condições ambientais adequadas, tais como atividade de água, nutrientes e anaerobiose, os endósporos germinam, seguido pela multiplicação das células vegetativas.

As espécies de *Clostridium botulinum* dividem-se em quatro grupos fisiologicamente e filogeneticamente distintos, classificadas em conjunto devido à sua capacidade em produzir a neurotoxina botulínica, potencialmente letal que, quando ingerida, pode causar uma doença grave e levar a morte (PECK et al., 2011). As toxina A, B, E e F, causam botulismo humano, enquanto que os tipos de toxinas C e D são os principais responsáveis pelo botulismo em animais (SCHIAVO et al., 2000). Sua capacidade de produzir a toxina mais potente, a neurotoxina botulínica (NB), em produtos alimentares faz deste patógeno, uma das principais preocupações de segurança alimentar. Dada a gravidade da toxinose, um esforço considerável é gasto no estudo deste microrganismo, visando evitar seu crescimento em alimentos (PECK, STRINGER, 2005; PECK et al, 2008). No entanto, trabalhar com *C. botulinum* em laboratórios exige muito cuidado, e muitas vezes, torna-se inviável.

Ao contrário de *C. botulinum*, *Clostridium sporogenes* não é patogênico, estando comumente relacionado com a deterioração dos alimentos. Devido à sua semelhança genética e fisiológica com as espécies de *Clostridium botulinum* Grupo I (proteolítica), *C. sporogenes* é frequentemente utilizado como substituto

para aquele microrganismo em ensaios laboratoriais (OCIO et al., 1994; GUAN et al., 2003; MCGLYNN et al., 2003).

A maioria dos surtos envolvendo *C. botulinum* está associada a alimentos cárneos prontos para o consumo, sendo sua maior incidência em pratos a base de carne suína e de aves que sofreram abuso de temperatura (FARKAS, 2007).

O controle de *C. botulinum* em produtos cárneos se dá principalmente pela adição de nitrito. Trabalhos realizados com *C. botulinum* Tipo A e com *Clostridium sporogenes* mostraram que ambas as espécies obtém energia por fosforilação em nível de substrato pela reação fosforoclástica, sendo a atividade das enzimas ferro-enxofre ferredoxina e piruvato-ferredoxina oxireductase, inibidas pelo óxido nítrico produzido a partir de nitrito, resultando na rápida redução do ATP intracelular (CARPENTER et al., 1987; WOODS, WOOD, GIBBS, 1981).

Embora muito utilizado, há grande preocupação relacionada à adição do nitrito/e ou nitrato, nos alimentos cárneos, uma vez que o nitrito é convertido em ácido nitroso, o qual reage com aminoácidos da carne, originando as nitrosaminas, compostos com efeito tóxico, mutagênico, neuro e nefrotóxico e carcinogênico (FRANCIS, 2000; RYWOTYCKI, 2002).

Apesar dos conservantes químicos serem usados há anos, há muitas controvérsias quanto ao seu uso, uma vez que têm sido relacionados a doenças respiratórias, alergias e outros problemas de saúde (RYWOTYCK, 2002). Assim, buscam-se novas alternativas para o controle do crescimento microbiano nos alimentos.

Aditivos alternativos sugeridos para serem utilizados em produtos cárneos são os óleos essenciais, que são conhecidos por sua atividade antimicrobiana, antioxidante, aromatizantes, dentre outros (Jayasenaa; Jo, 2013). Os óleos essenciais de condimentos e especiarias se destacam, pois, além da

maioria ser considerado GRAS (*Generally Recognized as Safe*), a legislação brasileira os classifica como aromatizantes naturais, podendo ser usados em alimentos no Brasil (ANVISA, 2007).

Ainda buscando produtos saudáveis devido a tendência do mercado, a indústria de alimentos tem disponibilizado no mercado produtos diferenciados como o fiambre de frango, que tem surgido como alternativa de menor custo comercial ao de peito de peru. O fiambre de frango consiste em embutido cárneo com menos de 3% de gordura, feito com carne de peito de frango cozida e adicionada de outros ingredientes. Dentre eles, destaca-se o nitrito, que é responsável pela inibição da oxidação lipídica e desenvolvimento de ranço, pelo não aparecimento de odores desagradáveis e a manutenção da cor rosada do produto, além da inibição de *C. botulinum*. Dentro do contexto saudável, a utilização de óleos essenciais como conservante se destaca novamente.

Buscando o desenvolvimento de conservante à base de blends de óleos essenciais e nível reduzido de nitrito, com objetivo de aplicação em produto cárneo, este trabalho avaliou o efeito de blends de óleos essenciais e nitrito sobre *Clostridium sporogenes* inoculado em fiambre de peito de frango; bem como, avaliou as alterações físico-químicas no produto durante o tempo de meia vida.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo, padronização e manutenção do inóculo

A cepa utilizada neste trabalho foi *Clostridium sporogenes* ATCC 3584 cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

A cultura liofilizada foi reativada em Diferential Reinforced Clostridium Base Broth (DRCBB) suplementado com 0,5% de solução de sulfato de sódio (4%) e citrato férrico (7%), com incubação em anaerobiose a 37°C/48h. Após esse período a cultura foi centrifugada a 605 G-force (3000 rpm) por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o meio de congelamento (glicerol: 15 mL; peptona bacteriológica: 0,5 g; extrato de levedura: 0,3 g; NaCl: 0,5 g; água destilada: 100 mL) adicionado. As culturas estoques foram mantidas congeladas durante o período de execução do experimento.

Para a reativação das culturas estoque foi utilizado o meio DRCBB suplementado com 0,5% de solução de sulfato de sódio e citrato férrico, com incubação a 37°C/48h. Este processo foi realizado duas vezes consecutivas e a padronização do inóculo em 10^5 UFC/g foi realizada pela elaboração da curva de crescimento em meio DRCBB, acompanhando-se a absorbância (D.O. _{600nm}) e a contagem em placa utilizando-se ágar Base de Isolamento de *Clostridium* (40g de caseína; 5 g de extrato de levedura; 2 g de dextrose; 0,02g de púrpura de bromocresol; 5 g de fosfato de sódio 2,2 g de cloreto de sódio; 0,01 g de sulfato de magnésio; 20 g de ágar). As placas foram incubadas a 37°C/48h em anaerobiose.

2.2 Óleos essenciais e análise química

Os óleos essenciais foram adquiridos da empresa FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda. Foram utilizados os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*), pimenta chinesa (*Litsea cubeba*), noz moscada (*Myristica fragrans*), manjerição (*Ocimum basilicum*) cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*), pimenta preta (*Piper nigrum*) e limão (*Citrus aurantifolia*); escolhidos a partir de pré testes.

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

As análises qualitativas foram realizadas em Cromatógrafo Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com

intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições operacionais foram as mesmas empregadas nas análises por CG-DIC. Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à coinjeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007).

2.3 Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais

A determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB) foi realizada empregando-se a técnica de diluição em caldo (NCCLS, 2006) com modificações. Foi preparado o Caldo Reinforced *Clostridium* Base acrescido de 0,5% (v/v) de Tween 80 para a diluição dos óleos essenciais. Os óleos essenciais foram avaliados nas concentrações de 0; 0,2; 0,5; 1; 1,25; 1,50; 1,75; e 2,0 %. Alíquotas de 5 π L da cultura padronizada foram transferidas para os tubos de rosca, contendo 5 mL do caldo acrescidos das concentrações de óleos essenciais. Foram preparados controles positivos em tubos contendo Caldo Reinforced *Clostridium* Base acrescido de 0,5% (v/v) de Tween 80 e negativos, contendo o meio de cultura e clorofenicol 0,1% (m/v). Após a homogeneização, os tubos foram incubados a 37°C/24h em condições anaeróbicas, geradas pela adição de óleo mineral estéril. Após incubação, alíquotas de 1 mL do meio foram transferidas para placas de Petri e adicionado Agar Base *Clostridium*, empregando-se sobrecamada, e, incubadas a 37°C/48h em anaerobiose. Foram

consideradas CMB dos óleos essenciais aquelas onde não foi observado o crescimento em placas.

As análises foram realizadas em três repetições, com ensaios em triplicata.

