

**ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE
SEGURELHA (*Satureja montana* L.) SOBRE
Clostridium perfringens EM SISTEMAS DE
EMULSÃO CÁRNEAS ELABORADOS COM
DIFERENTES NÍVEIS DE NITRITO**

THALES LEANDRO COUTINHO DE OLIVEIRA

2010

THALES LEANDRO COUTINHO DE OLIVEIRA

ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE SEGURELHA (*Satureja montana* L.) SOBRE *Clostridium perfringens* EM SISTEMAS DE EMULSÃO CÁRNEAS ELABORADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE NITRITO

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

Orientadora

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Oliveira, Thales Leandro Coutinho de.

Atividade do óleo essencial de segurelha (*Satureja montana* L.)
sobre *Clostridium perfringens* em sistemas de emulsão cámeas
elaborados com diferentes níveis de nitrito / Thales Leandro
Coutinho de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2010.

152 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Mortadela. 2. Antioxidante. 3. Antimicrobiana. 4. Cor. 5.
Condimento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.53

THALES LEANDRO COUTINHO DE OLIVEIRA

ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE SEGURELHA (*Satureja montana* L.) SOBRE *Clostridium perfringens* EM SISTEMAS DE EMULSÃO CÁRNEAS ELABORADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE NITRITO

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

APROVADA em 26 de fevereiro de 2010

Prof. Dr. Victor Maximiliano Reis Tebaldi	UBM
Prof. Dr. Eduardo Mendes Ramos	UFLA
Prof. Dra. Maria das Graças Cardoso	UFLA

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

DEDICO

Aos meus pais, José Maria (*in memoriam*) e Janete,
e irmãos Vladimir, Tainah e Thiago.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fonte inesgotável de força e luz.

Ao meu, Pai José Maria de Oliveira (*in memoriam*), pelas lições de vida que jamais serão esquecidas.

À minha mãe, Janete Ferreira de Oliveira, exemplo incomparável de luta, força e fé.

Aos meus irmãos, Vladimir, Tainah e Thiago pelo apoio, amor e companhia.

À Lívia, minha companheira. Agradeço-lhe o carinho, apoio e momentos de alegria e tristeza juntos compartilhados.

À Professora, Roberta Hilsdorf Piccoli, educadora, orientadora e amiga. Obrigado por toda contribuição em minha formação nestes últimos anos.

Aos professores, Maria das Graças Cardoso, Eduardo Mendes Ramos, Eduardo Alves e Victor Maximiliano Reis Tebaldi pelo apoio e incentivo.

À Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) e todos seus funcionários. Obrigado pela oportunidade.

Ao setor de transporte da Universidade Federal de Lavras.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Aos amigos, Rodrigo de Araújo e Stefan Malfitano, pela ajuda.

À amiga, Eliane Mara, por todo apoio e pelos “cafezinhos” inesquecíveis; bons momentos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Danilo, Maíra, Danila, Alessandra Milezi, Alessandra Salimena, Alexandre, Naiane, Carolina, Emanuele, Mariana.

Ao pessoal do Laboratório de Tecnologia de Carnes: Raimundo, Monalisa, Jaciara e Gisele.

A todos do Laboratório de Química Orgânica: Milene, Aline, Lucilene, Paula, Ana, Rafaela, Gustavo, Juliana. Meu obrigado pela ajuda.

À Samísia Machado e José Eraldo, do laboratório METABIO da Universidade Federal de Sergipe, pela colaboração na caracterização do óleo essencial utilizado.

Eloísa e Douglas do LME (Laboratório de Microscopia Eletrônica).

Ao pessoal do Laboratório de Pós-Colheita, em especial Tina e Flávia.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Meus agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	04
2.1 Plantas aromáticas e condimentares.....	04
2.2 Metabolismo vegetal secundário.....	06
2.3 Óleos essenciais.....	10
2.3.1 Biogênese dos óleos essenciais.....	13
2.3.1.1 Biossíntese de terpenos.....	13
2.3.1.2 Biossíntese de fenilpropanóides.....	16
2.3.2 Métodos de extração de óleos essenciais.....	17
2.3.2.1 Enfloração (<i>Enfleurage</i>).....	17
2.3.2.2 Arraste por vapor d'água.....	18
2.3.2.3 Extração com solventes orgânicos.....	19
2.3.2.4 Prensagem (ou expressão).....	19
2.3.2.5 Extração por CO ₂ supercrítico.....	20
2.3.3 Óleos essenciais em alimentos.....	20
2.3.4 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais.....	24
2.3.5 Atividade antioxidante de óleos essenciais.....	29
2.3.5.1 Oxidação lipídica em alimentos.....	32
2.4 Descrição botânica e óleo essencial de <i>Satureja montana</i> L.....	35
2.5 <i>Clostridium perfringens</i>	38
2.5.1 Características morfofisiológicas.....	38
2.5.1.1 Esporos de <i>Clostridium perfringens</i>	40
2.5.2 <i>Clostridium perfringens</i> como contaminante em alimentos.....	42
2.5.3 Toxinfecção alimentar causada por <i>Clostridium perfringens</i> Tipo A.....	44
2.5.3.1 <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxina (CPE).....	45
2.6 Nitrito em produtos cárneos curados.....	48
2.6.1 Efeitos adversos do uso nitrito.....	50
2.7 Matriz alimentar: produto carne emulsionado do tipo mortadela.....	53
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.1 Local e condução do experimento.....	55

3.2 Óleos essenciais.....	56
3.2.1 Material vegetal.....	56
3.2.2 Extração dos óleos essenciais.....	56
3.2.2.1 Determinação do teor de umidade e rendimento.....	57
3.2.3 Avaliação qualitativa e quantitativa dos constituintes do óleo essencial.....	58
3.3 Microrganismo utilizado, manutenção e padronização.....	59
3.4 Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> – Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	60
3.5 Fabricação do modelo alimentar cárneo emulsionado.....	61
3.5.1 Preparo das amostras.....	63
3.6 Análises microbiológicas.....	65
3.6.1 Enumeração de <i>Clostridium perfringens</i>	65
3.6.2 Contagem de esporos de <i>Clostridium perfringens</i>	65
3.6.3 Controle microbiológico.....	66
3.7 Análises Físico-Químicas.....	66
3.7.1 Composição centesimal.....	66
3.7.2 Análise da cor objetiva.....	67
3.7.3 Oxidação lipídica.....	67
3.8 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	68
3.9 Análises estatísticas dos dados.....	69
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1 Caracterização química do óleo essencial.....	71
4.2 Composição centesimal do modelo alimentar.....	75
4.3 Análise da cor objetiva.....	76
4.4 Oxidação lipídica (índice TBAR's).....	94
4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> e determinação da concentração Inibitória Mínima (CIM).....	103
4.5.1. Análises ultraestrutural do efeito do óleo essencial de <i>Satureja montana</i> L. sobre <i>Clostridium perfringens</i>	108
4.6 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Satureja montana</i> L. sobre <i>Clostridium perfringens</i> inoculado em mortadela.....	110
5 CONCLUSÕES.....	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

OE's	Óleos essenciais
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
IPP	isopentenil-pirofosfato
DMAPP	dimetilalil-pirofosfato
DXPS	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato
PAL	Fenilalanina amonialiase
GRAS	“Generally Recognized as Safe”
MAP	Embalagem com atmosfera modificada
LPS	Lipopolissacarídeos
LAB	Bactérias ácido-láticas
UFC	Unidades formadoras de colônia
CIM	Concentração Inibitória Mínima
ROS	Espécies reativas de oxigênio
BHA	butil-hidroxi-anisol
BHT	butil-hidroxi-tolueno
TBHQ	terc-butil-hidroquinona
G _t	Tempo de geração
DPA	Ácido dipicolínico
SASP	Pequenas proteínas solúveis ácidas
FDA	Food and Drug Administration
SOD	Superoxido dismutase
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxina
WOF	“Warmed over flavor”
ATCC	American Type Culture Collection
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
FID	Ionização de chama de hidrogênio
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
TSC	Triptose Sulfito Cicloserina
BHI	Caldo Infusão Cérebro Coração
RCM	Meio Reforçado para Clostrídios
NMP	Número Mais Provável
PCA	Agar para Contagem Padrão
TBAR's	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazila

LISTAS DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Toxinas utilizadas para classificação de <i>C. perfringens</i> , enterotoxinas e localização genética (Brynstad & Granum, 2002).....	39
TABELA 2	Formulação utilizada na elaboração das mortadelas.....	62
TABELA 3	Constituintes químicos do óleo essencial de <i>Satureja montana</i> L. identificados por CG/EM e seus respectivos teores.....	71
TABELA 4	Composição centesimal do modelo alimentar do tipo mortadela empregado nos estudos.....	75
TABELA 5	Equações* e respectivos coeficientes de regressão (R^2) para os valores de luminosidade (L^*) de modelos alimentares cárneos emulsionados do tipo mortadela, elaborados com diferentes concentrações de óleo essencial e níveis de nitrito, durante o período de estocagem a 25°C (x em dias).....	79
TABELA 6	Equações* e respectivos coeficientes de regressão (R^2) para os valores dos índices de vermelho (a^*) de modelos alimentares cárneos emulsionados do tipo mortadela, elaborados com diferentes concentrações de óleo essencial e níveis de nitrito, durante o período de estocagem a 25°C (x em dias).....	82
TABELA 7	Equações* e respectivos coeficientes de regressão (R^2) para os valores dos índices de amarelo (b^*) de modelos alimentares cárneos emulsionados do tipo mortadela, elaborados com diferentes concentrações de óleo essencial e níveis de nitrito, durante o período de estocagem a 25°C (x em dias).....	86
TABELA 8	Valores médios de luminosidade (L^*), índice de vermelho (a^*) e índice de amarelo (b^*) obtidos para produtos cárneos emulsionados do tipo mortadela elaborados com 0, 100 e 200 mg.Kg ⁻¹ de nitrito de sódio e 0; 0,78; 1,56 e 3,125% de óleo essencial (O.E) de <i>S. montana</i> L. durante estocagem por 30 dias (dia 1 e dia 30) a 25°C.....	87

TABELA 9	Equações* e respectivos coeficientes de regressão (R^2) para os valores dos índices de saturação (C^*) de modelos alimentares cárneos emulsionados do tipo mortadela, elaborados com diferentes concentrações de óleo essencial e níveis de nitrito, durante o período de estocagem a 25°C (x em dias).....	90
TABELA 10	Equações* e respectivos coeficientes de regressão (R^2) para os valores dos ângulos de tonalidade (h^*) de modelos alimentares cárneos emulsionados do tipo mortadela, elaborados com diferentes concentrações de óleo essencial e níveis de nitrito, durante o período de estocagem a 25°C (x em dias).....	92
TABELA 11	Valores médios dos índices de saturação (C^*) e ângulos de tonalidade (h^*) obtidos para produtos cárneos emulsionados do tipo mortadela elaborados com 0, 100 e 200 mg.Kg ⁻¹ de nitrito de sódio e 0; 0,78; 1,56 e 3,125% de óleo essencial (O.E) de <i>S. montana</i> L. durante estocagem por 30 dias (dia 1 e dia 30 a 25°C.....	93
TABELA 12	Equações* e respectivos coeficientes de regressão (R^2) para os índices TBAR's expressos em mg de malonaldeído por kilo de amostra (mg MDA)/Kg de modelos alimentares cárneos emulsionados do tipo mortadela, elaborados com diferentes concentrações de óleo essencial e níveis de nitrito, durante o período de estocagem a 25°C (x em dias).....	97
TABELA 13	Valores médios para os índices TBAR's (mg de malonaldeído/Kg de amostra) obtidos para produtos cárneos emulsionados do tipo mortadela elaborados com 0, 100 e 200 mg.Kg ⁻¹ de nitrito de sódio e 0; 0,78; 1,56 e 3,125% de óleo essencial (O.E.) de <i>S. montana</i> L. durante estocagem por 30 dias/25°C.....	98
TABELA 14	Populações de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A ATCC3624 (Log10 UFC.g ⁻¹) em modelos cárneos emulsionados do tipo de mortadela elaborados com diferentes níveis de nitrito de sódio (0, 100 e 200 mg.Kg ⁻¹) e concentrações de óleo essencial (O.E) de <i>Satureja montana</i> L. (0,0; 0,78; 1,56; 3,125%) durante estocagem por 30 dias/25°C.....	112

TABELA 15	Contagens de esporos de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A ATCC 3624 em mortadelas elaboradas com diferentes níveis de nitrito e concentrações de óleo essencial durante estocagem por 30 dias a 25°C.....	119
-----------	---	-----

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Principais vias biossintéticas dos metabólitos vegetais secundários. Adaptado (Dewick, 2009).....	08
FIGURA 2	Síntese de terpenóides pela via biossintética do mevalonato (Simões et al., 2007).....	14
FIGURA 3	Estrutura química dos principais terpenos Bowles (2003). Linhas tracejadas representam ligações entre unidades de isopreno.....	15
FIGURA 4	Rota de biossintese de fenilpropanóides (Simões et al., 2007).....	16
FIGURA 5	Estruturas químicas do timol (a) um fenol e anetol (b) um fenilpropanoide.....	17
FIGURA 6	Localidades e mecanismo de ação de componentes dos óleos essenciais em células bacterianas (Burt, 2004).....	25
FIGURA 7	Mecanismo de ação para os antioxidantes primários; creditado a óleos essenciais e seus componentes (Ramalho & Jorge 2006).....	31
FIGURA 8	Mecanismo de autoxidação proposto por Farmer et al., (1942).....	34
FIGURA 9	Aspecto geral do condimento seco e espécime vegetal de <i>Satureja montana</i> L.....	36
FIGURA 10	Micrografia eletrônica de transmissão de componentes estruturais esporo de <i>Clostridium perfringens</i> ; <i>ct</i> camada externa de natureza protéica; <i>cx</i> córtex peptídeoglicano (PG); <i>c</i> região central do esporo (core). (Novak et al., 2003).....	41
FIGURA 11	Ciclo celular <i>Clostridium</i> . Alterações morfológicas associadas à esporulação e síntese de toxina são indicadas (McClane & Rood, 2001).....	45
FIGURA 12	CPE e suas regiões funcionais.....	46
FIGURA 13	Esquema mostrando as principais etapas na toxinfecção causada por <i>Clostridium perfringens</i> e seus mecanismos (Brynstad & Granum, 2002).....	47

FIGURA 14	Formação de nitrosaminas (Karl-Otto, 2008).....	51
FIGURA 15	Aparelho extrator de Clevenger modificado.....	57
FIGURA 16	Sistema para determinação do teor de umidade.....	58
FIGURA 17	Fluxograma das etapas da fabricação da mortadela e preparo das amostras.....	64
FIGURA 18	Estruturas químicas de alguns compostos presentes no óleo essencial de <i>Satureja montana</i> L. (A) Timol; (B) Carvacrol; (C) γ -terpineno; (D) <i>p</i> -cimeno.....	73
FIGURA 19	Óleo essencial de <i>S. montana</i> após extração por hidrodestilação.....	74
FIGURA 20	Efeito das diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Satureja montana</i> L. e níveis de nitrito sobre a luminosidade (L^*) durante o armazenamento das mortadelas (25°C). A=0; B=100; C=200 mg.Kg⁻¹ de NaNO ₂	78
FIGURA 21	Efeito das diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Satureja montana</i> L. e níveis de nitrito sobre o índice de vermelho (a^*) durante o armazenamento das mortadelas (25°C). A=0; B=100; C=200 mg.Kg⁻¹ de NaNO ₂	81
FIGURA 22	Efeito das diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Satureja montana</i> L. e níveis de nitrito sobre o índice de amarelo (b^*) durante o armazenamento das mortadelas (25°C). A=0; B=100; C=200 mg.Kg⁻¹ de NaNO ₂	85
FIGURA 23	Efeito das diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Satureja montana</i> L. e níveis de nitrito sobre o índice de saturação (C^*) durante o armazenamento das mortadelas (25°C). A=0; B=100; C=200 mg.Kg⁻¹ de NaNO ₂	89
FIGURA 24	Efeito das diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Satureja montana</i> L. e níveis de nitrito sobre o ângulo de tonalidade (h^*) durante o armazenamento das mortadelas (25°C). A=0; B=100; C=200 mg.Kg⁻¹ de NaNO ₂	91
FIGURA 25	Efeito das diferentes concentrações de óleo essencial e nitrito na coloração das mortadelas. A=0/0; B=0,78/100; C=0,0/100; D=3.125/0; E=1,56/100; F=0/200 de óleo essencial/nitrito.....	94

FIGURA 26	Efeito das diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Satureja montana</i> L. e níveis de nitrito sobre o índice TBAR's durante o armazenamento das mortadelas (25°C). A=0; B=100; C=200 mg.Kg ⁻¹ de NaNO ₂	96
FIGURA 27	Estrutura do carvacrol sendo atacada por um radical livre (R·) (Lima, 2008).....	97
FIGURA 28	Esquema de reação da possível interação existente entre compostos aromáticos (timol) do óleo essencial e o nitrito. Linha pontilhada representa a ligação de hidrogênio.....	102
FIGURA 29	Diâmetro dos halos inibitórios (mm) em função das diferentes concentrações de óleo essencial de <i>S. montana</i> sobre <i>Clostridium perfringens</i> tipo A ATCC3624. x média dos dados observados; descontados os diâmetros dos micropoços.....	104
FIGURA 30	Formação dos halos de inibição sobre <i>C. perfringens</i> pela metodologia Difusão Cavidade em Agar.....	105
FIGURA 31	MET – Micrografias eletrônicas de transmissão.....	109
FIGURA 32	Contagens médias (±Erro Padrão) de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A ATCC3624 em mortadelas elaboradas com diferentes níveis de nitrito e concentrações de óleo essencial estocadas por 30 dias a 25°C.....	111

RESUMO

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

Os produtos cárneos são gêneros alimentícios que aliam, além de aspectos sensoriais apreciáveis, custo relativamente reduzido quando comparados a cortes cárneos tradicionais *in natura*. Os produtos cárneos curados apresentam em sua composição o nitrito, ingrediente chave do processo de cura, responsável pela formação de cor, sabor e aroma, além de desempenhar um importante papel na sua conservação. No entanto, estes aditivos possuem efeitos adversos, pois, apresentam elevada toxicidade aos consumidores. Nos dias atuais, pesquisas têm se intensificado na busca de substitutos naturais aos aditivos sintéticos comumente empregados pela indústria alimentícia: neste contexto, surgem os óleos essenciais, compostos naturais obtidos de plantas e condimentos com atividades antimicrobianas e antioxidantes comprovados. Nesta pesquisa objetivou-se de avaliar o efeito do óleo essencial de segurelha (*Satureja montana* L.) sobre *Clostridium perfringens* Tipo A ATCC 3624; patógeno comumente associado a surtos de toxinfecção alimentar por consumo de produtos cárneos contaminados, inoculado em modelos alimentares cárneos emulsionados do tipo mortadela, elaborados com diferentes níveis de nitrito. Foi avaliado, ainda, o efeito sobre a oxidação lipídica do produto. Nos testes *in vitro*, o óleo essencial demonstrou atividade sobre o microrganismo em concentrações superiores a 1,56%, sendo esta determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM). No entanto, ao se aplicar esta concentração na matriz alimentar, uma redução de apenas cerca de um ciclo logarítmico pode ser observada após o primeiro dia de estocagem. O efeito mais pronunciado foi observado em amostras tratadas com óleo essencial na concentração de 3,125%. Foi observado, também, um efeito significativo sobre a oxidação lipídica nos modelos alimentares cárneos elaborados com óleo essencial já na menor concentração aplicada (0,78%) e sem adição de nitrito. A utilização de óleos essenciais em concentrações superiores a 1,56% pode promover impactos sensoriais negativos, fato observado pela alteração da coloração característica, podendo resultar em rejeição por parte dos consumidores. A adição dos óleos essenciais em alimentos, quando utilizada em conjunto com outros métodos de conservação, pode auxiliar no controle do crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores e retardar reações deteriorativas como a oxidação de lipídeos.

*Orientadora: Roberta Hilsdorf Piccoli - UFLA

ABSTRACT

OLIVEIRA, Thales Leandro Coutinho de. **Activity of winter savory (*Satureja montana* L.) essential oil on *Clostridium perfringens* in meat emulsion systems prepared with different levels of nitrite.** 2010. 152 p. Dissertation (Master's in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras.*

Meat products are widely consumed foodstuffs; they combine, besides appreciable sensory aspects, relatively low cost when compared to traditional *in natura* meat cuts. The cured meat products present nitrite in their composition a key ingredient in the cure process, responsible for formation of color, flavor and aroma, and play an important role in the conservation of these foods. However, these additives have adverse effects, since they have high toxicity to consumers. Currently research has intensified the search for natural substitutes for synthetic additives commonly employed by the food industry: in this context essential oils appear, natural compounds obtained from plants and herbs with proven antioxidant and antimicrobial activity. This research aimed to evaluate the effect of winter savory (*Satureja montana* L.) essential oils on *Clostridium perfringens* Type A ATCC 3624, a pathogen commonly associated with food poisoning outbreaks through consumption of contaminated meat products, inoculated in meat emulsion food models of the mortadella type, prepared with different levels of nitrite; the effect on lipid oxidation in the product was also evaluated. *In vitro* tests showed the essential oil activity on microorganism at concentrations above 1,56%, which is the determined minimum inhibitory concentration (MIC); but when applying this concentration in meat food model, a reduction of only one log cycle can be observed after the first day of storage. The most pronounced effect was observed in samples treated with essential oil at concentration of 3,125%. A significant effect was also observed on lipid oxidation in meat food models prepared with essential oil at the lowest concentration applied (0,78%) and without nitrite addition. The use of essential oils at concentrations higher than 1,56% can promote negative impacts, which was observed by the color change feature and may result in rejection by consumers. The addition of essential oils in food when used in conjunction with other conservation methods can help control microorganism growth, and slow degradation reactions such as lipid oxidation.

*Advisor: Roberta Hilsdorf Piccoli - UFLA

1 INTRODUÇÃO

O mercado de embutidos tem apresentado significativa expansão e alta competitividade na última década, uma vez que o consumo destes produtos tornou-se parte do hábito alimentar de uma parcela considerável de consumidores. Os produtos cárneos são gêneros alimentícios amplamente consumidos, pois, aliam aspectos sensoriais apreciáveis e custo reduzido, quando comparados aos cortes cárneos tradicionais *in natura*. A mortadela é um produto cárneo emulsionado embutido que propiciou o acesso de classes sociais menos favorecidas a proteínas de origem animal, tornando possível a ingestão proteica mínima recomendada. De acordo com a Revista Nacional da Carne do ano de 2004, citada por Santos (2007), em 2003 o mercado de mortadelas no Brasil registrou vendas de 120 mil toneladas resultando em um faturamento de 500 milhões.

Os produtos cárneos curados apresentam em sua composição um aditivo peculiar, o nitrito (NO_2), tanto de potássio quanto de sódio; é o agente ativo do processo de cura responsável pela formação da cor, sabor e aroma característicos, além de possuir propriedades antioxidantes e bacteriostáticas, atuando diretamente na vida de prateleira prolongada destes produtos. No entanto, a adição de nitrito em alimentos é problemática. Este aditivo pode, por meio de reações com aminas em produtos cárneos curados, resultar na formação de compostos *N*-nitrosos, em especial as nitrosaminas, espécies que apresentam efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos comprovados.

Clostridium perfringens é um bastonete Gram-positivo anaeróbico, capaz de formar esporos quando em condições desfavoráveis para o crescimento de suas células vegetativas. Seu habitat primário é o trato intestinal de indivíduos saudáveis, e animais de sangue quente, podendo ser encontrado em

diversos ambientes como solo, água, ar e vegetação. Considerando essas fontes, por meio de seus esporos ou mesmo células viáveis, podem atingir uma ampla faixa de alimentos crus e processados, em especial carnes e produtos cárneos. A maioria dos casos de distúrbios causados por *C. perfringens* está associada a alimentos pré-elaborados que sofrem abusos de temperatura posprocesso (refrigeração lenta), no qual o tratamento térmico elimina a microbiota competidora e favorece a germinação de esporos. No entanto, segundo Brynstad & Granum (2002), células vegetativas podem causar problemas em alimentos não submetidos a tratamentos térmicos; a sanificação apropriada de superfícies críticas de unidades de alimentação e indústrias alimentícias é a maneira mais eficiente de controlar o problema de toxinfecções alimentares causadas por este microrganismo.

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

Os óleos essenciais são frações, líquidas, voláteis e odoríferas obtidas, que se baseiam no metabolismo secundário de espécimes vegetais; apresentam propriedades biológicas comprovadas, como atividade antioxidante e antimicrobiana (Bakkali et al., 2008).

Nos dias atuais, observa-se o crescimento do interesse por parte dos consumidores em alimentos ditos “naturais”, livres de aditivos sintéticos em sua composição, estando dispostos, inclusive, a pagar mais por estes produtos. Neste contexto, os óleos essenciais surgem como alternativa factível, não só na substituição, mas também em uso conjunto reduzindo os níveis de aditivos sintéticos empregados na elaboração de alimentos.

Diante do exposto, nesta pesquisa objetivou-se avaliar o efeito do óleo essencial de segurelha (*Satureja montana* L.) sobre *Clostridium perfringens* Tipo A ATCC 3624, inoculado em modelo alimentar cárneo emulsificado do

tipo mortadela, bem como sua atividade sobre a oxidação lipídica do produto. Foi avaliada, também, a variação dos níveis de nitrito na elaboração, para verificar a viabilidade da redução deste aditivo e o uso combinado ao óleo essencial.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas aromáticas e condimentares

Plantas aromáticas são aquelas que podem gerar, por algum processo físico-químico, um produto aromático o qual possui um odor ou sabor determinado, sem avaliar sua qualidade comercial ou estética (Bandoni & Czepak, 2008). Os condimentos são definidos como produtos aromáticos de origem vegetal utilizados com a finalidade principal de temperar alimentos (Food and Drug Administration - FDA, citado por Dziezak, 1989).

Toda a história e, ainda, a pré-história do homem discorre em íntima relação com as plantas aromáticas e seus componentes oleosos. Foram encontrados restos de um equipamento parecido com os destiladores de essências atuais, na cultura mesopotâmica de 5000 anos. Escritos de imperadores chineses, datados de mais de 3000 anos, antes da Era Cristã, listavam centenas de substâncias medicinais, obtidas de plantas, descrevendo inúmeras receitas de compostos fitoterápicos e suas indicações. Nessa mesma época, já se faziam trocas de ervas medicinais e condimentares entre diferentes povos cujos babilônios forneciam produtos locais em troca do ginseng da China. Uma gravação egípcia, estimada do ano de 2300 a.C, mostra o emprego do tomilho na elaboração de cerveja. Restos pré-históricos de vasilhames, contendo resinas e bálsamos vegetais, indicam um significado medicinal ou, talvez, cosmético destes produtos (Bandoni & Czepak, 2008; Upnmoor, 2003).

Embora as técnicas de destilação fossem melhoradas, sobretudo, no século IX d.C com os Árabes, a produção e aplicação destes componentes naturais permaneceram, praticamente, inalteradas durante séculos. O desenvolvimento sistemático começou no século XIII, quando as farmácias começaram a preparar os chamados óleos e extratos remédio e, mais tarde,

gravou as propriedades e efeitos fisiológicos destes óleos nas farmacopeias. Muitos óleos essenciais, usados por fabricantes de perfumes e de aromas, foram, originalmente, preparados por destilação nas farmacopeias, nos séculos XVI e XVII. Uma outra etapa importante na história de fragrâncias naturais e aromas ocorreu na primeira metade do século XIX, quando a produção de óleos essenciais passou a ser industrializada, em virtude do aumento da demanda destes óleos como perfumes e ingredientes flavorizantes. Por volta de 1850, compostos orgânicos isolados foram, também, usados com os mesmos propósitos. Esta revolução resultou do isolamento do cinamaldeído do óleo de canela por DUMAS & PÉLIGOT em 1834, e o benzaldeído oriundo do óleo de amêndoa amarga por LIEBIG & WOHLER em 1837. O primeiro aroma sintético foi introduzido entre 1845 e 1850 (Surburg & Panten, 2006).

A Revolução Industrial e o desenvolvimento da Química Orgânica resultaram na preferência por produtos sintéticos, fato que pode ser explicado pela maior facilidade de obtenção de componentes ativos purificados, pela possibilidade de modificações estruturais para produção de drogas mais ativas e seguras. No entanto, nos dias atuais tem crescido o interesse em terapias alternativas e o uso de produtos naturais, principalmente, aqueles derivados de plantas aromáticas e condimentares. Este fato está atrelado, principalmente, às terapias convencionais ineficientes, abusivas e, ainda, ao uso incorreto de drogas sintéticas resultando em efeitos colaterais e outros problemas (Rates, 2001).

Existem inumeráveis espécies vegetais com propriedades aromáticas desde plantas superiores até algas ou líquens. Algumas famílias botânicas são, tradicionalmente, fontes de produtos aromáticos como as Pináceas, Verbenáceas, Mirtáceas, Lamiáceas, Rutáceas, Lauráceas, Piperáceas, Apiáceas, e Asteráceas (Bandoni & Czepak, 2008).

As plantas aromáticas e condimentares, a cada dia, apresentam um maior emprego, sendo utilizadas na alimentação, na indústria farmacêutica, na

agroquímica, entre outros. Na alimentação, as ervas condimentares e aromáticas atuam realçando o sabor dos alimentos e ativando a ação das glândulas salivares que iniciam o processo digestivo. Além disso, cada tipo de planta tem em sua composição substâncias diferentes, de forma que agem no organismo mesmo quando a planta é usada apenas como tempero (Cardoso et al., 2005).