2.4 Combinações entre óleos essenciais

Os óleos essenciais de orégano, tomilho, pimenta chinesa, noz moscada, manjeriço, cravo da Índia, pimenta preta e limão foram testados em dois experimentos, utilizando suas concentrações mínimas bactericidas (CMB), em combinações de quatro óleos. O primeiro experimento foi feito utilizando os óleos de orégano, pimenta chinesa, noz moscada e cravo da Índia; e o segundo usando os óleos de manjeriço, pimenta preta, limão e tomilho. Os experimentos foram definidos através de pré-testes, visando diminuir o impacto sensorial quando aplicados no produto cárneo. A Tabela 1 mostra as diferentes proporções de óleos essenciais que foram utilizadas em cada ensaio, para cada experimento separadamente. A mesma foi gerada utilizando delineamento DCCR no programa *Chemoface versão 1.5*, utilizando “*Experimental design*”, com variáveis +2 e -2 calculadas de acordo com a CMB.

Tabela 1 Proporções utilizadas nas combinações dos óleos essenciais para cada combinação separadamente

Ensaio	%A	%B	%C	%D
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	1
3	-1	-1	1	-1
4	-1	-1	1	1
5	-1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1
8	-1	1	1	1
9	1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1
11	1	-1	1	-1
12	1	-1	1	1
13	1	1	-1	-1
14	1	1	-1	1
15	1	1	1	-1
16	1	1	1	1
17	-2	0	0	0
18	2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0

As porcentagens são baseadas na CMB de cada óleo utilizado

Experimento 1: orégano (A), pimenta chinesa (B), noz moscada (C) e cravo da Índia (D); Experimento 2: manjerição (A), pimenta preta (B), limão (C) e tomilho (D)

Para avaliação do efeito antimicrobiano dos experimentos entre os óleos essenciais testados *in vitro*, foi utilizada a metodologia de Diluição em Caldo (NCCLS, 2006) com modificações. O experimento foi realizado em três repetições, com ensaios em triplicata, e as placas contendo Agar Base Clostridium incubadas em anaerobiose a 37°C/48h.

2.5 Elaboração do fiambre de peito de frango e inoculação

A formulação base utilizada na elaboração do fiambre de peito é descrita na Tabela 2.

Tabela 2 Formulação base utilizada para a elaboração do fiambre de peito de frango

Ingredientes	Quantidade (%)			
	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4
Peito de Frango	70	70	70	70
Água	23	23	23	23
Sal (Comercial)	2	2	2	2
Fécula de mandioca(Comercial)	2	2	2	2
Isolado Proteico de Soja (New Max)	1	1	1	1
Açúcar (Comercial)	0,5	0,5	0,5	0,5
Tripolisfosfato de sódio (New Max)	0,35	0,35	0,35	0,35
Carragenina (New Max)	0,3	0,3	0,3	0,3
Glutamato Monosódico (Ajinomoto)	0,2	0,2	0,2	0,2
Eritorbato de sódio (New Max)	0,05	0,05	0,05	0,05
Condimento California (Ibrac)	0,03	0,03	0,03	0,03
Corante Carmim (New Max)	0,01	0,01	0,01	0,01
Nitrito de Sódio P.A (Vetec)	0,015	0,0075	0,0075	0,0075
	Óleos Essenciais (%)			
Orégano	0	0	0,082	0
Pimenta chinesa	0	0	0,082	0
Noz moscada	0	0	0,027	0
Cravo da índia	0	0	0,027	0
Manjerição	0	0	0	0,054
Pimenta prta	0	0	0	0,054
Limão	0	0	0	0,054
Tomilho	0	0	0	0,11

As carnes de peito de frango foram moídas em discos de 35 mm (90%) e 4 mm (10%). A mistura foi feita manualmente durante 15 minutos, sendo adicionados os demais ingredientes.

A massa obtida foi embutida em tripas de poliamida, formando gomos de cerca de 500 g, que foram submetidos ao processo de cozimento térmico, com aumento gradativo da temperatura em banho-maria com a seguinte programação: 55°C/30 minutos; 65°C/30 minutos; 75°C/30 minutos; e 85°C/30 minutos (quando o centro da peça atinge a temperatura de 72°C). O fiambre de peito de frango foi arrefecido num banho de água fria durante 10 min e armazenado em temperaturas de 7°C e 14°C, durante 30 dias, para posterior caracterização.

Para cada tratamento foi produzido 1 Kg do fiambre de peito de frango, sendo embutido em tripas com aproximadamente 500 gramas cada.

As amostras foram inoculadas com *C. sporogenes* (10⁵ UFC/g), homogeneizadas e separadas em porções de 25g, posteriormente as embalagens foram seladas a vácuo e armazenadas a 7°C e 14°C durante 21 dias.

2.6 Enumeração de *Clostridium sporogenes*

As embalagens, contendo 25 gramas de fiambre foram abertas de forma asséptica e adicionadas de 225 mL de água peptonada 0,1% (m/v), homogeneizadas em Stomacher Metroterm® (490 golpes/min) por 2 min.

Para a quantificação de células vegetativas, imediatamente após homogeneização e realização das diluições, alíquotas de 1 mL das diluições adequadas foram plaqueadas em Ágar Base de Isolamento de *C. sporogenes* e incubadas em anaerobiose a 37 °C/48 h.

Os endósporos de *C. sporogenes* no fiambre foram quantificados. Após a homogeneização as amostras foram submetidas ao choque térmico, 75°C por

15 min., seguido de banho de gelo para inativação das células viáveis. Alíquotas de 0,1 mL, das diluições adequadas foram plaqueadas em ágar base de isolamento de *C. sporogenes*. As análises foram realizadas em triplicata e as placas incubadas a 37^oC/48 horas em condições de anaerobiose.

As contagens de células vegetativas e endósporos foram realizadas após 0, 7 e 21 dias de armazenamento a 7° e 14°C.

2.7 Análises físico-químicas dos Produtos

Foram realizadas análises físico-químicas para a caracterização do produto nos tempo 0 e 30 dias, sendo os fiambres conservados em 7°C, e 14°C.

2.7.1 Determinação do pH

Os valores de pH dos fiambres foram medidos através da inserção de eletrodo combinado, tipo penetração, acoplado a um potenciômetro.

2.7.2 Determinação da Atividade de Água (Aw)

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

2.7.3 Cor Objetiva

A avaliação objetiva da cor final dos produtos foi realizada com o uso de um colorímetro espectrofotométrico, seguindo as recomendações sugeridas por

RAMOS et al. (2009) para produtos curados. Para o cálculo dos índices de cor foi estabelecido o iluminante D65 com ângulo 10° e o sistema de cor CIELAB.

Os índices de cor L^* , a^* e b^* foram obtidos considerando-se o valor médio de três leituras, realizadas em diferentes pontos da fatia do fiambre.

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

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

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

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

2.7.4 Concentração Residual de Nitrito de Sódio (NaNO_2)

O teor residual de nitrito nos produtos elaborados foi quantificado segundo método oficial nº 973.31 da AOAC (1998).

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

Uma alíquota de 2,5 mL do filtrado foi adicionada de 2,5 mL de solução de sulfanilamida em ácido acético, em um frasco de 50 mL e homogeneizada. Após cinco minutos, adicionou-se 2,5 mL do reagente NED. A solução foi agitada e mantida em repouso durante 15 minutos para desenvolvimento da cor, sendo a absorbância lida a 540 nm.

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

2.7.5 Oxidação lipídica (índice de TBARS)

A análise de índice de TBARS foi realizada segundo metodologia descrita por RAHARJO *et al.* (1992), com pequenas modificações. Cerca de 10 g de amostra foram pesadas, misturadas a 40 mL de ácido tricloroacético 5% (TCA) e 1 mL de BHT (10 µg.BHT.g⁻¹ de lipídeo) e a solução filtrada em papel de filtro. O filtrado foi acrescentado de 0,08 M de TBA e aquecido em banho-maria fervente por 5 minutos. Depois de frio à temperatura ambiente, uma alíquota foi retirada para leitura da absorbância a 532 nm.

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

2.8 Delineamento experimental e análise estatística

A análise da CMB e combinação dos OE foi submetida à análise dos componentes principais (PCA). Os dados foram pré-processados, pois estes sofreram autoescalamento, para um melhor ajuste dos dados antes das análises, utilizando então o software Chemoface (Versão 1.5).

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4x2x2 sendo quatro tratamentos de fiambre adicionado de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais em dois tempos de armazenamento, e duas temperaturas. Os resultados de enumeração de células vegetativas, esporos e análises físico-químicas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com o software SISVAR versão 5.6, sendo a comparação entre as médias estabelecidas pelo teste de Tukey, adotando o nível de 5% de significância.