Os condimentos, também, possuem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais. Pode-se dizer que existem, aproximadamente, 70 tipos de condimentos, cultivados e utilizados em todo mundo. Apesar de serem cultivados em diversos países tropicais, sua produção em escala comercial restringe-se a poucas regiões do Sul e Sudeste da Ásia, sendo a Índia o maior exportador (Shelef, 1984). Segundo Phuthi (1980), países como os Estados Unidos da América, Singapura e Austrália destacam-se como maiores importadores.

O uso potencial de plantas, entretanto, como fonte de novas drogas, ainda, é explorado de forma superficial. Das estimadas, 250-500 mil espécies de plantas, somente um pequeno percentual tem sido investigado fito quimicamente e, ainda, uma porcentagem menor foi devidamente estudada em termos de suas propriedades farmacológicas. Na maioria dos casos, apenas a seleção farmacológica ou estudos preliminares foram realizados. Estima-se que 5.000 espécies tenham sido estudadas para uso médico (Payne et al., 1991).

2.2 Metabolismo vegetal secundário

Todos os organismos precisam transformar e inter converter um vasto número de componentes orgânicos, para que seja possível viver, crescer e reproduzir. É preciso produzir energia sobre a forma de ATP e uma fonte de construção de blocos para produção de seus próprios tecidos. Uma rede integrada, mediada por enzimas e reações químicas, cuidadosamente reguladas,

é usada para este propósito, sendo denominado metabolismo intermediário. As vias envolvidas são chamadas vias metabólicas (Dewick, 2009).

O *metabolismo primário* diz respeito ao conjunto das reações químicas, relacionadas com a transformação de macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) em unidades constitutivas da célula, sendo, portanto, essenciais à vida e comuns a todos os seres vivos. Vegetais, microrganismos e, em menor escala animais, entretanto, apresentam todo um arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Nesse grupo encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, com bioquímica e metabolismo específicos e únicos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização. A todo este conjunto metabólico é definido como *metabolismo secundário*, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema (Santos, 2007). Os vegetais, em relação ao metabolismo secundário, possuem elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade numa mesma espécie (Poser & Mentz, 2007).

Os metabólitos secundários são originados de intermediários do metabolismo primário da glicose (Figura 1): o acetato (Acetil- CoA), ácido chiquímico, ácido mevalônico e metileritrol fosfato. O **acetil-CoA** é formado, por meio de descarboxilação oxidativa da via glicolítica, produzindo ácido pirúvico, que dá origem a metabólitos secundários como os fenóis e prostaglandinas. O **ácido chiquímico** é produzido pela combinação do fosfoenolpiruvato, um intermediário da via glicolítica, e eritrose-4-fosfato, oriunda da via pentose-fosfato. A via do chiquimato leva à formação de

aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), precursores de metabólitos secundários aromáticos como fenóis variados, ácidos cinâmicos e alcalóides. O **ácido mevalônico** é originado da condensação de três moléculas de acetil-CoA; o **metileritrol fosfato** surge da combinação do ácido pirúvico e gliceraldeído 3-fosfato e sua via biossintética, juntamente com a via do mevalonato, são responsáveis pela formação de esteroides e metabólitos terpênicos (Dewick, 2009).

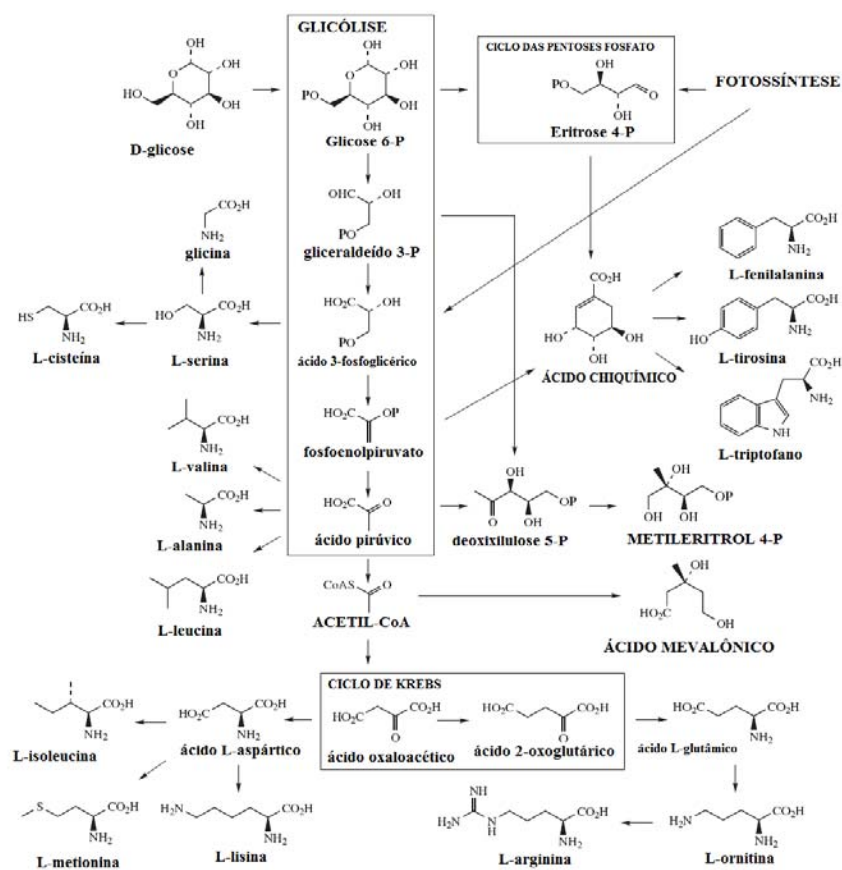


FIGURA 1 Principais vias biossintéticas dos metabólitos vegetais secundários. FONTE: Adaptado Dewick (2009).

O conjunto de compostos secundários nas plantas é resultado do balanço entre a formação e eliminação desses compostos, durante o crescimento da planta, sendo esse equilíbrio influenciado por fatores genéticos (que são fixos) e ambientais como luz, temperatura, tipo de solo e água, os quais são variáveis. Compostos secundários são constituídos de substâncias que agem na preservação da integridade das plantas e podem ser separados, de acordo com as estruturas químicas em vários grupos, dentre eles os óleos essenciais (Cardoso et al., 2000).

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção do vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas interessantes. Atualmente, entretanto, verifica-se que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem adequação do produtor ao seu meio. De fato, já foram reconhecidas como funções de várias substâncias pertencentes a essa classe de metabolitos, por exemplo, a defesa contra herbívoros e microrganismos, a proteção contra raios UV, a atração de polinizadores ou de animais dispersores de sementes, bem como sua participação em alelopatias (Santos, 2007).

Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (Lindroth et al., 1987; Hartmann, 1996). Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é, frequentemente, afetada por condições ambientais (Kutchan, 2001).

Os metabólitos secundários apresentam várias atividades biológicas. Muitos são de importância comercial tanto na área farmacêutica quanto nas

áreas alimentar, agrônômica e de perfumaria, entre outras. Entre os metabólitos secundários, os principais grupos de compostos encontrados com atividade biológica são os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (Pereira et al., 2008).

2.3 Óleos essenciais

Óleos essenciais (OE's) são definidos como uma parte do metabolismo (combinação de metabólitos) de um vegetal, composto, geralmente, por terpenos que estão associados ou não a outros componentes, cuja maioria, voláteis, geram, em conjunto, o odor do dito vegetal (Bandoni & Czepak, 2008). Os OE's são líquidos oleosos aromáticos, obtidos de material vegetal como flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutos e raízes. Podem ser adquiridos por expressão, fermentação, enfloração ou extração, entretanto, o método de destilação, por arraste a vapor, é o mais comumente utilizado para a produção comercial. Os óleos essenciais dos condimentos são misturas complexas de diferentes compostos, que contribuem para as propriedades antimicrobianas bem como dando ao alimento características de sabor e aroma especiais (Parry, 1962; Aridogam et al., 2002).

Podem ser, também, chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, por serem de aparência oleosa à temperatura ambiente. Entretanto, sua principal característica é a volatilidade, diferindo, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos em geral de sementes. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos essenciais, os quais são solúveis em solventes orgânicos apolares, apresentam solubilidade limitada em água, mas suficiente para aromatizar soluções aquosas, denominadas hidrolatos (Simões et al., 2007).

Os óleos essenciais são misturas naturais complexas que podem conter de 20 a 60 componentes em concentrações variáveis. São caracterizados por dois

ou três compostos majoritários, presentes em concentrações relativamente elevadas (20-70%), existindo outros componentes presentes em concentrações vestigiais (traços) (Bakkali et al., 2008). Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre (Simões et al., 2007).

Aproximadamente 3000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercial e especificamente importantes, para as indústrias farmacêuticas, agrônômicas, alimentícias, sanitárias, cosméticas e de perfumaria. Óleos essenciais e alguns de seus componentes são utilizados em perfumes, produtos de beleza, produtos sanitários, em odontologia, na agricultura, como conservantes e aditivos alimentares e como drogas naturais (Silva et al., 2003; Hajhashemi et al., 2003; Perry et al., 2003).

Os OE's são comumente obtidos por hidrodestilação ou arraste a vapor, processos desenvolvidos, primeiramente, na idade média pelos árabes. Conhecidos por suas propriedades antisépticas, bactericidas, virucidas, fungicidas, medicinais e sua fragrância, são usados em conservantes de alimentos como agentes antimicrobianos, analgésicos, sedativos, antiinflamatórios, espasmos líticos e drogas anestésicas locais. Na natureza os óleos essenciais desempenham um importante papel na proteção de organismos vegetais como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e, também, contra herbívoros por meio da redução da palatabilidade. Eles, ainda, atuam repelindo insetos indesejáveis e atraindo desejáveis, favorecendo a dispersão de pólen e sementes e, conseqüentemente, a perpetuação da espécie (Bakkali et al., 2008). Biologicamente os óleos essenciais, por serem voláteis, atuam como sinais de comunicação química com o reino vegetal e armas de defesa contra o reino animal (Saito & Scramin, 2000).

Os óleos essenciais, normalmente, são formados em células especiais, ou grupo de células, encontrados em diversas folhas e caules. São comumente concentrados em regiões particulares do vegetal e, quando ocorrem em vários órgãos na mesma planta, frequentemente, apresentam perfis de composição diferenciados (Oussalah et al., 2007). Organismos vegetais, produtores de óleos essenciais, estocam-nos em estruturas especializadas, tais como pelos secretores, células secretoras da epiderme, bolsas especiais feitas de várias células secretoras que circundam um espaço cheio de óleo e canais oleíferos (tubos revestidos de células secretoras) (Bowles, 2003).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada, geneticamente e, em geral, é específica para um determinado órgão e característica para seu estágio de desenvolvimento. As condições ambientais, porém, são capazes de causar variações significativas, como a influência do ciclo vegetativo, em que a concentração de cada um dos constituintes do óleo pode variar durante o desenvolvimento do vegetal. O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e os tipos de cultivo, também, influenciam sobre a composição química dos óleos essenciais (Willians & Stockley, 1998). A temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem uma influência direta, sobretudo, sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem de óleo essencial na superfície (Salgado, 2005). As plantas ricas em óleos essenciais devem ser coletadas pela manhã ou à noite, pois, o período de exposição ao sol pode provocar uma perda quantitativa importante do óleo existente no vegetal. O grau de hidratação do terreno e os teores de macronutrientes (N, P, K), também, podem influenciar a composição dos óleos voláteis. Entretanto, não se pode estabelecer um único padrão, pois, cada espécie reage de forma diferenciada (Castro et al., 2006).

2.3.1 Biogênese dos óleos essenciais

Quimicamente, a grande maioria dos óleos voláteis é constituída de derivados do ácido chiquímico e do mevalonato, precursores de fenilpropanoides ou de terpenoides, sendo os últimos preponderantes (Simões et al., 2007).

2.3.1.1 Biossíntese de terpenos

Terpenoides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo esse termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Os terpenoides são sintetizados pela via biossintética do mevalonato (Figura 2). O ácido mevalônico é formado pela condensação de uma molécula de acetoacetyl-CoA com o Acetyl-CoA, seguida de uma hidrólise que leva à formação do 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA); posteriormente este composto é reduzido (HMG-CoA redutase) a mevalonato. As moléculas de mevalonato são rearranjadas, por uma série de transformações enzimáticas, a formas de composto conhecidas como isopentenil-pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil-pirofosfato (DMAPP). O IPP consiste em uma molécula ramificada de 5 átomos de carbono (conhecida como *unidade de isopreno*) ligada a dois grupos fosfato. As unidades de isopreno são o ponto de partida para a síntese dos compostos terpênicos, principais moléculas encontradas nos óleos essenciais (Simões et al., 2007; Bowles, 2003).

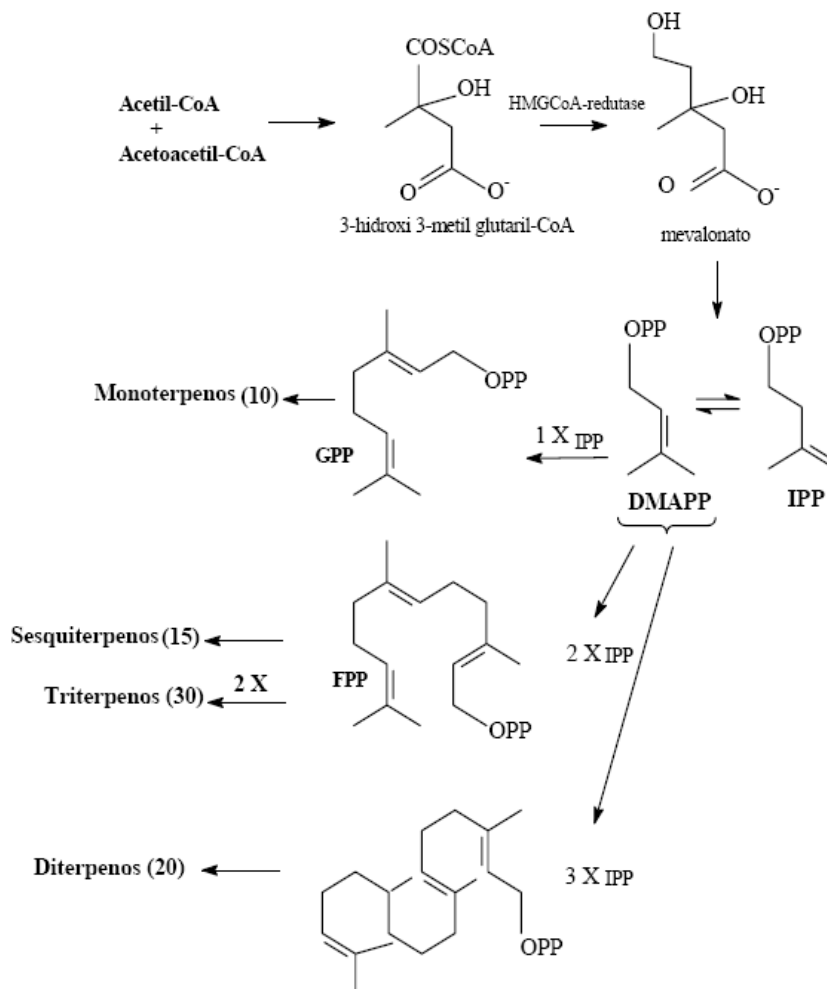


FIGURA 2 Síntese de terpenóides pela via biossintética do mevalonato.
 FONTE: Simões et al. (2007).

As unidades de isopreno são, facilmente, ligadas formando esqueletos de carbono longos e ramificados, com número variável de unidades pentacarbonatadas (Figura 3). Os compostos terpênicos, comumente encontrados em óleos essenciais, são os monoterpenos (C_{10}), e os sesquiterpenos (C_{15}) constituídos de duas e três unidades de isopreno respectivamente, embora

hemiterpenos (C_5), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) possam existir. Os monoterpenos são as moléculas mais representativas, constituindo cerca de 90% dos óleos essenciais e permitindo uma grande variabilidade de estruturas (Bakkali et al., 2008; Bowles, 2003).

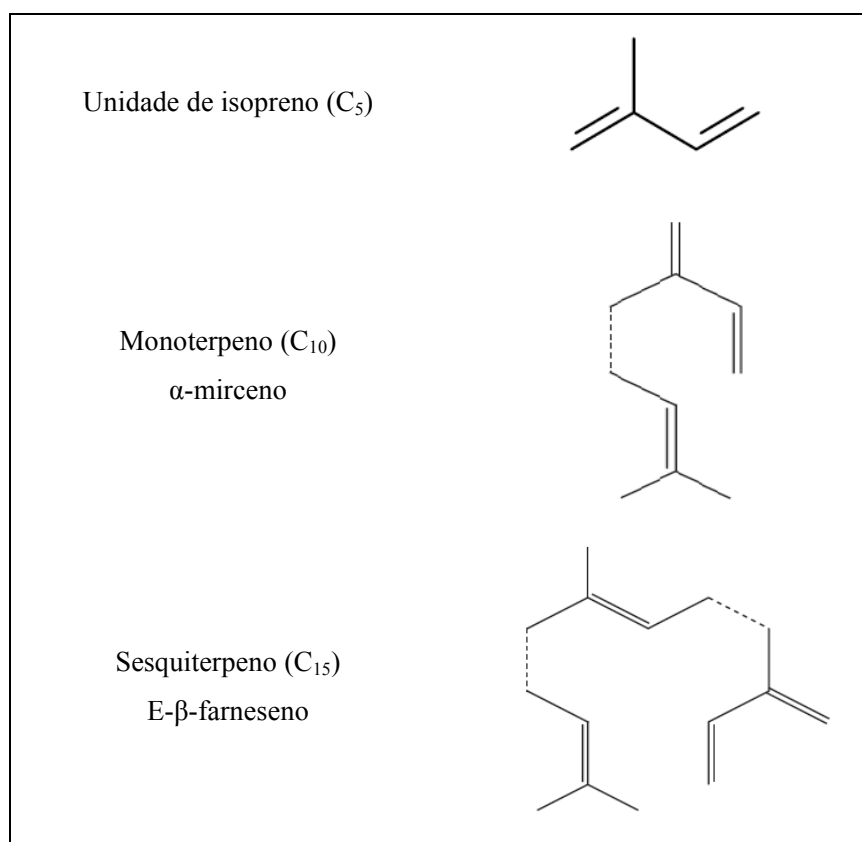


FIGURA 3 Estrutura química dos principais terpenos. Linhas tracejadas representam ligações entre unidades de isopreno.
FONTE: Bowles (2003).

Existem estudos em que são mostrados que a formação do IPP, também, pode ocorrer no cloroplasto (plastídios) pela via 1-deoxi-D-xilulose conhecida

como via DXPS. Essa via tem início com a condensação de uma molécula de ácido pirúvico, com uma de gliceraldeído 3-P, formando a deoxixilulose 5-P que, após sucessivas reações, originam o IPP e o DMAPP levando à formação de terpenos variados (Dewick, 2002).

2.3.1.2 Biossíntese de fenilpropanoides

Os fenilpropanoides se formam com base no ácido chiquímico, que dão origem aos aminoácidos fenilalanina e tirosina os quais, por ação enzimática da fenilalanina amonialiase (PAL) (perda de uma molécula de amônia), originam as unidades básicas dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico, respectivamente (Figura 4) (Simões et al., 2007).

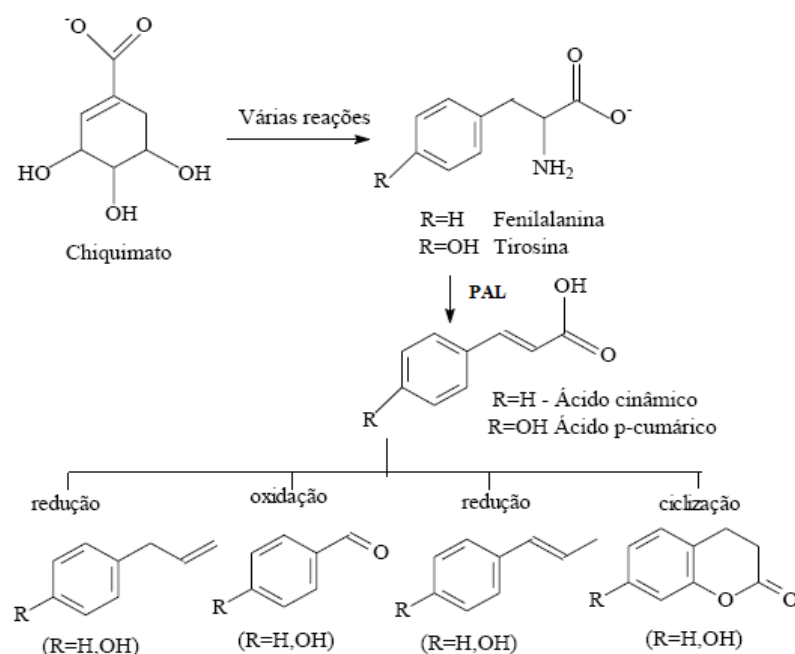


FIGURA 4 Rota de biossíntese de fenilpropanoides.
 FONTE: Simões et al. (2007).

Os ácidos cinâmicos e *p*-cumárico, por meio de reações de redução enzimática, oxidações com degradação de cadeias laterais e ciclizações intermoleculares, levam à formação de fenilpropanoides. Estes são compostos aromáticos que apresentam, geralmente, um grupo funcional éter-metílico ligado ao anel aromático (Figura 5). Os compostos fenólicos também são formados pela via metabólica do ácido chiquímico (Bowles, 2003; Simões et al., 2007).

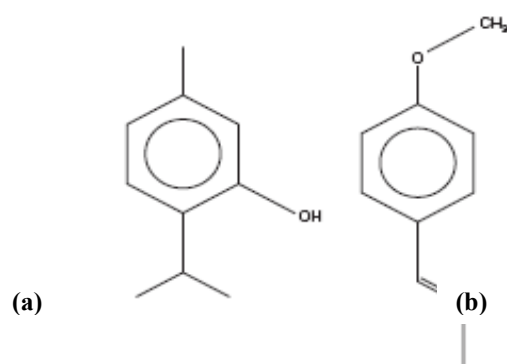


FIGURA 5 Estruturas químicas do timol (a) um fenol e anetol (b) um fenilpropanoide.

2.3.2 Métodos de extração de óleos essenciais

O método de extração de óleos essenciais empregado varia conforme a localização do óleo volátil na planta e com a proposta de utilização do mesmo; as técnicas de extração estão sendo cada vez mais aperfeiçoadas e viabilizam a produção com uma determinada composição e pureza desejada. Os métodos mais comuns estão sumarizados a seguir:

2.3.2.1 Enfloração (*Enfleurage*)

Esse método já foi muito utilizado, mas atualmente é empregado apenas por algumas indústrias de perfumes, no caso de algumas plantas com baixo teor

de óleo de alto valor comercial. É empregado para extrair óleo volátil de pétalas de flores (laranjeiras, rosas); que são depositadas, a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante um certo período de tempo. Em seguida, estas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo volátil, o álcool é destilado a baixa temperatura e o produto assim obtido possui alto valor comercial (Simões et al., 2007).

2.3.2.2 Arraste por vapor d'água

A extração por arraste com vapor de água pode ser considerada a mais simples e segura e, inclusive, a mais antiga, pois é mencionada em textos tão antigos como a Bíblia. A destilação por arraste com vapor, empregada para a extração da maioria dos óleos essenciais é uma destilação de dois líquidos imiscíveis e consiste, em resumo, em uma vaporização à temperaturas inferiores às de ebulição de cada um dos componentes voláteis, por efeito de uma corrente direta de vapor d'água, a qual exerce a dupla função de aquecer a mistura até sua temperatura de ebulição e diminuir a temperatura de ebulição por adicionar pressão de vapor, que se injeta nos componentes voláteis dos óleos essenciais. Os vapores que saem do “pescoço de ganso” se esfriam em um condensador de onde regressam à fase líquida, os produtos imiscíveis, água e óleo essencial e finalmente se separam em um decantador florentino (Bandoni & Czepak, 2008).

Os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, sendo, por isso, arrastados pelo vapor d'água. Em pequena escala, emprega-se o aparelho de Clevenger. O óleo volátil obtido, após separar-se da água, deve ser seco com Na_2SO_4 anidro. Esse procedimento, embora clássico, pode levar à formação de artefatos em função da alta temperatura empregada. Preferencialmente, esse método é utilizado para extrair óleos de plantas frescas.

A Farmacopéia Brasileira IV preconiza o uso de um aparelho tipo Clevenger, com modificações (Simões et al., 2007).

2.3.2.3 Extração com solventes orgânicos

Os óleos voláteis são extraídos, preferencialmente, com solventes apolares (éter etílico, éter de petróleo ou diclorometano), entretanto, estes extraem outros compostos lipofílicos, além dos óleos voláteis. Por isso, os produtos assim obtidos raramente possuem valor comercial (Simões et al., 2007).

2.3.2.4 Prensagem (ou expressão)

Esse método é empregado para a extração dos óleos voláteis de frutos cítricos. Os pericarpos desses frutos são prensados e a camada que contém o óleo volátil é, então, separada. Posteriormente, o óleo é separado da emulsão formada com a água através de decantação, centrifugação ou destilação fracionada (Simões et al., 2007). De acordo com Baldoni & Czepak (2008), sua aplicação é conhecida desde o ano de 1776. Rodano classificou em várias etapas os fenômenos que ocorrem durante a extração do óleo, conforme segue adiante:

- a) Dilaceração da epiderme e dos tricomas que contém a essência.
- b) Criação na casca de áreas com pressão maior que a circundante, através das quais o óleo essencial flui para o exterior.
- c) Abrasão da casca, com a formação de pequenas partículas da raspagem. A extração do óleo essencial é realizada sobre a fruta inteira ou sobre a casca, e em ambos os processos podem ser realizados por um processo manual ou mecânico.

Todos os métodos anteriormente mencionados se baseiam na ruptura das glândulas secretoras de óleo e no recolhimento imediato da essência para evitar que seja absorvida pelo córtex esponjoso que resulta depois deste tipo de

processamento. Por essa razão todas as máquinas que processam os citros contam com um sistema de aspersão de água que molha constantemente a superfície do fruto.

2.3.2.5 Extração por CO₂ supercrítico

Esse método permite recuperar os aromas naturais de vários tipos e não somente óleo volátil, de modo bastante eficiente e, atualmente, é o método de escolha para extração industrial de óleos voláteis. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO₂ é inicialmente liquefeito através de compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31°C. Nessa temperatura, o CO₂ atinge um quarto do estado, no qual sua viscosidade é análoga a de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO₂ retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (Simões et al., 2007).

2.3.3 Óleos essenciais em alimentos

Ervas e especiarias, bem como os óleos essenciais e alguns de seus componentes são, originalmente, adicionados a alimentos com a finalidade de alterar ou potencializar seu sabor e aroma. No entanto, por causa de suas propriedades biológicas, podem estender a vida de prateleira de alimentos crus e processados, por meio da redução da taxa de crescimento microbiano, bem como sua viabilidade celular.

Um número de componentes de óleos essenciais tem sido registrado pela Comissão Europeia para utilização como aromatizante em gêneros alimentícios. Os compostos registrados são caracterizados por não apresentarem qualquer risco à saúde do consumidor e incluem entre outros carvacrol, carvona,

cinamaldeído, citrato, *p*-cimeno, eugenol, limoneno, mentol e timol (Commission Decision of 23 January, 2009).

A conservação de alimentos tornou-se um problema complexo. Novos produtos são, constantemente, introduzidos no mercado, exigem uma vida útil mais longa e uma maior garantia de liberdade contra patógenos de origem alimentar (Wilson & Droby, 2000). O uso excessivo de conservantes químicos, questionado em virtude de seu potencial carcinogênico, atributos teratogênicos e toxicidade residual, tem levado a um aumento da pressão sobre os fabricantes de alimentos para substituição destes agentes por técnicas alternativas de preservação classificadas como “naturais”. Consequentemente há um interesse considerável na pesquisa da possibilidade do uso de produtos naturais tais como óleos essenciais, extratos de plantas comestíveis e medicinais ervas e especiarias (Friedman et al., 2002; Aligiannis et al., 2001).

Poucos conservantes, contendo óleos essenciais, estão comercialmente disponíveis. “DMC Base Natural” é um conservante, produzido pela DOMCA S.A., (Alhendin, Granada, Spain), é composto por 50% de óleos essenciais de alecrim, sálvia e citrus e 50% de glicerol (Mendoza-Yepes et al., 1997). “Protecta One” e “Protecta Two” são misturas de extratos de ervas, produzidos por Bavária Corp. Apopka, FL, USA e são classificados como GRAS (seguros para consumo) nos Estados Unidos. Embora o conteúdo preciso não seja divulgado pelo fabricante, provavelmente, contém um ou mais óleos essenciais dispersos em soluções de citrato de sódio e cloreto de sódio, respectivamente (Cutter, 2000).