As análises estatísticas DCCR para a combinação entre os óleos essenciais foram feitas utilizando o software Statistica 8.0 (STATSOFT,2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise química dos óleos essenciais e concentração mínima bactericida

A Tabela 3 mostra os três componentes majoritários dos óleos essenciais estudados e as concentrações mínimas bactericidas sobre *C. sporogenes*.

Tabela 3 Nome popular, composto químico e área normalização (%) e concentração mínima bactericida, CMB (%) sobre *Clostridium sporogenes* ATCC 3584 dos diferentes óleos essenciais

Óleo Essencial	Composto químico	Área (%)	CMB (%)
Orégano	Carvacrol	73,8	0,2
	<i>p</i> -Cimeno	4,41	
	<i>E</i> -Cariofileno	3,6	
Noz Moscada	α -Pineno	21,69	1,0
	Miristina	10,84	
	Silvestreno	6,01	
Pimenta Chinesa	Geranial	40,9	0,5
	Neral	31,34	
	Limoneno	13,45	
Cravo da Índia	Eugenol	83,52	0,5
	Acetato de Eugenila	9,7	
	<i>E</i> -Cariofileno	5,33	
Manjeriço	Metil Chavicol	86,74	0,2
	1,8-Cineol	3,53	
	α trans Bergamoteno	2,75	
Pimenta Preta	<i>E</i> -Cariofileno	27,82	0,2
	α -Copaene	3,53	
	δ -Elemeno	2,23	
Limão Taiti	Limoneno	58,09	1,0
	γ -Terpineno	14,05	
	β -pineno	11,62	
Tomilho	Timol	43,84	0,5
	0-Cimeno	29,41	
	γ -terpineno	6,5	

Os óleos essenciais que apresentaram as menores CMB, 0,2%, foram os de orégano, manjeriço e pimenta preta, enquanto que para os óleos de pimenta chinesa, cravo da Índia e tomilho a CMB foi de 0,5%. Os óleos essenciais de noz moscada e limão apresentaram as maiores CMB, sendo esta de 1%.

Carvacrol, presente no óleo de orégano está na categoria dos aditivos alimentares autorizados para adição direta na alimentação humana (FDA, CFSAN, 2013). As propriedades antimicrobianas do carvacrol contra microrganismos patogênicos e deteriorantes foram demonstradas anteriormente em vegetais de folhas verdes (MOORE-NEIBEL et al., 2012), peito de peru (OLADUNJOYE et al., 2013) e em tratamentos de lavagem para tomates e ovos (MATTSON et al., 2011; UPADHYAYA et al., 2013).

Os efeitos inibidores do carvacrol foram registados num certo número de estirpes de bactérias e fungos, incluindo *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica*, *C.botulinum*, *C. jejuni* e *C. albicans*. O timol, que tem uma estrutura semelhante à do carvacrol, diferindo apenas na posição do grupo hidroxilo no anel aromático, também tem se mostrado eficaz contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, *C. jejuni*, e *S. entérica* (COSENTINO et al., 1999, FRIEDMAN et al., 2002, NOSTRO et al., 2007 e RIVAS et al., 2010).

Em 2008, Hussain et al (2008) relatou que o óleo de manjeriço apresentou forte atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *B. subtilis*, mostrando zonas de inibição (22,2-24,4) mm, (20,4-26,1) mm, respectivamente. Recentemente, Hanif et al (2011) mostrou que o óleo de manjeriço exibiu uma forte atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, com um diâmetro de zona de inibição de cerca de 60 e 45 mm. No entanto, não teve ação sobre *Pseudomonas* sp.

Deans e Ritchie (1987) testaram *in vitro* a atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais contra mais de 25 microrganismos e o óleo essencial de cravo, contendo eugenol como composto majoritário, foi o que se mostrou mais eficaz. Alguns autores também demonstraram bons efeitos inibidores do cravo *in vitro* contra microrganismos, tais como *L. monocytogenes*, *E. coli*, *B. cereus*, *B. thermosphacta*, *P. fluorescens* e *S. aureus* (OUATTARA et al., 1997; DEL CAMPO et al., 2000; BURT, 2004).

Numerosos estudos anteriores demonstraram os efeitos antibacteriano de condimentos e seus óleos essenciais, bem como seus constituintes (timol, carvacrol, e eugenol) contra *C. perfringens* (DORMAN, DEANS, 2000 e MITSCH et al., 2004).

Geralmente, os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais. Os componentes abrangem dois grupos de origem biossintética distinta (BETTS, 2001; PICHERSKY et al., 2006). O principal grupo é composto de terpenos e terpenóides e outro de constituintes aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por baixo peso molecular.

Em particular, a ação antimicrobiana dos óleos essenciais foi atribuída aos seus compostos fenólicos e sua interação com as membranas das células microbianas. Os óleos essenciais permeiam a membrana citoplasmática e a desorganiza, causando o extravasamento do conteúdo citoplasmático e conduzindo assim à ruptura celular, no entanto, os mecanismos de ação dos óleos essenciais, ainda não foram totalmente elucidados (LAMBERT et al., 2001; BURT, 2004).

O timol é, estruturalmente, muito semelhante ao carvacrol. É isômero de posição, tendo o grupo hidroxila em um local diferente no anel fenólico (LAMBERT et al., 2001). Assim como os outros fenólicos, os mecanismos de ação desses compostos é caracterizado pela perturbação da membrana citoplasmática, interrompendo a força motriz de prótons, o fluxo de elétrons, o

transporte ativo e a coagulação do conteúdo das células bacterianas (SIKKEMA; DEBONT; POOLMAN, 1995). Em outras pesquisas foi demonstrado que o carvacrol interage com a membrana da célula, onde se dissolve na bicamada fosfolipídica, provocando distorção da estrutura física, causando sua expansão e desestabilização (ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2000).

O eugenol, constituinte principal do óleo de cravo da Índia age sobre uma membrana citoplasmática da célula, através de permeabilização não específica (GILL, HOLLEY, 2006). E também, podem inibir as funções das proteínas e enzimas. Estudos têm mostrado que o eugenol pode inibir a ATPase, amilase, protease, e histidina descarboxilase (THOROSKI, 1989; WENDAKOON, SAKAGUCHI, 1995; GILL, HOLLEY, 2006). O geranial, encontrado no óleo de pimenta chinesa tem sido relatado como um composto de elevada atividade antimicrobiana (PATTNAIK et al., 1997; VAN ZYL et al., 2006; DUARTE et al., 2007; JIROVETZ et al., 2007).

Pattnaik et al. (1997) avaliaram as propriedades antibacterianas dos constituintes aromáticos de óleos essenciais de *Ocimum basilicum* (linalol, 1,8 cineol, metil chavicol, eugenol e metil cinamato). Os resultados dos testes demonstraram que linalol foi o mais efetivo composto, inibindo 17 das 18 cepas bacterianas. Álcoois são conhecidos por possuir atividade bactericida, em vez de bacteriostática contra células vegetativas. O álcool terciário linalol é ativo contra microrganismos testados potencialmente, atuando tanto como agente de desnaturação protéica, como solvente desidratante (SUPPAKUL et al., 2002). No presente trabalho, o composto majoritário encontrado no óleo de manjeriço foi o metil chavicol, no entanto, estudos apontam que este composto apresenta baixa atividade antimicrobiana e compostos presentes em menor quantidade, como o linalol, apresentam melhor atividade antimicrobiana (KNOBLOCH et al. 1989).

O cariofileno, encontrado na pimenta preta, é um sesquiterpenóide de ocorrência comum em muitos óleos essenciais. Ocorre na natureza como mistura dos isômeros: isocariofileno, a-cariofileno (humuleno) e b-cariofileno. Os terpenos foram relatados por interromper ou penetrar as estruturas lipídicas das células (ZHOU, 2013). O óleo essencial de limão, que apresenta limoneno como composto majoritário, e, o óleo essencial de noz moscada (Alfa-pineno), os dois com CMB 1%, não apresenta ação expressiva contra bactérias, na maioria dos estudos disponíveis, no entanto, Castro (2011) relatou expressivo potencial antifúngico desses óleos.

3.2 Combinação entre óleos essenciais

Não foi possível ajustar um modelo estatístico e construir uma superfície de respostas para as combinações entre os óleos essenciais, devido ao R^2 ser baixo. A falta de ajuste do modelo ocorreu, provavelmente, devido às variações na contagem do microrganismo estudado entre os ensaios testados. No entanto, através das Tabelas 4 e 5 pode-se observar os valores dos coeficientes de regressão e os coeficientes de efeitos para os experimentos de combinações de óleos testados *in vitro*.