A tecnologia de “obstáculos ou barreiras” que envolve técnicas de preservação múltiplas simultâneas é realizada, com sucesso, no controle de patógenos e na manutenção da qualidade dos alimentos durante o armazenamento (Leistner, 2000). Diversos sinergismos potenciais, entre componentes de óleos essenciais e conservantes ou métodos de conservação de

alimentos têm sido sugeridos: baixo pH, baixa atividade de água, agentes quelantes, tensões de oxigênio reduzidas, tratamentos térmicos moderados e elevação de pressão. Tassou et al. (1995) observaram o sinergismo entre NaCl e o óleo essencial de hortelã sobre *Salmonella* Enteritidis e *Listeria monocytogenes*. A ação sinérgica entre o óleo essencial de orégano e nitrito de sódio e seus efeitos sobre o crescimento e produção de toxinas de *Clostridium botulinum* foram observados por Ismaiel & Pierson (1990). Timol e Carvacrol apresentaram efeito sinérgico, quando associados a elevadas pressões hidrostáticas (HHP) na redução das contagens de *L. monocytogenes* (Karatzas et al., 2001). As atividades antibacterianas dos óleos essenciais de tomilho e orégano, sobre *S. typhimurium* e *Staphylococcus aureus*, foram mais pronunciadas em baixos níveis de oxigênio (Paster et al., 1990). Skandamis & Nichas (2001) observaram que o óleo essencial de orégano retardou o crescimento microbiano e suprimiu as contagens de microrganismos deterioradores em carne picada, estocada em embalagem com atmosfera modificada (MAP, 40% CO₂, 30% N₂ e 30% de O₂). Quando em contraste, a inibição não foi pronunciada em amostras estocadas em atmosfera comum.

Para aplicação de óleos essenciais em alimentos, o impacto sensorial deve ser considerado. Se elevadas concentrações, são necessários, para atingir atividades desejadas, níveis inaceitáveis de sabor e aroma inapropriados podem ser percebidos (Gutierrez et al., 2008a; Nazer et al., 2005; Hsieh et al., 2001). O sabor de filés de carne, adicionados de óleo essencial de orégano 0,8% (v/p), foi aceitável após estocagem a 5°C e cocção (Tsigarida et al., 2000). O sabor, odor e cor de carne picada, contendo 1% de óleo essencial de orégano, foram afetados, positivamente, durante a estocagem, sob atmosfera modificada e vácuo a 5°C. As alterações foram, praticamente, imperceptíveis após o cozimento (Skandamis & Nichas, 2001). Mejlholm & Dalgaard (2002) reportaram que óleo de orégano, adicionado em filés de bacalhau (0,05% v/p), produziu um sabor perceptível e

aceitável, que diminuiu, gradualmente, durante o armazenamento a 2°C. Óleos de tomilho e orégano, distribuídos na superfície de *Robalo asiático* (0,05%), imprimiram um odor de ervas que, durante o armazenamento por 33 dias/0-2°C, tornou-se mais pronunciado (Harpaz et al., 2003). Ouattara et al. (2001) avaliaram os aspectos sensoriais de aparência, odor e sabor de camarões irradiados e tratados com óleo essencial de tomilho. Os aspectos sensoriais não foram afetados pela irradiação e adição do óleo a 0,9%, no entanto, a adição de óleo essencial de tomilho 1,8% resultou em redução da aceitabilidade. Amostras de alface, tratadas com tomilho e erva-cidreira, em concentrações de 500 e 1000 ppm, respectivamente, foram rejeitadas por provadores que perceberam “odores químicos” pronunciados (Gutierrez et al., 2008b).

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

Para se obter o mesmo desempenho antimicrobiano de óleos essenciais *in vitro*, em ensaios com matrizes alimentares, concentrações mais elevadas são necessárias. A taxa é de duas vezes para leite semidesnatado (Karatzas et al., 2001), dez vezes em salsichas (Pandit & Shelef 1994), 50 vezes em sopas (Ultee & Smid 2001) e de 25 a 100 vezes em queijos (Mendoza-Yepes et al., 1997).

2.3.4 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

O estudo da atividade *in vitro* de óleos essenciais e seus constituintes sobre patógenos e bactérias deterioradoras têm sido realizado por diversos autores (Smith-Palmer et al., 1998; Dorman & Deans, 2000; Delaquis et al., 2002; Mourey & Canillac, 2002; Bassole et al., 2003; Burt & Reinders, 2003; Oussalah et al., 2007; Liolios et al., 2009). Foram avaliados, também, em diversas matrizes alimentares, como salsichas tipo hotdogs (Singh et al., 2003); ricota fresca (Mendonça, 2004; Alarcón, 2007); alface e cenoura (Singh et al., 2002); salsichas (Bussata et al., 2008; Lemay et al., 2002); peixes (Lin et al., 2004); presunto (Gill et al., 2002); carnes (Tsigarida et al., 2000; Skandamis & Nichas, 2001; Vrinda Menon & Garg, 2001; Solomakos et al., 2008); chocolates (Kotzekidou et al., 2008); arroz (Ultee et al., 2000) e frutas (Roller & Seedhar, 2002).

Os mecanismos de ação dos óleos essenciais, no entanto, não são completamente compreendidos. Considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos, é mais provável que a atividade bacteriana seja atribuída não a um mecanismo específico, mas, sim, à existência de diversos alvos nas células (Figura 6) (Carson et al., 2002). Uma importante característica dos óleos essenciais é sua hidrofobicidade, fato que permite a partição dos lipídios da membrana celular bacteriana perturbando sua estrutura e sua função (Sikkema et al., 1994, 1995). O efluxo de K^+ geralmente é o primeiro sinal de dano e, muitas vezes, é seguido pelo extravasamento de constituintes citoplasmáticos incluindo ATP. A perda da permeabilidade diferencial da membrana citoplasmática é considerada a causa da morte celular. Outros eventos que poderiam levar à disfunção da membrana e consequentes perturbações incluem dissipação das duas componentes da força próton motiva (gradiente de pH e potencial elétrico), ambos por alterações nos transportes de íons ou despolarização, por meio de alterações na estrutura da membrana; interferência

com o sistema de geração de energia (ATP) na célula; e a inibição enzimática impedindo a utilização de substrato para produção de energia (Helander et al., 1998; Cox et al., 2000; Lambert et al., 2001; Ultee et al., 2002). Os componentes de óleos essenciais parecem atuar nas proteínas de membranas celulares. Moléculas carbônicas lipofílicas podem se acumular na bicamada lipídica, distorcendo as interações lipídio-proteína; alternativamente, a interação direta, entre compostos lipofílicos e partes hidrofóbicas das proteínas, é possível (Juven et al., 1994; Sikkema et al., 1995).

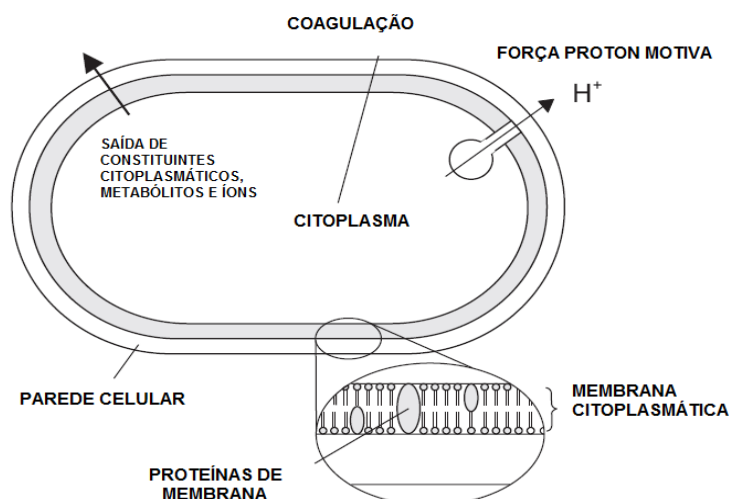


FIGURA 6 Localidades e mecanismo de ação de componentes dos óleos essenciais em células bacterianas. Danos à membrana citoplasmática e proteínas de membrana; efluxo de constituintes intracelulares; coagulação do citoplasma e depleção da força próton motiva.

FONTE: Burt (2004).

Cox et al. (2000) mostraram que o óleo essencial, obtido de uma árvore produtora de chá que continha terpinen-4-ol (um monoterpene cíclico), inibiu a respiração oxidativa em *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus* e leveduras, em

sua concentração mínima inibitória, além de causar danos a sua membrana e aumentar sua permeabilidade.

Em estudos em que é avaliada a atividade de diversos óleos sobre microrganismos sugere-se uma maior susceptibilidade de bactérias Gram-positivas a estes agentes quando comparadas as Gram-negativas. Organismos Gram-negativos são menos sensíveis, provavelmente, em virtude da complexidade de sua parede celular, apresentando uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS), a qual restringe a difusão de compostos hidrofóbicos. Os Gram-positivos, em contraste, apresentam uma parede simples composta por glicoproteínas associadas a ácidos teicoicos (Lambert et al., 2001; Vardar-Unlu et al., 2003; Walsh et al., 2003). Farag et al. (1989) estudaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de sálvia, tomilho, folhas de alecrim, botões florais de cravo e cominho sobre espécies Gram negativas (*Pseudomonas fluorescens*, *E. coli* e *Serratia marcescens*) e Gram-positivas (*S. aureus*, *Micrococcus* spp., *Sarcina* spp. e *Bacillus subtilis*). Os autores observaram que os óleos essenciais de sálvia, cominho, alecrim e seus principais componentes apresentaram nenhum ou mínimo efeito sobre as bactérias Gram-negativas testadas. Os óleos de cravo e tomilho foram, fortemente, efetivos em concentrações de 0,75-1,5mg.mL⁻¹ sobre *S. aureus* e *Micrococcus* spp., enquanto zonas de inibição reduzidas foram reportadas para bactérias Gram-negativas. Entretanto, nem em todos os estudos com óleos essenciais há conclusões de que bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis. Em um estudo com óleo essencial de menta (*Mentha piperita*) foram encontradas maiores reduções nas contagens de células viáveis de *Salmonella enteritidis* quando comparadas a *L. monocytogenes* (Tassou et al., 1995).

Dentre as bactérias Gram-negativas, as do gênero *Pseudomonas* sp., são as que apresentam maior resistência a agentes antimicrobianos naturais (*P. aeruginosa* e terpenóides/carvacrol/timol, Griffin et al (1999); *P. aeruginosa* e

pimentão (Careaga et al., 2003); *P. fluorescens* e urucum (Galindo-Cuspinera et al., 2003).

Enquanto diferenças estruturais nas células microbianas podem contribuir para resistência ou sensibilidade a óleos essenciais, diferenças metabólicas, também, são relevantes. Entre as bactérias Gram-positivas geralmente sensíveis, as bactérias ácido-láticas (LAB) são mais resistentes. Sua habilidade de gerar ATP, pela sua fosforilação em nível de substrato, contribui para esta resistência. Diferenças em níveis internos de ATP em *L. monocytogenes* e *Lactobacillus sakei*, após tratamento com eugenol, fundamentam esta explicação (Gill & Holley, 2003). A maior capacidade de superar condições de stress osmótico e responder mais efetivamente ao efluxo de K^+ causado por estes agentes antimicrobianos, também, exerce influência (Holley & Patel, 2003).

Novos agentes patogênicos de origem alimentar, ditos emergentes, ganharam destaque nos últimos 20 anos: *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter* spp., *E. coli* O157:H7; e os psicotróficos *L. monocytogenes* e *Y. enterocolitica*. A busca de tecnologias efetivas no controle destes patógenos tem concentrado a atenção nos últimos tempos. Em estudos recentes, uma mistura de ervas (“Protecta Two”) a 2% (p/v) foi utilizada na água de resfriamento de aves reduzindo as contagens de *Campylobacter* e *E. coli* em 2 Log_{10} UFC.mL⁻¹ (Dickens et al., 2000). Etapas de preservação secundárias, que poderiam reduzir a viabilidade e o crescimento de *L. monocytogenes*, em alimentos refrigerados prontos para o consumo estão sob estudo. De diversos agentes antimicrobianos naturais testados, o isoeugenol foi o mais efetivo, causando reduções de 4,6 Log_{10} UFC.mL⁻¹ de *L. monocytogenes*, em concentrações de 100 ppm, em conjunto com ciclos de congelamento e descongelamento a -20°C (Cressy et al., 2003). Solomakos et al. (2008) avaliaram o efeito do óleo essencial de tomilho e

sua interação com a bacteriocina nisina sobre *E. coli* O157:H7, em carne moída bovina, encontrando efeito em concentrações de 0,6 e 0,9%.

A composição, estruturas, bem como os grupos funcionais dos óleos essenciais desempenha um papel importante na atividade antimicrobiana. Componentes com estruturas fenólicas como carvacrol, eugenol e timol são mais efetivos (Dorman & Deans, 2000). Óleos com elevados níveis de eugenol (Pimenta-da-Jamaica, folha e botões de Cravo da Índia, louro e folhas e canela), aldeídos cinâmicos (casca de canela e óleo de cássia) e citral são, geralmente, antimicrobianos fortes. A atividade de sálvia e alecrim está relacionada à presença de borneol e outros constituintes fenólicos; carvacrol, *p*-cimeno e timol são, provavelmente, responsáveis pela atividade em orégano, tomilho e segurelha (Davidson & Naidu, 2000).

A atividade biológica de um óleo essencial está relacionada com a configuração química de seus componentes, as proporções nas quais os componentes estão presentes e a interação entre eles. Um efeito aditivo é observado quando o efeito combinado é igual ao somatório dos efeitos individuais (Dorman & Deans, 2000). O antagonismo ocorre, quando o efeito de um ou ambos os compostos é menor, quando eles são aplicados em conjunto do que quando aplicados individualmente; o sinergismo é observado, quando o efeito das substâncias combinadas é maior do que a soma dos efeitos individuais (Davidson & Parish, 1989). Lambert et al. (2001), avaliando a concentração inibitória do óleo essencial de orégano e seus componentes majoritários timol e carvacrol, encontraram um efeito aditivo destes compostos quando testados sobre *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Delaquis et al. (2002) observaram que frações de óleos essenciais de coentro e endro-dill apresentaram efeito maior, quando aplicados em conjunto do que quando utilizados em frações isoladas; neste mesmo trabalho, para ampliar o espectro antimicrobiano, uma

fração do óleo de coentro, sem ação sobre bactérias Gram-negativas, foi combinado com óleo de eucalipto potencializando sua atividade.

Testes de atividade antimicrobiana de óleos essenciais podem ser classificados em quatro grupos: difusão, diluição (Rios et al., 1988), impedância e densidade óptica (Tassou et al., 2000). Os métodos comumente utilizados, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), são os de difusão em disco, difusão utilizando cavidades feitas em ágar, diluição em ágar e diluição em caldo (Takaisi-kikuni et al., 2000; Canillac & Mourey, 2001; Cimanga et al., 2002; Shafi et al., 2002; Nostro et al., 2004). Desses, a diluição em caldo mostrou ser o que melhor disponibiliza dados quantitativos, enquanto a difusão em placa de Petri se constitui em um método amplamente qualitativo, motivo pelo qual esses métodos (diluição e difusão) não são, necessariamente, comparáveis (Nascimento et al., 2007). A concentração inibitória mínima (CIM) é, frequentemente, citada como uma mensuração do desempenho antibacteriano dos óleos essenciais. A definição da CIM difere entre várias publicações e constitui em um obstáculo para a comparação entre os estudos (Burt, 2004). Entretanto, a CIM de um determinado óleo essencial pode ser definida claramente como a menor concentração do óleo essencial, capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo, em testes de sensibilidade, por diluição em ágar ou caldo (National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS, 2003).