Tabela 4 Coeficientes de regressão e de estimativa de efeitos para a ação antimicrobiana *in vitro* do experimento 1 de óleos essenciais aplicadas sobre *C. sporogenes* ATCC 3584

Fontes de variação	Coef. Regressão	Estimativa de Efeitos	p-valor
Média/Interação	0,602	0,602	0,056
(1)%A(L)	-0,092	0,184	0,377
%A(Q)	0,286	0,572	0,02
(2)%B(L)	0,069	0,139	0,5
%B(Q)	0,289	0,579	0,018
(3)%C(L)	-0,054	0,108	0,599
%C(Q)	0,198	0,398	0,087
(4)%D(L)	-0,006	0,013	0,949
%D(Q)	0,095	0,191	0,387
1L 2L	-0,087	0,174	0,493
1L 3L	0,143	0,286	0,268
1L 4L	0,102	0,204	0,422
2L 3L	0,135	0,269	0,296
2L 4L	0,094	0,188	0,461
3L 4L	0,014	0,027	0,914
R ²	0,59		

Experimento 1: Orégano(A)/Pimenta chinesa(B)/Noz moscada(C)/Cravo da índia(D)

Na Tabela 4 observam-se valores em negrito, que são significativos ($p < 0,05$) para os óleos de orégano e de pimenta chinesa. Ou seja, quanto maior a quantidade desses óleos nos ensaios demonstrados na Tabela 1, maior foi a contagem do microrganismo estudado.

Embora o óleo de orégano tenha mostrado eficiência na inibição de diferentes microrganismos já estudados, os resultados variam de acordo com o microrganismo, origem de óleo essencial e técnica utilizada para verificação da atividade antimicrobiana (NOVAK et al, 2000; DUARTE et al., 2005; SOUZA et al., 2007; AFONSO et al., 2008). Assim como para o óleo de pimenta chinesa.

Uma hipótese para o resultado acima é o antagonismo, quando o efeito de um ou ambos os compostos é menor quando aplicados em conjunto (DAVIDSON; PARISH, 1989). Ou seja, os óleos aplicados individualmente

possuem CMB baixa, no entanto, quando aplicados neste experimento de combinações de óleos, o resultado não foi o esperado e os ensaios contendo maiores quantidades dos óleos de orégano e pimenta chinesa, não apresentaram atividade antimicrobiana eficiente.

Já na Tabela 5, observa-se o contrário. Nenhum valor de “p” foi significativo, assim, pode-se dizer que os óleos essenciais do experimento 2 apresentaram atividade antimicrobiana quando aplicados em conjunto. Quando o efeito das substâncias combinadas é maior do que a soma dos efeitos individuais, diz-se que houve sinergismo (DAVIDSON; PARISH, 1989). Assim pode-se afirmar que houve efeito antimicrobiano sinérgico sobre *C. sporogenes*; o sinergismo pode ocorrer entre as substâncias presentes em um único óleo essencial, tais como seus componentes principais, ou ocorrer entre uma mistura de óleos (HARRIS, 2002).

Tabela 5 Coeficientes de regressão e de estimativa de efeitos para a ação antimicrobiana *in vitro* do experimento 1 de óleos essenciais aplicadas sobre *C. sporogenes* ATCC 3584

Fontes de variação	Coef. Regressão	Estimativa de Efeitos	p-valor
Média/Interação	1,322	1,322	0
(1)%A(L)	-0,047	-0,095	0,31
%A(Q)	0,069	0,139	0,167
(2)%B(L)	-0,047	-0,094	0,316
%B(Q)	0,091	0,181	0,08
(3)%C(L)	-0,03	-0,061	0,509
%C(Q)	0,035	0,069	0,479
(4)%D(L)	-0,066	-0,013	0,168
%D(Q)	0,005	0,01	0,916
1L 2L	-0,064	-0,128	0,264
1L 3L	0,036	0,072	0,518
1L 4L	-0,06	-0,12	0,293
2L 3L	0,051	0,101	0,372
2L 4L	0,098	0,197	0,097
3L 4L	0,006	0,012	0,913
R ²	0,58		

Experimento 2: Manjeriçao(A)/ Pimenta Preta(B)/ Limão(C)/Tomilho(D)

3.3 Atividade antimicrobiana da combinação de óleos essenciais sobre células vegetativas de *C. sporogenes* inoculados em fiambre de peito de frango

O crescimento de *C. sporogenes* em fiambre de peito de frango adicionadas de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais, mantidas sob 7° e 14°C, foi acompanhado por 21 dias.

A contagem de células vegetativas foi afetada significativamente ($P < 0,05$) pelo tratamento, tempo e temperatura de estocagem (Tabela 6).

Tabela 6 Médias de Log UFC/g de células vegetativas de *Clostridium sporogenes* em fiambre de peito de frango após 0, 7 e 21 dias de armazenamento a 7 e 14°C

Tratamentos	Dias de armazenamento		
	0	7	21
7°C			
1	5,03 a	4,06 a	3,71 a
2	6,02 b	5,06 b	4,26 a
3	6,02 b	4,0 a	3,59 a
4	6,01 b	4,05 a	3,5 a
14°C			
1	5,03 A	4,56 A	3,96 A
2	6,02 B	5,55 B	4,66 B
3	6,02 B	4,51 A	3,84 A
4	6,01 B	4,49 A	3,74 A

Tratamento 1: 150 ppm de nitrito; Tratamento 2: 75 ppm de nitrito; Tratamento 3: 75 ppm + óleos essenciais de orégano (0,082%), Litsea (0,082%), noz moscada (0,027%) e cravo da índia (0,027%); Tratamento 4: 75 ppm de nitrito + óleos essenciais de manjeriço (0,054%), pimenta preta (0,054%), limão (0,054%), e tomilho (0,110%). Médias seguidas de letras diferentes em cada tempo e temperatura (linha e coluna) diferem ($P < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey

Na temperatura de 7°C, para o tratamento 1, observa-se redução gradativa de Log UFC/g durante o tempo de armazenamento, no entanto, a redução não foi significativa. O tratamento 2 apresentou contagens maiores em relação ao tratamento 1, 3 e 4, sendo estas contagens significativamente maiores no sétimo dia de análise. O tratamento 4 foi o que apresentou menor contagem de células para o último dia de análise (tempo 21), sendo esta redução de 2,51 Log UFC/g, significativa em relação ao tempo 0.

Na temperatura de 14°C, o tratamento 2 contendo 75 ppm de nitrito, apresentou maior contagem de células, sendo esta, significativa em relação aos demais tratamentos para todos os dias de análise. No tempo 0, os tratamentos contendo óleo essencial apresentaram contagem menor quando comparados aos mesmos tratamentos armazenados a 7°C. O tratamento 4 apresentou menor

contagem de células, assim como nas amostras a 7°C, no entanto, a redução de Log UFC/g foi baixa e não foi significativa no tempo de armazenamento. A análise de regressão aplicada para as temperaturas não se ajustou, provavelmente, devido às variações na contagem do microrganismo estudado, no entanto, nota-se que para a temperatura de 14°C, o tempo de armazenamento não influenciou significativamente na contagem de células vegetativas de *C. sporogenes*.

De maneira geral, o presente trabalho mostra que os tratamentos contendo óleo essencial se diferenciaram apenas do tratamento contendo 75 ppm de nitrito, sendo mais eficientes na redução de células vegetativas. No entanto, não se diferenciaram do tratamento com 150 ppm de nitrito. Os resultados mostram também que a redução de células foi maior quando as amostras de fiambre de peito de frango foram estocadas em temperatura de 7°C.

De acordo com Peck et al., (2006), a temperatura mínima do crescimento de *C. botulinum* proteolítico (toxina tipo A, B e F), assim como do *C. sporogenes* é entre 10 e 12 °C. No estudo relatado por Hinderink, Lindstrom e Korkeala (2009), a temperatura mínima de crescimento para o Grupo I (toxina tipo A, AB, B, e F) variou entre 12,8-16,5° C, e a temperatura máxima de crescimento entre 40,9-48,0 ° C. Assim, a uma temperatura menor do que 10°C, como a utilizada no experimento, a inibição do crescimento é mais eficiente.

Ambas as misturas de óleos essenciais promoveram a redução do crescimento de *C.sporogenes* nas amostras de fiambre, porém, não foram capazes de inibir completamente o crescimento da bactéria ou apresentar atividade bactericida. Mesmo não tendo ocorrido a inibição total do crescimento da bactéria ou sua morte, os resultados obtidos sugerem a possibilidade da utilização dos óleos essenciais para o controle desse microrganismo.

3.4 Atividade antimicrobiana da combinação de óleos essenciais sobre endósporos de *C. sporogenes* ATCC 3584 inoculados em fiambre de peito de frango

O crescimento de endósporos de *C. sporogenes* em fiambre de peito de frango adicionados de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais, mantidos sob 7° e 14°C, foi acompanhado por 21 dias.

No tempo 0 de análise não foi observada a presença de endósporos em nenhum tratamento, uma vez que foram inoculadas células vegetativas.

Os tratamentos contendo as combinações de óleos essenciais não apresentaram contagem de endósporos durante todo o experimento.

Oliveira et al. (2011) constataram grande aumento no número de esporos ao final do período de estocagem para todos os tratamentos avaliados, discordando do que foi encontrado no presente trabalho, já que apenas os tratamentos com nitrito apresentaram contagem de endósporos.

De acordo com Aleixo (2014), que testou combinações de óleos essenciais e compostos majoritários sobre endósporos de *C. botulinum*, todas as combinações apresentaram ação esporicida, assim como no presente trabalho.

A contagem de endósporos foi afetada significativamente ($P < 0,05$) pelo tratamento, tempo e temperatura de estocagem (Tabela7).

Tabela 7 Médias de Log UFC/g de endósporos de *Clostridium sporogenes* em fiambre de peito de frango após 7 e 21 dias de armazenamento a 7 e 14°C

Tratamentos	Dias de armazenamento		
	0	7	21
7°C			
1	0 a	2,44 b	3,37 b
2	0 a	3,6 b	4,41 c
3	0 a	0 a	0 a
4	0 a	0 a	0 a
14°C			
1	0 A	3,04 B	4,67 C
2	0 A	3,6 B	4,97 C
3	0 A	0 A	0 A
4	0 A	0 A	0 A

Tratamento 1: 150 ppm de nitrito; Tratamento 2: 75 ppm de nitrito; Tratamento 3: 75 ppm + óleos essenciais de orégano (0,082%), Litsea (0,082%), noz moscada (0,027%) e cravo da índia (0,027%); Tratamento 4: 75 ppm de nitrito + óleos essenciais de manjeriço (0,054%), pimenta preta (0,054%), limão (0,054%), e tomilho (0,110%). Médias seguidas de letras diferentes em cada tempo e temperatura (linha e coluna) diferem ($P < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey

Nas temperaturas de 7° e 14°C não houve diferença significativa para o tratamento 1, sendo este o que apresentou menor contagem de endósporos. O tratamento 2 apresentou maior contagem em relação ao tratamento 1, principalmente no tempo 21. Na temperatura de 14°C, no último dia de análise, os tratamentos não se diferenciaram de maneira significativa em relação à contagem.

Em geral, nota-se aumento da contagem com o tempo de armazenamento e com o aumento da temperatura de estocagem, principalmente para o tratamento com 75 ppm de nitrito (2). Na temperatura de 7°C, no tratamento 2, houve aumento de 0,81 Log UFC/g no tempo 21; e na temperatura de 14°C o aumento foi de 1,1 Log UFC/g.

De acordo com Mitchell (2001), a esporulação é iniciada em resposta a escassez de nutrientes, consequentemente aumenta com o tempo de estocagem;

outros fatores que podem alterar a esporulação são pH, oxigênio e temperatura. Em geral a esporulação é favorecida por condições que resultem em redução da taxa de crescimento.

3.5 Análise do pH e Aa

O pH e a Aa não sofreram alterações significativas ($P>0,05$), em relação aos diferentes tratamentos do fiambre e nem em relação às temperaturas de armazenamento (7° e 14°C). No entanto, houve diferença entre os dias de armazenamento, com diminuição significativa do pH no tempo 30, e aumento da atividade de água, como observado na Tabela 8.

Tabela 8 Valores de pH e Aa do fiambre adicionado de nitrito de sódio e óleos essenciais, armazenado a temperatura de 7° e 14°C , durante 30 dias

Dia	pH
0	6,5
30	5,74
Dia	Aa
0	0,978
30	0,98

A diminuição do pH durante o tempo de armazenamento do fiambre embalado a vácuo pode ser explicada pelo crescimento de bactérias lácticas psicrotróficas, que é favorecido pela sua tolerância ao sal. As bactérias lácticas causam deterioração nas carnes curadas embaladas a vácuo com consequente produção de gosto ácido, descoloração, ocorrência de limosidade, produção de gás e redução de pH (ZHANG; HOLLEY, 1999).

Espécies de *Clostridium*, geralmente associadas com produtos cárneos curados se desenvolvem em torno de 0,95 a 0,98 (FERRACCIOLI, 2012), que estão dentro dos valores encontrados.

A diminuição da Aa nos alimentos cárneos ocorre principalmente através da adição de soluto, como o sal. É utilizada nas indústrias, para a manutenção da qualidade do produto, promovendo melhor estabilidade de vida útil e controle microbiano (TROLLER, 1987).

3.6 Cor Objetiva

A luminosidade (L*) caracteriza o grau de claridade da cor, variando do preto ao branco, indo de 0 (escuro) a 100 (claro).

Não foram observados efeitos significativos ($P > 0,05$) entre tratamento e tempo, nem tratamento e temperatura. Entretanto, observou-se alteração representativa da interação entre tempo e temperatura de armazenamento, assim como, nos tratamentos individualmente, como observado nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 Valores de luminosidade (L*) em fiambre adicionado de diferentes combinações de óleos essenciais e nitrito armazenados a 7° e 14°C durante 30 dias

Tratamento	Valores de luminosidade L*
1	74,36 a
2	75,16 ab
3	75,64 ab
4	76,14 b

Tratamento 1: 150 ppm de nitrito; Tratamento 2: 75 ppm de nitrito; Tratamento 3: 75 ppm + óleos essenciais de orégano (0,082%), Litsea (0,082%), noz moscada (0,027%) e cravo da índia (0,027%); Tratamento 4: 75 ppm de nitrito + óleos essenciais de manjeriço (0,054%), pimenta preta (0,054%), limão (0,054%), e tomilho (0,110%)

A tabela mostra que houve um aumento significativo de L^* dos tratamentos 2, 3 e 4, em relação ao tratamento 1, contendo 150 ppm de nitrito. Os tratamentos 2, 3 foram iguais estatisticamente. E o tratamento 4 apresentou o maior valor para L^* . Os tratamentos contendo óleo essencial apresentaram maior L^* do que os tratamentos contendo apenas nitrito.

Tabela 10 Valores de L^* de fiambre adicionado de nitrito de sódio e óleos essenciais, armazenado a temperatura de 7° e 14° C, durante 30 dias

Dias	Temperaturas (°C)	
	7	14
0	74,52 aA	74,52 aA
30	75,32aA	76,95 bB

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, e pela mesma letra minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Nota-se na tabela que no tempo 0, os valores de L^* não sofreram influencia da temperatura. Já com 30 dias de armazenamento, a amostra de fiambre apresentou aumento significativo de L^* . Na temperatura de 14°C e tempo 30 dias, L^* apresentou maior valor.

Segundo Brewer et al. (2001), a luminosidade é o parâmetro que melhor informa a intensidade visual da cor rósea, sendo o parâmetro de cor que governa a qualidade da carne e produtos cárneos. No caso do experimento, pode-se dizer que com o aumento dos valores L^* , as amostras de fiambre apresentam-se mais claras, ou seja, com cor rósea menos intensa.

Já valores do parâmetro a^* representam a variação da intensidade da cor do verde ao vermelho, valores positivos de a^* ou a^+ de 0 até +50 representam a cor vermelha da amostra, enquanto valores negativos de a^* ou a^- de 0 até -50 representam a coloração verde do produto (FEINER, 2006).

O índice de vermelho (a^*) não foi afetado significativamente pela quantidade de nitrito e óleos essenciais adicionados ao fiambre, observando valores entre 7,35 e 7,98 nos tratamentos. Entretanto, houve interação significativa entre tempo e temperatura de armazenamento, como mostrado na Tabela 11.

Tabela 11 Valores de a^* de fiambre adicionado de nitrito de sódio e óleos essenciais, armazenado a temperatura de 7° e 14° C, durante 30 dias

Dias	Temperaturas (°C)	
	7	14
0	8,29 aA	8,3 aA
30	7,95 aA	5,81 bB

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Observando a Tabela 11, nota-se que no tempo 0 dias, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) em relação às temperaturas de armazenamento. Já no tempo de 30 dias, o valor de a^* reduziu quando armazenado a 14°C.