2.3.5 Atividade antioxidante de óleos essenciais

Os antioxidantes são compostos capazes de prevenir ou retardar o processo de oxidação causado por radicais livres e espécies reativas de oxigênio em alimentos e sistemas biológicos (Choi et al., 2005). Os compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos, é um dos mecanismos

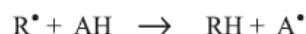
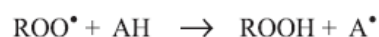
de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e, também, na medicina.

Radicais livres são espécies químicas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, com existência independente e, altamente reativos, capazes de causar danos a outras moléculas pela extração de elétrons buscando atingir sua estabilidade (Sharif Ali et al., 2008). Os radicais livres compreendem as espécies reativas de oxigênio (ROS), metabólitos fisiológicos que incluem o radical anion superóxido (O_2^-), oxigênio singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxil (OH^-) e óxido nítrico (NO). Pequenas quantidades de ROS são continuamente formadas durante o desenvolvimento do organismo, como resultado do metabolismo do oxigênio. Seu acúmulo (stress oxidativo) conduz a danos oxidativos deletérios da função celular por diversas alterações como peroxidação lipídica, inativação enzimática, danos ao DNA (mutagênese), além de estar envolvido com o processo de envelhecimento (Jun et al., 2001).

As ROS (*Reactive oxygen species*), em organismos eucarióticos, são reguladas por enzimas antioxidantes endógenas: superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase; entretanto, a produção excessiva de espécies reativas, induzida pela exposição a substâncias oxidantes externas, ou falhas nos mecanismos de defesa, pode causar danos a estruturas celulares; DNA (bases de purina e pirimidina e esqueleto de desoxirribose); lipídios (resíduos de ácidos graxos de fosfolipídios) e proteínas (cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, principalmente, cisteína e metionina) (Valko et al., 2006). Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças como cardiopatias, artrite, diabetes, enfisema, câncer, doenças do sistema imune, disfunção cerebral e esclerose múltipla (Jun et al., 2001; Bianchi & Antunes 1999).

Os antioxidantes podem inibir ou retardar reações de oxidação de duas maneiras. No primeiro modo, os compostos conhecidos como *antioxidantes*

primários atuam interceptando os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, interrompendo a reação em cadeia, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA (Figura 7). Compostos tais como as vitaminas C (ácido ascórbico), E (α -tocoferol) e A, flavonoides e carotenoides são, extremamente importantes, na interceptação dos radicais livres. Num segundo modelo, os *antioxidantes secundários* operam por mecanismos variados como ligações com íons metálicos, interceptação de oxigênio, conversão de hidroperóxidos, absorção de radiação UV e desativação de oxigênio singlete (Gordon, 2001; Bianchi & Antunes 1999).



onde: ROO^\bullet e R^\bullet - radicais livres; AH - antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e A^\bullet - radical inerte

FIGURA 7 Mecanismo de ação para os antioxidantes primários; creditado a óleos essenciais e seus componentes.
FONTE: Ramalho & Jorge (2006).

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

A oxidação lipídica é um dos principais problemas enfrentados pela indústria de alimentos. É responsável por sabores e odores rançosos dos

produtos com conseqüente queda de qualidade sensorial, valor nutricional e segurança causada pela formação de compostos tóxicos secundários. Diversos antioxidantes sintéticos como o buti-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) são utilizados no controle das reações de oxidação; no entanto estes apresentam efeitos tóxicos adversos. Nos últimos tempos tem aumentado a demanda dos consumidores por produtos naturais “livres de aditivos químicos”, levando a indústria de alimentos a considerar a incorporação de antioxidantes naturais em produtos diversos (Ahn et al., 2002; Badi et al., 2004). No presente existe um interesse crescente em pesquisas científicas e industriais por condimentos e ervas aromáticas em virtude de suas fortes propriedades antioxidantes, propriedades estas relacionadas à presença de diversas substâncias como vitaminas, flavonóides, terpenóides, carotenóides, fitoestrógenos e minerais (Callucci et al., 2003).

Alguns exemplos de compostos antioxidantes comumente encontrados em condimentos e ervas e seus óleos essenciais são galatol, biflorina, os isômeros eugenol e acetato de eugenila em Cravo da Índia (Lee & Shibamoto, 2001); carnosol, ácido carnósico, rosmanol, rosmaridifenol, rosmadial, rosmariquinona, e vários etil e metil esterres em alecrim e sálvia (Pizzale et al., 2002); flavonóides, ácidos ferúlicos, piperinas, amidas em pimenta preta (Peter, 2000); os isômeros monoterpênicos fenólicos timol e carvacrol em orégano, tomilho e segurelha (Peter, 2000; Pizzale et al., 2002). De acordo com um banco de dados fitoquímicos (United States Department of Agriculture - USDA, 2003) o número de diferentes compostos antioxidantes em soja pode alcançar 42, 34 em orégano, 32 em tomilho.

2.3.5.1 Oxidação lipídica em alimentos

Gorduras, óleos e alimentos à base de lipídeos são deteriorados por meio de diversas reações ocorridas no aquecimento ou ao longo do período de

estocagem. Os principais processos de deterioração são reações de oxidação e seus produtos que resultam na queda do valor nutricional e qualidade sensorial, uma vez que envolve a perda de ácidos graxos essenciais, vitaminas e geração de compostos tóxicos, causando adicionalmente deterioração de flavor (*off flavor*), textura e cor (Estévez & Cavas, 2006).

Os lipídios ocorrem em quase todas as matérias primas, utilizadas na fabricação dos mais diversos gêneros alimentícios, apresentando como principais classes os mono, di e triacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios (constituição de membranas biológicas) esteróis e outras substâncias. As gorduras são os principais constituintes de diversos alimentos como maioneses, molhos, margarinas e óleos para fritura. Estes lipídios são quase em sua totalidade triacilgliceróis e estes componentes são as mais significantes fontes potenciais de *off-flavors* oxidativos em alimentos. Os tecidos animais e vegetais utilizados como alimentos e os fosfolipídios presentes em membranas biológicas, constituem o principal substrato para deterioração oxidativa (Gordon, 2001).

Os lipídios podem ser oxidados por diversos caminhos: *Reações hidrolíticas* que são catalisadas por lipases ou pela ação de calor e umidade gerando ácidos graxos livres; *Oxidação enzimática* por ação de enzimas lipoxigenases que atuam catalisando a adição do oxigênio à cadeia carbônica poliinsaturada, com formação de peróxidos e hidroperóxidos capazes de se envolver em diferentes reações degradativas; *Fotoxidação* promovida, essencialmente, pela radiação UV em presença de fotossensibilizadores (clorofila, mioglobina) que absorvem energia luminosa e transferem para o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$), gerando o estado singlete ($^1\text{O}_2$), capaz de reagir com duplas ligações, formando hidroperóxidos que, por degradações posteriores, dão origem a aldeídos álcoois e hidrocarbonetos; *Autoxidação* que é a reação do oxigênio atmosférico com ácidos graxos insaturados, dependentes de luz e calor, com

formação de produtos estáveis (Figura 8). É o principal mecanismo de oxidação de óleos e gorduras (Ramalho & Jorge, 2006; Silva et al., 1999).

As reações de oxidação lipídica representam um importante aspecto determinante da qualidade de carne e produtos cárneos, pois, afetam diretamente seus aspectos sensoriais.

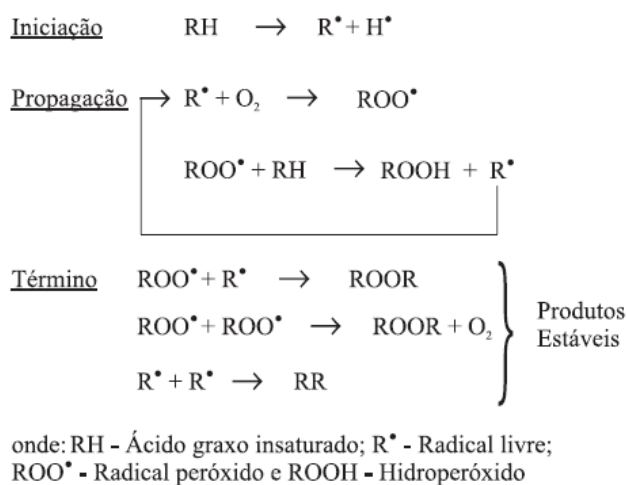


FIGURA 8 Mecanismo de autoxidação proposto por Farmer et al., (1942).

Iniciação: ocorre a formação dos radicais livres do ácido graxo devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo, em condições favorecidas por luz e calor.

Propagação: os radicais livres que são prontamente susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico, são convertidos em outros radicais, aparecendo os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes. Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico.

Término: dois radicais combinam-se, com a formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis).

FONTE: Ramalho & Jorge (2006).

A inibição dos processos de oxidação é importante para os segmentos participantes da cadeia produtiva de alimentos, e podem ser inibidos por diversos métodos que incluem a prevenção do acesso do oxigênio, usos de baixas temperaturas e abrigo da luz, agentes antioxidantes e uso de embalagens apropriadas (Pokorný, 2001). Antioxidantes sintéticos e naturais como condimentos, ervas e seus extratos e óleos essenciais são comumente utilizados com sucesso na indústria de produtos cárneos (Descalzo & Sancho, 2008).

2.4 Descrição botânica e óleo essencial de *Satureja montana* L.

O gênero *Satureja* L. compreende mais de 30 espécies cujos centros de distribuição estão localizados na porção oriental da região mediterrânea Europeia, Ásia ocidental, Norte da África, Ilhas Canárias e América do Sul (Slavikovska et al., 2001; Azaz et al., 2005).

Satureja montana L., comumente conhecida como segurelha de inverno ou segurelha montanhosa (Figura 9), é pertencente à família Lamiaceae, subfamília Nepetoideae, tribo Mentheae. É uma planta perene semi-arbustiva (20-30cm) que habita zonas áridas, ensolaradas e rochosas. É nativa da região mediterrânea, podendo ser encontrada por toda Europa, Rússia e Turquia. (Slavkovska et al., 2001; Mastelić & Jerković, 2003; Bezbradica et al., 2005; Četković et al., 2007; Silva et al., 2009).

A segurelha de inverno é uma forte erva aromática e tem sido usada há centenas de anos como condimento de alimentos e chás; é utilizada na comida mediterrânea, principalmente, como tempero de carnes e peixes (Prieto et al., 2007; Silva et al., 2009). Na medicina tradicional e homeopática, a segurelha de inverno é utilizada em várias enfermidades, principalmente digestiva, como cólica e diarreia; estimulantes, expectorantes, carminativos, anticatarrais e afrodisíaco (Četković et al., 2007).

Quanto a propriedades biológicas e valor econômico, patentes Europeias e internacionais foram, recentemente, registradas para extratos de *S. montana* alegando suas propriedades anti-fertilidade; bioatividades foram descritas para este espécime, incluindo potente atividade anti-HIV-1 de seu extrato aquoso e atividade antiproliferativa em células humanas eritroleucêmicas K562 do óleo essencial do vegetal (Yamasaki et al., 1998; Lampronti et al., 2006).



FIGURA 9 Aspecto geral do condimento seco e espécime vegetal de *Satureja montana* L.

O óleo essencial de *Satureja montana* é utilizado na medicina tradicional popular, para diversos distúrbios, em virtude de suas atividades bactericidas, digestivas, espectorantes, fungicidas, laxativas, antidiuréticas, sedativas e antioxidantes; seu óleo é aplicado na indústria alimentícia como agente flavorizante em sopas, salsichas, carnes enlatadas e molhos picantes. É usado, ainda, em formulas dermatológicas, para cura de picadas de insetos, abelhas e vespas (Bezbradica et al., 2005). Em virtude do forte caráter fenólico de seu óleo essencial, é utilizado como reminiscência do sabor e fragrância dos óleos comerciais de orégano e tomilho (Skočibušić & Bezić, 2003).

A composição do óleo essencial de *S. montana* é variável dependendo da localização e estágio vegetativo da planta, método de extração e tratamento da erva antes da extração. De acordo com a maioria dos autores, os componentes mais abundantes são os compostos fenólicos timol e carvacrol, seguidos de monoterpenos como *p*-cimeno e γ -terpineno (Mastelić & Jerković, 2003; Radonic & Milos, 2003; Skočibušić & Bezić, 2003; Prieto et al., 2007; Čavar et al., 2008; Silva et al., 2009). Em contrapartida, Slavkoska et al. (2001) encontraram como constituintes majoritários hidrocarbonetos monotênicos e sesquiterpênicos e álcoois. Alguns autores, também, relatam a presença de outros componentes presentes no óleo essencial *S. montana* como cariofileno e geraniol (Sevarda et al., 1986).

Uma das características da subfamília Nepetoideae é que seus representantes apresentam em sua constituição 0,5% de óleo essencial (El-Gazzar & Watson, 1970).

A atividade biológica e o uso dos óleos essenciais, nas diferentes indústrias, são dependentes de sua composição, a qual é afetada por diversos fatores. O efeito antioxidante do óleo essencial de *S. montana* tem sido relacionado à presença de grupamentos hidroxil em seus compostos fenólicos (timol e carvacrol) (Radonic & Milos, 2003). A atividade antimicrobiana do óleo é atribuída à presença de timol e carvacrol, uma vez que numerosos estudos evidenciam o poder bactericida destes compostos sobre microrganismos patogênicos (Juven et al., 1994; Helander et al., 1998; Lambert et al., 2001; Ultee et al., 2002;); entretanto, os constituintes em menor concentração, também, devem ser considerados, bem como a interação entre eles, pois, estes afetam o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais (Skočibušić & Bezić, 2003).

Clostridium perfringens

2.5.1 Características morfofisiológicas

C. perfringens é um microrganismo Gram-positivo, imóvel e anaeróbico. Em condições desfavoráveis para o crescimento células vegetativas podem diferenciar para forma de endósporos metabolicamente dormentes. Algumas cepas são capazes de formar cápsulas predominantemente compostas de polissacarídeos. As células possuem morfologia de bastonetes com dimensões que podem variar de 0,5 a 2µm de diâmetro podendo atingir até 30µm de comprimento (Mitchell, 2001; Silva et al., 2007; Carman et al., 2008).

É capaz crescer em temperaturas entre 15 e 50°C com um ótimo de 45°C para a maioria das linhagens. O tempo de geração (G_t) para a maioria das estirpes a temperaturas entre 33 e 49°C é abaixo de 20 minutos e G_t de 8 minutos já foram relatadas (Labbé, 2000). São sulfito redutoras, fermentadoras de lactose, reduzem o nitrato e hidrolisam a gelatina. O pH ótimo de crescimento é de 7,2 com mínimo entre 5,5 e 5,8 e máximo entre 8,8 e 9,0. A atividade de água mínima é de 0,93. O crescimento é estimulado pela presença de um carboidrato fermentável e inibido por 20% de bile. Em baixas temperaturas pelo contrário as células vegetativas de *C. perfringens* são muito sensíveis com temperatura mínima de crescimento relatada entre 12 e 15°. Morrem rapidamente entre 0 e 10°C e a estocagem por poucos dias sob refrigeração pode levar a uma redução de 3 a 5 ciclos logarítmicos na contagem em placas. São relativamente sensíveis a NaCl, crescendo bem em concentrações de 2% mas não em 6,5% (Silva et al., 2007).

A 45-46°C também fermenta o leite rapidamente, produzindo um tipo de coagulação típica, chamada de coagulação “tempestuosa”. Essa reação caracterizada pelo rompimento e deslocamento do coágulo (devido à produção de gás) pode ser provocada em 5 horas ou menos, a partir de um inóculo pesado de culturas jovens e ativas (Rhodehamel & Harmon, 2001).

C. perfringens podem produzir mais de 13 toxinas diferentes, embora cada cepa produza apenas um número limitado destas existentes. São classificados em cinco tipos A, B, C, D e E, de acordo com a produção de quatro toxinas mais letais: alfa (α), beta (β), epsilon (ϵ) e iota (ι) conforme mostrado na Tabela 1 (Carman et al., 2008).

TABELA 1 Toxinas utilizadas para classificação de *Clostridium perfringens*, enterotoxinas e localização genética

Tipo	α -toxina	β -toxina	ϵ -toxina	ι -toxina	Enterotoxina
A	+	-	-	-	+
B	+	+	+	-	+
C	+	+	-	-	+
D	+	-	+	-	+
E	+	-	-	+	+
Gene	<i>plc</i>	<i>cpb1</i> <i>cpb2</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i> <i>ibp</i>	<i>cpe</i>
Localização Genética	Cromossomo	Plasmídeo	Plasmídeo	Plasmídeo	Plasmídeo/ Cromossomo

FONTE: Brynstad & Granum (2002).

A toxina α é comum a todos os tipos embora seja produzida em maior quantidade pelo tipo A. É uma fosfolipase que hidrolisa a lecitina (lecitinase), não associada a doenças transmitidas por alimentos. Provoca a gangrena gasosa (mionecrose) uma infecção de feridas que atinge animais e humanos. A produção da toxina α pode ser observada em meios contendo gema de ovo, onde as colônias apresentam um halo opaco característico da atividade de lecitinase (Silva et al., 2007).

Os tipos A, C, e D de *C. perfringens* são patógenos humanos, enquanto os tipos B, C, D e E são patógenos animais. O tipo A causa gangrena gasosa em homens e animais, e toxinfecção alimentar em humanos; o tipo B é causador de

disenteria em cordeiros e enterotoxemia em ovinos caprinos e potros; Tipo C *enterite necrótica* (NE) em animais e humanos, além de enterotoxemia em bezerros, leitões e ovelhas; os *C. perfringens* tipos D e E causam enterotoxemia em carneiros, cordeiros e gado (Forsythe, 2002; Granum, 1990).

2.5.1.1 Esporos de *C. perfringens*

Em condições desfavoráveis, para o crescimento, as células vegetativas de *C. perfringens* podem se diferenciar para a forma de esporos, estruturas resistentes a tratamentos como calor, radiação e agentes químicos. O processo de formação de esporos pode levar horas e é acompanhado por alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas.

Estruturalmente, o esporo (Figura 10) apresenta uma camada externa de natureza proteica; em seu interior é encontrada a região do córtex do esporo, composto por peptídeoglicano; no interior, o centro do esporo que contém DNA, ribossomos, enzimas, quantidades significantes de ácido dipicolínico (DPA) e íons Ca^{2+} , além de apresentar um baixo teor de umidade. Pequenas proteínas solúveis ácidas (SASP) estão presentes ligados ao DNA (Mitchell, 2001).

Em condições apropriadas, os esporos podem reverter a sua forma de célula vegetativa. Esta conversão é chamada de germinação e envolve três etapas: ativação, germinação e crescimento. A ativação pode ser alcançada com o aquecimento a temperaturas subletais. Esporos de *clostridium*, também, respondem a pH e álcool, além de poder ser iniciada por diversos nutrientes incluindo aminoácidos, açúcares, lactato e nicotinamida. Esporos de *C. perfringens* podem completar sua germinação em menos de 20 minutos na presença de L-asparagina e íons K^+ (Paredes-Sabja et al., 2008b). Durante a germinação, o centro dos esporos é transformado em citoplasma com ribossomos e área nuclear definida. O período de crescimento subsequente é

caracterizado pela síntese de RNA, proteínas, membranas, parede celular e DNA (Mitchell, 2001).

Recentes estudos com esporos de *C. perfringens* (Paredes-Sabja et al., 2008a; Raju et al., 2007, 2006) têm demonstrado que sua resistência está envolvida com fatores como estrutura de peptídeoglicano do córtex (PG); baixo teor de água no centro do esporo; elevados níveis de DPA; saturação do DNA do esporo com α, β SASP.

Os esporos de *C. perfringens*, isolados de distúrbios alimentares, exibem elevada resistência a fatores ambientais de estresse como calor úmido; estresse induzidos por osmose, nitrito e pH; estocagem sob refrigeração prolongada; pressão hidrostática elevada; fatores que favorecem sua sobrevivência em diversos gêneros alimentícios (Li & McClane, 2006; Paredes-Sabja et al., 2007).

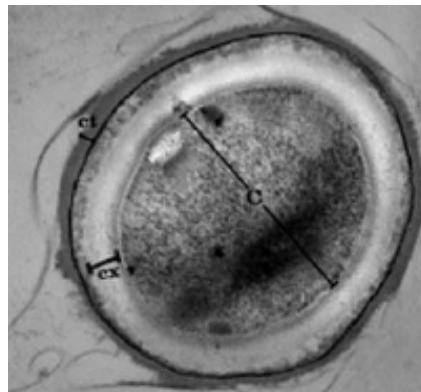


FIGURA 10 Micrografia eletrônica de transmissão de componentes estruturais esporo de *Clostridium perfringens*; *ct* camada externa de natureza protéica; *cx* córtex peptídeoglicano (PG); *c* região central do esporo (core).

FONTE: Novak et al. (2003).

2.5.2 *C. perfringens* como contaminante em alimentos

C. perfringens é encontrado em diversos ambientes incluindo solo, água, ar e vegetação. Seu habitat primário é o trato intestinal de indivíduos saudáveis (10^3 - 10^4 /g de peso seco de fezes) e demais espécies de animais de sangue quente. Com base nestas fontes, pode atingir uma grande variedade de alimentos crus e processados, em especial aves e carnes. É comum a presença de esporos, em carcaças de bovinos e aves, peixes, vegetais, em condimentos, massas, em farinhas, em gelatina, em leite e em pós para preparo de alimentos doces e salgados (Juneja et al., 2003; Silva et al., 2007). A ampla distribuição de esporos tem sido considerada o principal fator de contribuição para doenças de origem alimentar causada por *C. perfringens* (McClane, 2001).

A habilidade de formar esporos e elevadas taxas de crescimento, em amplas faixas de temperaturas, são os fatos que tornam a bactéria capaz de sobreviver e multiplicar em alimentos. A maioria dos casos de distúrbios alimentares, causados por *C. perfringens*, ocorre em estabelecimentos de alimentação que preparam grandes quantidades de alimento, mantidas de um dia para o outro até o momento de servi-lo; locais como restaurantes, hospitais e lares para idosos são os mais associados (Brynstad & Granum, 2002). Resfriamento impróprio, após a cocção (ou lento que é característico de grandes porções de alimentos) e abusos de temperatura de alimentos prontos, contendo carne, são fatores que contribuem para os surtos; os esporos deste microrganismo são tolerantes ao calor e podem sobreviver aos processos térmicos a que são submetidos a maioria dos alimentos. O tratamento térmico pode contribuir para a germinação dos esporos, eliminação da microbiota acompanhante competidora, resultando num crescimento rápido (bactéria se multiplica até níveis causadores de enfermidades) do microrganismo, no resfriamento impróprio e abusos de temperatura, durante a manipulação (Juneja et al., 2009). Como resultado do rápido crescimento, um aumento de $5 \log_{10}$ em

células vegetativas pode ocorrer em 2 horas sob condições ótimas (Taormina et al., 2003).

A US *Food and Drug Administration* (FDA) recomenda para alimentos prontos refrigerados, potencialmente perigosos, a queda de temperatura de 57°C para 21°C em 2 horas e, subsequentemente, para 5°C em 4 horas, para redução do risco do desenvolvimento de patógenos esporulados (FDA, 2005). Apesar de esporos serem a principal preocupação em produtos alimentícios, células vegetativas, também, podem causar problemas em alimentos não cozidos ou pela recontaminação pós-processo.

C. perfringens não é capaz de produzir 13 dos 20 aminoácidos essenciais, e surtos relacionados a este microrganismo são associados a alimentos ricos em proteínas. Cerca de 75% dos casos são atribuídos à carne, produtos cárneos e aves (Johnson & Gerding, 1997; Olsen et al., 2000).

Embora seja uma bactéria anaeróbia, a sensibilidade de *C. perfringens* ao oxigênio é menos acentuada (aerotolerante) do que outros clostrídios, podendo crescer no interior da massa de alimentos. Formas reativas de oxigênio como radicais hidroxil, anion superóxido e peróxido de hidrogênio são capazes de causar danos a moléculas biológicas, e a inibição do crescimento de determinados microrganismos na presença de oxigênio é resultado da ausência de sistemas para eliminar estas espécies reativas. Os clostrídios, em geral, não possuem a enzima catalase, mas as enzimas superóxido dismutase (SOD) e NADH/NADPH peroxidase são amplamente distribuídas, indicando a habilidade de remover superóxidos e peróxidos (Mitchell, 2001). Hewitt & Morris (1975) observaram uma elevada atividade de SOD em *C. perfringens* apresentando maior resistência a oxigênio.

C. perfringens é o terceiro mais comum agente bacteriano causador de surtos alimentares nos Estados Unidos. O organismo causa estimados 250.000 casos levando a 41 hospitalizações e sete mortes por ano (Mead et al., 1999).

Entretanto, o número de casos é subestimado e a maioria das pessoas acometidas não relata a autoridades competentes. Na Noruega, *C. perfringens* foi registrado como a causa mais comum de distúrbios alimentares no período de 1988 a 1995. O número de casos registrados variou entre 202 e 1240 nos EUA, 288 e 4571 no Japão, 562 e 1716 na Inglaterra e País de Gales durante o período de 1983 e 1994 (Labbé, 2000).

2.5.3 Toxinfecção alimentar causada por *Clostridium perfringens* Tipo A

Em pesquisas há demonstrações de que cerca de 2 a 5% da população global de *C. perfringens* carrega o gene *cpe* que codifica para a toxina de maior importância biomédica: *Clostridium perfringens* Enterotoxina (CPE). Os casos relatados de distúrbios, causados por *C. perfringens*, são relacionados, quase em sua totalidade, a linhagens do Tipo A, fato explicado pela grande maioria dos isolados *cpe* positivos serem do Tipo A (McClane & Rood, 2001).

A doença de origem alimentar é resultante da ação da enterotoxina CPE, produzida no intestino delgado do hospedeiro, após a ingestão de no mínimo 10^7 células de *C. perfringens* do Tipo A. A produção da enterotoxina CPE é associada com a formação dos esporos “in vivo”, estimulada pelas condições ácidas do estômago e pelos sais biliares do intestino. Durante o processo de esporulação, as células produzem CPE, que é acumulada no citoplasma da célula mãe e liberada no organismo, juntamente com endósporo maduro (Figura 11), quando ocorre a lise do esporângio (Brynstad & Granum, 2002; Silva et al., 2007).

A CPE é, então, liberada no lúmen intestinal, em que se liga ao epitélio, exercendo sua ação molecular, causando danos histopatológicos responsáveis pela iniciação da perda de fluido intestinal e eletrólitos (McClane & Rood, 2001). São relatados poucos casos de ingestão da toxina preelaborada (Forsythe, 2002).

Após cerca de 8-12h (6-24h) do consumo do alimento contaminado, os sintomas se iniciam, com aguda dor abdominal, diarreia, náuseas, geralmente sem vômitos ou febre. O alimento contaminado quase sempre passa por um tratamento térmico, que elimina a microbiota competitiva enquanto esporos de *C. perfringens* podem sobreviver. A doença comumente é autolimitante com duração de 24h. As mortes podem ocorrer, em consequência de desidratação, principalmente, em pessoas idosas e pacientes muito jovens ou debilitados (Brynstad & Granum, 2002).

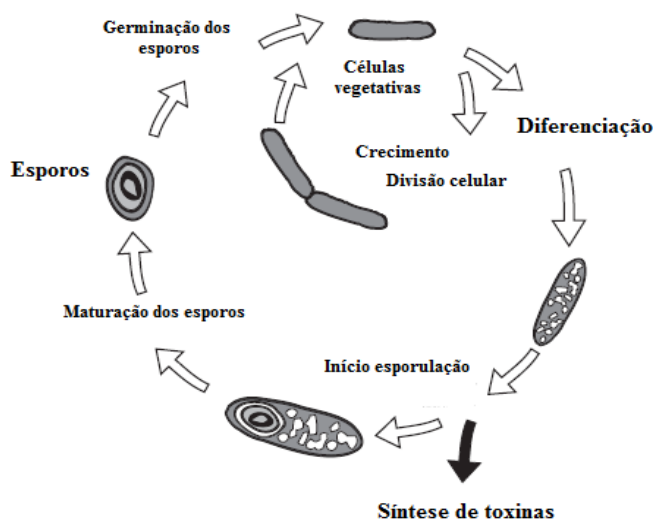


FIGURA 11 Ciclo celular *Clostridium*. Alterações morfológicas associadas à esporulação e síntese de toxina são indicadas.

FONTE: McClane & Rood (2001).

2.5.3.1 *Clostridium perfringens* Enterotoxina (CPE)

Clostridium perfringens Enterotoxina (CPE) (Figura 12) é um polipeptídeo com aproximadamente 35kDa, ponto isoelétrico 4,3, composto por

319 resíduos de aminoácidos. É sensível a pH's extremos e calor com valor de D_{90} de 4 minutos (McClane & Rood, 2001; Forsythe, 2002).

A proteína possui uma estrutura de dois domínios. A extremidade C-terminal (290-319 aminoácidos) contém a região de ligação com as proteínas claudinas 22kDa receptoras localizadas no intestino. Anticorpos sobre a região de ligação podem neutralizar a citotoxicidade da CPE (McClane, 2000).