A velocidade da perda da cor vermelha é mais rápida em temperaturas elevadas. Níveis elevados de contaminação microbiológica, também favorecem a perda da cor, pois muitos dos subprodutos do metabolismo microbiano são agentes oxidantes. A pressão parcial de oxigênio na embalagem e a oxidação lipídica, também afetam a cor da carne, podendo causar a perda da cor vermelha (MACDOUGALL, 1994).

O índice de amarelo (b^*) representa tonalidades que vão do azul (valores negativos), ao amarelo (valores positivos).

Não houve diferença significativa para nenhuma interação testada. No entanto, os tratamentos e o tempo de armazenamento, observados individualmente, mostraram valores com alterações representativas.

O Tratamento 1, contendo 150 ppm de nitrito apresentou menor valor de b^* (10,36), no entanto, não houve diferença significativa ($P>0,05$) em relação ao tratamento contendo 75 ppm de nitrito (10,67), embora houve um aumento de b^* para este tratamento. Os tratamentos contendo óleos essenciais apresentam maiores valores de b^* , sendo de 10,8 para o Tratamento 4, e 13,96 para o Tratamento 3, que foi o maior valor encontrado, sendo diferente estatisticamente dos demais.

Segundo Cofrades et al. (2004) o comportamento de b^* depende sobretudo das características dos alimentos, e alterações de pH, oxidação, atividade de água, dentre outros fatores. Pode estar relacionado ainda, com a cor do óleo essencial adicionado ao produto.

Houve aumento de b^* com o tempo de armazenamento, sendo esse aumento significativo. No tempo 0 dias, b^* foi igual a 10,83, e no tempo de 30 dias, igual a 12,07. Assim como no trabalho de Pereira (2002), o aumento de b^* com o tempo, observado neste trabalho, indica que houve perda da cor vermelha do fiambre, sugerindo alterações físicas e microbiológicas, podendo também sugerir uma embalagem ineficiente.

O ângulo de tonalidade (h^*) é representado como a grandeza que caracteriza a qualidade da cor (vermelho, verde, amarelo, azul), permitindo diferenciá-la.

O h^* não foi afetado significativamente pela quantidade de nitrito e óleos essenciais adicionados ao fiambre, observando valores entre 53,9 e 59 nos tratamentos. Entretanto, houve interação significativa entre tempo e temperatura de armazenamento, como mostrado na Tabela 12.

Tabela 12 Valores de h^* de fiambre adicionado de nitrito de sódio e óleos essenciais, armazenado a temperatura de 7° e 14° C, durante 30 dias

Dias	Temperaturas (°C)	
	7	14
0	59,99 aA	54,99 aA
30	53,49 aA	62,31 bB

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, e pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Observando a Tabela 12, nota-se que no tempo 0, o índice h^* não sofreu alteração significativa quanto as diferentes temperaturas a que as amostras do fiambre foram submetidas. Já no tempo de 30 dias, h^* sofreu um aumento significativo. E quando observamos apenas as temperaturas de armazenamento, a tabela mostra que realmente, a mudança do índice h^* ocorreu a 14°C, no tempo 30 dias.

A tonalidade é expressa pelas cores primárias: vermelho, verde, amarelo e azul e é representada por duas retas perpendiculares entre si, que se cruzam no eixo de um círculo. Na reta vertical, estão o amarelo e o azul. Graficamente, a semi-reta que vai do centro até a extremidade do círculo, formando um ângulo de 90°, representa o amarelo e a semi-reta que vai do centro à extremidade do círculo, formando um ângulo de 270°, representa o azul. Os pigmentos vermelho, verde, amarelo e azul são definidos, respectivamente, pelas coordenadas $+a^*$, $-a^*$, $+b^*$ e $-b^*$ que variam de 0 a 60 sem unidade de medida (Figura 1).

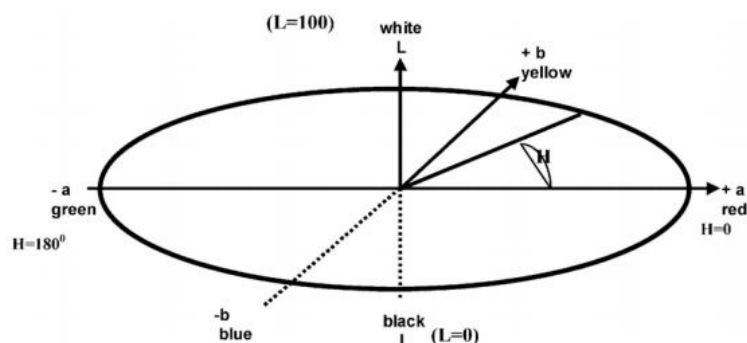


Figura 1 Sistema de coordenadas de cores CIELAB 1976 (Fonte: Star Color, 2004)

Durante o período de armazenamento e com o aumento da temperatura foi observado redução do índice de vermelho (a^*). Esta alteração é evidenciada pelo aumento do ângulo de tonalidade (h^*) do produto, indicando maior participação da tonalidade de amarelo.

O índice de saturação (C^*) corresponde à intensidade ou quantidade de uma tonalidade, indicando o nível de mistura com o branco, preto ou cinza.

As interações testadas não foram significativas. Já os tratamentos e os tempos de armazenamento observados individualmente, apresentaram valores com alterações representativas. O Tratamento 1, com valor igual a 12,96 apresentou valor igual, significativamente, ao Tratamento 2 (13,04) e ao Tratamento 4 (13,14). Já o Tratamento 3 se diferenciou, sendo o que apresentou maior valor, igual a 16,21.

Em relação ao tempo, o índice de saturação apresentou aumento significativo em 30 dias de estocagem, com valor igual a 14,76, sendo de 12,92 no tempo 0. Portanto, pode-se dizer que houve um aumento da participação da tonalidade amarelo, sendo confirmadas com os valores elevados de b^* e h^* .

Para valores de ΔE^* houve interação significativa ($p < 0,05$) entre tratamento e tempo de estocagem. Durante o tempo de armazenamento, no tempo 0, todos os tratamentos apresentaram diferença de cor pouco perceptível

ou percepção clara (ΔE^* entre 0,5 e 3,0) em relação ao controle, exceto o Tratamento 3, que apresentou percepção muito clara (Tabela 13). Para o tempo de 30 dias, o Tratamento 2 e 4 apresentaram valores de ΔE^* maiores, ou seja, a percepção de mudança de cor nesses tratamentos é maior. Segundo Ramos e Gomide (2007), diferenças globais (ΔE^*) menores que 3,0 não podem ser facilmente detectáveis ao olho humano.

Tabela 13 Diferença global de cor (ΔE^*) em fiambre adicionado de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais, armazenados a 7°C e 14°C durante 30 dias

Tratamento	Dias	
	0	30
1	1,59 aA	2,94 bB
2	2,04 aA	4,93 bC
3	4,52 aB	2,44 bB
4	2,5 aA	4,31 bC

Tratamento 1: 150 ppm de nitrito; Tratamento 2: 75 ppm de nitrito; Tratamento 3: 75 ppm + óleos essenciais de orégano (0,082%), Litsea (0,082%), noz moscada (0,027%) e cravo da Índia (0,027%); Tratamento 4: 75 ppm de nitrito + óleos essenciais de manjerição (0,054%), pimenta preta (0,054%), limão (0,054%), e tomilho (0,110%). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, e pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

A diferença de cor objetiva entre os tratamentos estocados a 7°C e 14°C pode ser observada na Figura 2.

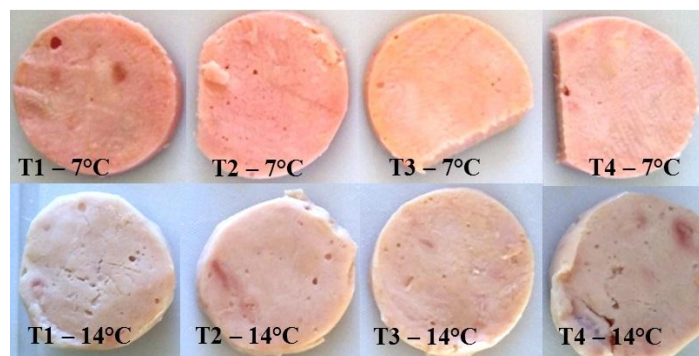


Figura 2 Mostra a diferença das amostras de fiambre no tempo 30 dias, armazenadas a temperaturas de 7°C e 14°C

3.7 Índice de TBAR

O índice de TBAR não foi afetado significativamente pela quantidade de nitrito e óleos essenciais adicionados ao fiambre e nem pelas temperaturas de armazenamento (7°C e 14°C), observando em todos os tratamentos, valores entre 0,26 e 0,29. Entretanto, houve diferença significativa entre os dias de armazenamento, sendo o maior valor encontrado no tempo de 30 dias, igual a 0,36 mgMA/Kg. No tempo 0 o valor encontrado foi 0,19 mgMA/Kg.

Pôde-se observar aumento significativo da oxidação lipídica para todos os tratamentos do fiambre adicionado de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais no tempo 30 dias.

A avaliação do índice de TBAR diz respeito ao grau de oxidação das amostras, que proporcionam sabor e odor característicos de ranço. O malonaldeído, corresponde a um aldeído de cadeia curta proveniente dos processos de decomposição de hidroperóxidos lipídicos, ou seja, produtos de oxidação (GORDON, 2001).

Provavelmente, não houve diferença representativa no grau de oxidação das amostras entre os tratamentos contendo apenas nitrito e os tratamentos

contendo óleos essenciais, pois a maioria dos óleos essenciais testados apresentaram propriedades antioxidantes em carnes e produtos cárneos, assim como propriedades antibacterianas (HASAPIDOU; SAVVAIDIS, 2011).

3.8 Nitrito residual

Foram observados efeitos significativos da interação entre os tratamentos e tempo de estocagem do fiambre para o nitrito residual, como apresentado na Tabela 14.

Tabela 14 Nitrito residual (mg/Kg) em fiambre adicionado de nitrito e diferentes combinações de óleos essenciais, armazenados a 7°C e 14°C durante 30 dias

Tratamento	Dias	
	0	30
1	95,25 aA	14,26 bB
2	45,38 aB	8,62 bB
3	55,45 aB	10,82 b B
4	49,39 aB	13,98b B

Tratamento 1: 150 ppm de nitrito; Tratamento 2: 75 ppm de nitrito; Tratamento 3: 75 ppm + óleos essenciais de orégano (0,082%), Litsea (0,082%), noz moscada (0,027%) e cravo da índia (0,027%); Tratamento 4: 75 ppm de nitrito + óleos essenciais de manjeriço (0,054%), pimenta preta (0,054%), limão (0,054%), e tomilho (0,110%). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, e pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Houve uma redução gradativa e significativa do nitrito residual com o período de armazenamento em todos os tratamentos do fiambre. Já quando observamos em relação aos tratamentos no tempo 0, o tratamento 1, contendo 150 ppm de nitrito, apresentou uma quantidade maior de nitrito residual que foi representativa quando comparada aos demais tratamentos. E quando observamos

no tempo 30, os tratamentos não se diferenciaram de maneira significativa entre si.

Até o tempo de 30 dias, os tratamentos contendo óleo essencial e o tratamento contendo 150 ppm de nitrito mantiveram quantidade de nitrito residual acima de 10mg/Kg. Apenas o tratamento 2 que não. Para que o controle de várias bactérias ocorra, alguns autores consideram necessários aproximadamente 10 mg/kg de nitrito residual no produto final e afirmam que valores de adição inferiores a 150 mg/kg são insuficientes para se alcançar este nível residual (CASSENS, 1997). É o que ocorreu no tratamento 2, com a quantidade de nitrito adicionado reduzido pela metade.

A ação do nitrito em carnes curadas é uma mistura extremamente complexa de reações químicas interativas que envolvem vários reagentes diferentes. O nitrito é um composto altamente reativo que pode funcionar como oxidante ou como agente de redução e pode ser convertido a grande variedade de compostos relacionados em carne, incluindo o ácido nitroso, óxido nítrico e nitrato (HONIKEL, 2004).

4 CONCLUSÕES

Os óleos de orégano, manjeriço e pimenta preta apresentaram CMB 0,2%; os de pimenta chinesa, cravo da Índia e tomilho 0,5%; e os óleos de limão taiti e noz moscada 1%;

O carvacrol foi o composto majoritário encontrado no óleo de orégano, o α -Pineno no óleo de noz moscada, o geraniol e neral para pimenta chinesa, o eugenol no cravo da Índia, o metil chavicol para o manjeriço, o E-cariofeno para pimenta preta, limoneno no limão taiti e timol no óleo de tomilho.

Os tratamentos adicionados de óleos essenciais foram mais eficientes na redução de células vegetativas, assim é possível dizer que a redução do nitrito de sódio e a adição de óleos essenciais possui potencial ação conservante;

A redução de células vegetativas foi maior quando as amostras de fiambre de peito de frango foram estocadas em temperaturas de 7°C. Quando a temperatura de estocagem aumenta, chegando próximo à temperatura ótima de crescimento do microrganismo, o ambiente torna-se favorável para o seu desenvolvimento, assim, o número de células aumenta;

O Tratamento 4: 75 ppm de nitrito + óleos essenciais de manjeriço (0,054%), pimenta preta (0,054%), limão (0,054%), e tomilho (0,110%) foi o mais eficiente, apresentando maior redução de células vegetativas com o tempo de armazenamento para as duas temperaturas analisadas;

As combinações de óleos utilizadas evitaram a formação de endósporos;

A utilização de óleos essenciais não promoveu alterações representativas na cor objetiva do fiambre de peito de frango;

Houve redução do pH, aumento da atividade de água e aumento da oxidação lipídica com o tempo de estocagem, não sendo esses parâmetros influenciados pela adição de óleos essenciais.

Houve redução significativa na quantidade de nitrito residual durante o tempo de armazenamento, no entanto, os Tratamentos contendo óleos essenciais apresentaram valor acima de 10 mg/Kg, necessários para ação antibacteriana do nitrito.

Enfim, a utilização de óleos essenciais como conservantes naturais em embutidos cárneos cozidos, pode ser considerada uma alternativa promissora para a indústria de alimentos, já que os Tratamentos com óleos essenciais apresentaram ação contra *C. sporogenes*, e não alteraram o produto, em relação à maioria das análises físico-químicas realizadas.

REFERÊNCIAS

ALEIXO, C. G. et al. **Efeito dos óleos essenciais e compostos majoritários sobre endósporos de *Clostridium botulinum* inoculados em mortadela** 2014. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. **Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes.**

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

ARAÚJO, S. F. Uma revisão sobre a toxina botulínica. Disponível em: . Acesso em: 6 dez. 2015.

BERZAGHI, P. et al. Near-infrared reflectance spectroscopy as a method to predict chemical composition of breast meat and discriminate between different n-3 feeding sources. **Poultry Science**, v.84, p. 128–136, 2005.

BETTS, T. J. Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. **Journal of Chromatography**, 936, p.3346, 2001.

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

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

CASSENS, R.G. Nitrite-cured meat. **Food and Nutrition Press**, Inc, Trumbull, CT 1997.

CASTRO R. D, LIMA E. O. Screening da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, v.11, n.3, p.341-345, João Pessoa, 2011.

CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2.ed. Campinas: Editora UNICAMP, 2003. 207p.

COFRADES, S. et al. Restructured beef with different proportions of walnut as affected by meat particle size. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 218, n. 3, p. 230-236, Dec. 2004.

COSENTINO, S. et al.; *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, n.2, p.130-135, 1999.

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

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

DEL CAMPO, J.; Amiot, M.J.; Nguyen, C. The Antimicrobial effect of rosemary extracts. **Journal of Food Protection**, v.63, p.1359-1368, 2000.

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

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

DUARTE, M.C.T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.197-201, 2007.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; GARCIA, V.L.; DELARMELENA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.305-311, 2005.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010.

FDA, 2014. **US Food and Drug Administration** (accessed on 26 03 2014). <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.20>.

FDA, CFSAN. US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Everything Added to Food in United States (EAFUS) – Carvacrol**, 2013.

FEINER, G. Meat products handbook practical science and technology. 2nd ed. Boca Raton: CRC, 2006. 627 p.

FERRACIOLI, V. R. **Avaliação da qualidade de salsichas do tipo “hot dog” durante o armazenamento**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Tecnologia Mauá, Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, SP, 2012.

FERREIRA, W.; SOUSA, J. Microbiologia. Lidel. Lisboa, 1998.

FLEMING-JONES, M.; SMITH, R. Volatile organic compounds in foods: a five year study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Kansas, v.51, n.27, p.8120–8127, Dec.2003.

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

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; MANDRELL, R.E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella entérica*. **Journal of Food Protection**, v.65, n.10, p.1545-1560, 2002.

GORDON, M. H. The development of oxidative rancidity in foods. In: POKORNY, J., et al. **Antioxidants in Food: Practical Applications**. Inglaterra: Woodhead Publishing, p. 7- 21, 2001.

GUAN D, GRAY P, KANG D-H, TANG J, SHAFER B, ITO K, YOUNCE F, YANG TCS. Microbiological validation of microwave-circulated water combination heating technology by inoculated pack studies. **Journal of Food Science**, v. 68, p.1428–32, 2003.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, Ireland, v.26, n.2, p.142–150, Apr. 2009.

HANIF,M.A.;AL-MASKARI,M.Y.;AL-MASKARI,A.;AL-SHUKAILI,A.;AL MASKARI,A.Y.; AL-SABAHI,J.N. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of unexplored Omani basil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.5, p.751-757, 2011.

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

HASAPIDOU, A. AND SAVVAIDIS, I.N. The effects of modified atmosphere packaging, EDTA and oregano oil on the quality of chicken liver meat. **Food Research International**, v.44, p. 2751-2756, 2011.

HINDERINK,K; LINDSTROM, M; KORKEALA, H. Group I *Clostridium botulinum* strains show significant variation in growth at low and high temperatures. **Journal of Food Protection**, v.72, p. 375-383, 2009.

HOLLEY, R.A.; GILL, C.O. **Usos da embalagem em atmosfera modificada para carnes e produtos cárneos**. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES. São Pedro, 2005.

HONIKEL, K.O. Curing agents. **Encyclopedia of meat sciences**, Elsevier Ltd, Oxford, UK , p. 195–201, 2004.

HSIEH, P. C.; MAU, J. L.; HUANG, S. H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. **Food Microbiology**, Taiwan, v.18, n.1, p.35-43, Feb.2001.

HUSSAIN, A.I.; ANWAR,F.; SHERAZI, S.T.H.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v.108, p.986-995, 2008.

JAHAN,K.; PATERSON,A.; SPICKETT, C.M. Fatty acid composition, antioxidants and lipid oxidation in chicken breasts from different production regimes. **International Journal of Food Science and Technology**, n.39, p. 443–453, 2004.

JIROVETZ, L. et al. Purity, antimicrobial activities and olfactic evaluations of geraniol/nerol and various of their derivatives. **Journal of Essential Oil Research**, v.19, n.3, p.288-91, 2007.

JOHNSON,E.A.; MONTECUCCO, C. *Handbook of Clinical Neurology*. v. 91, p. 333–368 (ed. Engel, A. G.), 2008.

KNOBLOCH, K. et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v.1, n.1, p.119-28, 1989.

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

MACDOUGALL, D.B., **Colour meat** – its basis and importance. In Pearson, A.M. & DUTSON. T.R. (ed) – Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish product – Advances in meat research series, v.9, n.2, p. 34 –78, 1994.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n° 20, de 31 de julho de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Fiambre. Brasília, 2000.

MATTSON,T.E. et al.; **Inactivation of *Salmonella* spp. on tomatoes by plant molecules**. International Journal of Food Microbiology, v.144, n.1, p.464-468, 2011.

MCCLURE,B.N. et al. The effects of lactate on nitrosylmyoglobin formation from nitrite and metmyoglobin in a cured meat system. **Food Chemistry**, New Zealand, v.129, n.3, p. 1072-1079, Dec. 2011.

MCGLYNN WG, DAVIS DR, JOHNSON MG, CRANDALL PG. Modified spore inoculation method for thermal-process verification of pinto beans and green beans canned in two large reusable containers. **Journal of Food Science**, v.68, p.988–91, 2003.

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

MITSCH,P.; Zitterl-eglseer, K.; Kohler, B.; Gabler,C.; Losa,R.; Zimpernik, I. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. **Poultry Science**, v.83, p.669-675, 2004.

MOORE-NEIBEL, K. et al.; Antimicrobial activity of lemongrass oil against *Salmonella enterica* on organic leafy greens. **Journal of Applied Microbiology**, v.112, n.1, p.485-492, 2012.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 2006.
NOSTRO, A et al.; Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, n.4, p.519-523, 2007.

NOVAK, J.; CHRISTINA,B.; LANGBEHN,B.; PARK,F.; SKOULA,M.; GORSIOU,Y.; FRANZ,C.M. Ratios of cis –and- trans- sabinete hydrate in *Origanum marjorana* L. and *Origanum midrophyllum* (Bentham). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.28, p.697-704, 2000.

OCIO MJ, SANCHEZ T, FERN ´ ANDEZ PS, RODRIGO M, MARTINEZ A. Thermal resistance characteristics of PA 3679 in the temperature range of 110–121°C as affected by pH, type of acidulant and substrate. **International Journal of Food Microbiology**, v.22, p. 239–47, 1994.

OLADUNJOYE, A. Synergistic activity between lauric arginate and carvacrol in reducing *Salmonella* in ground turkey. **Poultry Science**, v.92, n.5, p.1357-1365, 2013.

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

OLIVEIRA,C,E.V.; STAMFORD,T.L.M.; GOMES NETO,N.J.;SOUZA,E.L. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, p. 308-311, 2010.

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

PANDIT V.A., SHELEF L.A., Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Food Microbiol.**, v. 11, p. 57–63, 1994.

PATTNAIK, S. et al. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios**, v.89, n.358, p.39-46, 1997.

PECK, M.W, GOODBURN,K.E, BETTS,R.P, STRINGER,S.C. *Clostridium botulinum* in vacuum packed (VP) and modified atmosphere packed (MAP) chilled foods. **Institute of Food Research**, 2006.

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

PECK,M.W, et al. Assessment of the potential for growth and neurotoxin formation by non-proteolytic *Clostridium botulinum* in short shelf-life commercial foods designed to be stored chilled. **Trends in Food Science and Technology**, v.19, p. 207–216, 2008.

PECK,M.W.; STRINGER, S. C. The safety of pasteurised in-pack chilled meat products with respect to the foodborne botulism hazard. **Meat Science**, v.70, p. 461–475, 2005.

PEREIRA, A.S.C. et al. **Efeitos de níveis de concentrados sobre textura da carne de tourinhos Brangus e Nelore** In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 39, 2002, Recife. Anais...Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2002.

PICHERSKY, E., NOEL, J.P., DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, 311, p.808811, 2006.
POPOFF,M. R.; BOUVET, P. Genetic characteristics of toxigenic Clostridia and toxin gene evolution. **Toxicon**. v.75, p.63–89, 2013.

RAHARJO, S. et al. 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**, Washington, v. 40, n. 11, p. 2182-2185, Nov. 1992.

RAMOS, E. M. et al. **Otimização da avaliação objetiva da cor de presuntos e apresuntados**. In: V CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 1., 2009, São Paulo. Anais... Campinas: ITAL/CTC, 2009. 1 CD ROM.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: Fundamentos e metodologias**. 1. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 599 p.

RIVAS,L et al.; Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. **International Journal of Food Microbiology**, v.129, n.1-2, p.70-78, 2010.

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, 2002.

SCHIAVO, G.; MATTEOLI, M.; MONTECUCCO, C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. **Physiological Reviews**, v. 80, p. 717–766, 2000.

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

SINDELAR, J. J. Development of a method to manufacture uncured, no-nitrate/nitrite-added whole muscle jerky. **Meat Science**, v. 86, p. 298–303, 2010.

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

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, p.409-413, 2007.

STAR COLOR. CIE Lab Color System. Disponível em Acesso em: 13 de Janeiro. 2016.

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

SUPPAKUL, P. et al. Preliminary study of antimicrobial films containing principal constituents of basil. In: **Iapri world conference on packaging**. 2002.

TROLLER, J.A; Trend in research related to the influence of “water activity” on microorganisms in food. **Appl. Environ. Microbiology**, v. 53, p. 1142-1146, May. 1987.

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

UPADHYAYA, I. et al.; Rapid inactivation of *Salmonella* Enteritidis on shell eggs by plant-derived antimicrobials. **Poultry Science**, v.92, n.1, p.3228-3235, 2013.

VAN ZYL, R.L. et al. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v.18, p.129-33, 2006

WENDAKOON, C. N. SAKAGUCHI, M. , Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components of spices. **Journal of Food Protection**, v.58,n.1, p. 280-283, 1995.

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

ZHOU, G.H; XU, X.L.;LIU, Y. **Preservation technologies for fresh meat – a review**. Meat Science, v. 86, p. 119–128, 2010.