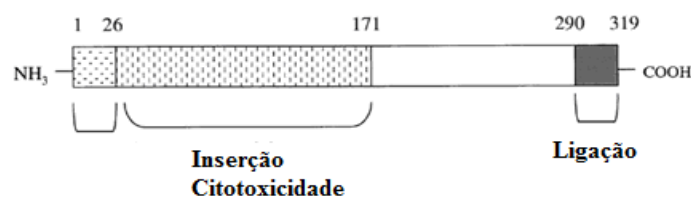


FIGURA 12 CPE e suas regiões funcionais. A enterotoxina possui atividade elevada quando aa 1-26 (34) são removidos; os aa 290-319 são essenciais para ligação aos receptores e 26-171 estão envolvidos na inserção na membrana e citotoxicidade

FONTE: Brynstad & Granum (2002).

A extremidade N-terminal não possui nenhum papel funcional, no entanto a remoção dos aminoácidos de sua extremidade parece estar relacionada com a ativação da toxina. Tripsina e quimiotripsina podem remover esta extremidade e produzir formas ativas de CPE. A presença destas proteases no lúmen intestinal sugere a ativação da CPE durante o distúrbio (Bahl & Dürre, 2001). Os aminoácidos 44-171 estão envolvidos na inserção e citotoxicidade da molécula (Brynstad & Granum, 2002).

O modelo de ação da CPE é caracterizado pela formação de um “pequeno complexo” formado quando a enterotoxina se liga aos receptores intestinais (claudinas); após alterações físicas neste complexo, este interage com uma proteína de c.a 70kDa para formar um “grande complexo” muito

hidrofóbico que causa permeabilidade de moléculas de baixo peso molecular (Figura 13) (McClane, 1997).

Os genes traduzidos para formação da enterotoxina (*cpe*) podem estar localizados tanto em cromossomos quanto em plasmídeos, podendo, portanto ser transmitido via conjugação para isolados *cpe*-negativos. No entanto estudos demonstram que células e esporos de isolados com o gene *cpe* localizado nos cromossomos são mais resistentes a tratamentos térmicos; células vegetativas de linhagens com cópias de *cpe* cromossomais apresentaram valores de $D_{55^{\circ}\text{C}}$ 2 vezes maior que linhagens com gene *cpe* alocados em plasmídeos, e esporos apresentaram valores $D_{100^{\circ}\text{C}}$ 60 vezes superiores. Esta resistência térmica explica a associação *C. perfringens* com cópias cromossomais do gene *cpe* associadas com surtos alimentares, uma vez que os alimentos envolvidos quase sempre são submetidos a um tratamento térmico (Sarker et al., 2000).

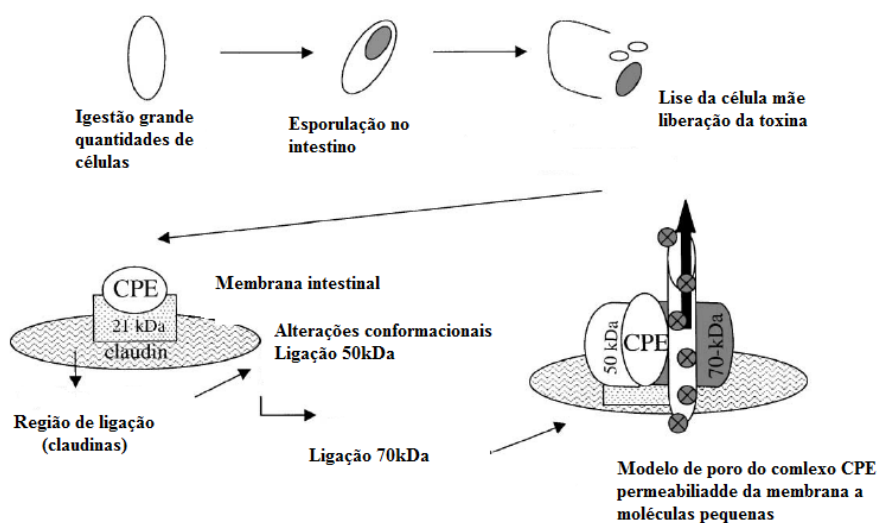


FIGURA 13 Esquema mostrando as principais etapas na toxinfecção causada por *Clostridium perfringens* e seus mecanismos.

FONTE: Brynestad & Granum (2002).

2.6 Nitrito em produtos cárneos curados

Antes da disponibilidade da refrigeração, alimentos, principalmente carne e peixe, eram preservados pelo uso de sal, por meio da redução da atividade de água, que os protegia da deterioração microbiana. Foi no processo de tratar a carne com sal grosso que deu origem às práticas modernas de cura. A cura de produtos cárneos pode ser definida como adição intencional de sal e nitrito, com o propósito de tornar produto mais atrativo sensorialmente e proporcionar uma maior estabilidade durante sua estocagem (Pegg & Shahid, 2000).

O nitrito é o ingrediente chave no processo da cura, sendo responsável pelo desenvolvimento da coloração rósea dos produtos cárneos curados; contribui para o sabor e aroma típicos de carnes curadas, além de prevenir a formação do WOF (“*warmed over flavor*” ou chamado “sabor de requeitado”) e deterioração do flavor de carnes cozidas; atua como conservante por seus efeitos antioxidantes e bacteriostáticos (Jafari & Eman-Djomeh, 2007; Feiner, 2006).

O nitrito (NO_2), tanto de potássio quanto de sódio, é o agente ativo de cura; em contraste, o nitrato (NO_3) não é um agente ativo, sendo reduzido a nitrito, pela ação de bactérias nitrato redutoras, naturalmente presentes na carne, durante o processamento (Varnan & Sutherland, 1995).

A coloração rosa avermelhada de produtos cárneos curados é um dos mais importantes efeitos do processo de cura. A mioglobina (Mb), principal pigmento associado à cor da carne, pode existir no músculo em três estados, nos quais o cofator heme (anel de porfirina com um íon de ferro no centro) responsável pela coloração, liga-se a diferentes elementos químicos. O átomo de ferro, elemento central do anel de porfirina, pode ser encontrado na forma reduzida (Fe^{2+}) ou oxidada (Fe^{3+}); estando no seu estado reduzido, outras moléculas podem complexar e formar compostos com colorações variadas. Na presença de oxigênio, a mioglobina pode se ligar à molécula de O_2 e formar a

oximioglobina ($\text{MbFe}^{+2}\text{O}_2$) de coloração vermelho brilhante (Karl-Otto, 2008). O oxigênio e outros agentes oxidantes como o nitrito podem oxidar o ferro da sua forma Fe^{2+} para Fe^{3+} . Possivelmente a reação inicial na cura consiste na conversão das formas químicas da mioglobina, em especial a oximioglobina, em metamioglobina (MbFe^{+3}), que confere uma coloração marrom à carne (Ramos & Gomide, 2007). No entanto, nas condições presentes na carne (pH entre 5,5 e 6,0), o nitrito é convertido a ácido nitroso (HNO_2) e deste a óxido nítrico (NO), presentes em equilíbrio. O NO formado se combina com a porção heme da metamioglobina para originar o pigmento de nitrosometamioglobina ($\text{MbFe}^{+3}\text{NO}$), altamente instável e que é, rapidamente, reduzida à forma química de nitrosomioglobina ($\text{MbFe}^{+2}\text{NO}$), pigmento de cor vermelho rosado característica de produtos curados crus (Moller e Skibsted, 2002). A nitrosomioglobina, no entanto, é muito instável e a estabilização do complexo pode ser promovida pela desnaturação da molécula de globina pelo aquecimento (50-60°C), formando o pigmento nitrosoemocromo que apresenta cor rósea característica de produtos curados (Ramos & Gomide, 2007).

De acordo com Feiner (2006), para se obter uma coloração característica, intensa e estável de produtos curados, são necessários de 30 a 50 mg de nitrito por Kg de produto.

Os sabores e aromas relacionados ao processo de cura são originados das reações entre o óxido nítrico (NO) com numerosas substâncias presentes em carnes como aldeídos, álcool e inosina de grande importância com diversos compostos sulfurados. Por volta de 30-50ppm de nitrito são requeridos para o desenvolvimento de sabor e odor característico da cura (Feiner, 2006).

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

60 ppm de nitrito são necessários para que atue como antioxidante (Pegg & Shahid, 2000).

A respeito de suas propriedades bacteriostáticas, a ação inibitória de nitrito sobre microrganismos está relacionada com a forma não associada do ácido nitroso (HNO_2) um composto ativo. O nitrito atua, inibindo o crescimento de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*, *Listeria*, *Clostridium* e em especial *C. botulinum*, onde o nitrito reage nas ligações ferro-enxofre de algumas proteínas prejudicando a síntese de ATP. Entretanto, apresenta um efeito reduzido sobre *Micrococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp. Uma concentração de 80-140ppm de nitrito de sódio, em um produto cárneo, é uma barreira efetiva no controle microbiológico (Feiner, 2006; Cammack et al., 1999; Pierson & Smoot, 1982).

Embora estudos tenham mostrado que 40 mg/kg de nitrito sejam suficientes para conferir a cor, aroma e sabor de produtos curados, valores inferiores a 150 mg/kg têm sido relatados como insuficientes para prevenir o crescimento e produção de toxina pelo *Clostridium* sp. Esse é o motivo pelo qual as autoridades sanitárias de diversos países, entre eles o Brasil, permitem valores residuais máximos de 150 mg de nitrito/kg em produtos curados (Dutra, 2009).

De acordo com a legislação brasileira vigente para aditivos e conservantes em produtos cárneos (Instrução normativa 51 SDA de 2006), o valor máximo permitido para o uso de nitrito (sódio ou potássio), com ou sem nitrato combinado não deve ultrapassar 150ppm ou 0,015% no produto pronto para o consumo (Brasil, 2009).

2.6.1 Efeitos adversos do uso do nitrito

Embora agentes conservantes, permitidos para uso em alimentos, sejam considerados livres de riscos potenciais, existe uma preocupação quanto à segurança do uso de nitritos. O nitrito em concentrações elevadas é tóxico para

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

No entanto, 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 (Figura 14). Estas possuem efeito tóxico, mutagênico, neuro e nefrotóxico e carcinogênicos (Francis, 2000; Rywotycki, 2002).

Somente aminas secundárias formam nitrosaminas estáveis. Aminas primárias são, imediatamente, degradadas a álcool e nitrogênio, enquanto que as terciárias não reagem (Karl-Otto, 2008).

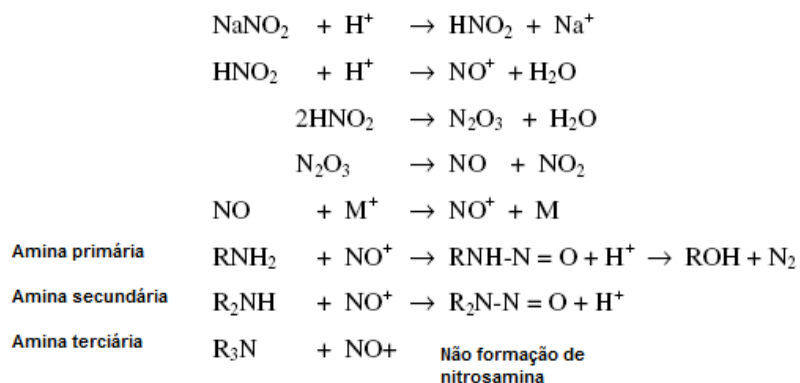


FIGURA 14 Formação de nitrosaminas.
 FONTE: Karl-Otto (2008).

Alguns trabalhos relatam problemas de saúde relacionados com a associação positiva entre tumores cerebrais, leucemia e o consumo de alguns

produtos cárneos curados como bacon e presunto (McKean-Cowdin et al., 2003).

Em diversos estudos documenta-se que as preferências do consumidor por alimentos orgânicos e naturais estão baseadas na preocupação com antibióticos, pesticidas, hormônios, modificações genéticas em animais e plantas e aditivos químicos que os consumidores associam com alimentos produzidos convencionalmente. Os consumidores estão até mesmo dispostos a pagar significantes bonificações por alimentos orgânicos e naturais; para carnes e aves, estes valores podem alcançar 200% (Winter & Davis, 2006). Pesquisas concentram esforços na descoberta de novos produtos naturais, ausentes de aditivos químicos ou, ainda, produtos com níveis reduzidos de conservantes/aditivos sintéticos, em que a estabilidade microbiológica, segurança e qualidade podem ser baseadas na aplicação inteligente de diversos métodos combinados de conservação denominados técnicas “barreiras”. Com relação aos problemas relacionados ao consumo de nitrito, Cassens (1997) sugere o uso de agentes capazes de substituir o nitrito, parcial ou completamente, observando níveis necessários, para produção de um gênero cárneo curado característico e seguro; ou usos agentes capazes de bloquear a formação dos compostos N-nitrosos, evitando, assim, a formação de nitrosaminas carcinogênicas. Al-Shuibi & Al-Abdullah (2002) avaliaram o efeito da substituição parcial e total de nitrito por sorbato na elaboração de mortadelas; os autores observaram, em seus resultados, que o uso combinado de nitrito/sorbato resultou num produto sem diferenças significativas para cor, flavor e aceitabilidade, quando comparado a mortadelas elaboradas somente com nitrito, tornando possível a substituição parcial do aditivo de cura. Quanto à redução do uso de nitrito, Jafari & Eman-Djomeh (2007) estudaram o efeito da redução de nitrito em salsichas, por meio da utilização métodos de conservação combinados (uso de redução de pH e atividade de água, além de um tratamento

térmico). Objetivaram evitar o prejuízo sensorial com obtenção de um produto seguro; com os resultados observados foi sugerida a viabilidade da redução dos níveis empregados.

2.7 Matriz alimentar: produto cárneo emulsionado do tipo mortadela

O mercado de embutidos tem apresentado significativa expansão e alta competitividade na última década, uma vez que o consumo de produtos cárneos como salsichas, linguiças, mortadelas, hambúrgueres e outros, tornou-se parte do hábito alimentar de uma parcela considerável de consumidores brasileiros.

Entende-se por Mortadela, o produto cárneo industrializado, obtido de uma emulsão das carnes de animais de açougue, acrescido ou não de toucinho, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, em diferentes formas e submetido ao tratamento térmico adequado. De acordo com a composição da matéria prima e das técnicas de fabricação, podem ser classificadas em Mortadela, Mortadela tipo Bologna, Mortadela tipo Italiana, Mortadela Bologna e Mortadela de ave (Brasil, 2000). A mortadela é um produto cárneo curado e este processo contribui para formação da cor característica, textura, sabor e aroma específicos do produto, além de efeitos conservantes (Marriot et al., 1981).

A mortadela é uma tradicional iguaria italiana originária de Bologna. Apresenta coloração rosa clara e sua fina massa possui visíveis cubos de gordura distribuídos uniforme; como especiarias podem ser utilizadas noz-moscada, canela, cravo, pimenta e um toque de coentro. A perda de peso, durante seu cozimento, é de 15% e a atividade de água no produto final é de 0,93, que restringe o crescimento de patógenos como *Salmonella* spp e *Staphylococcus aureus*. A elevada temperatura central, durante seu cozimento, contribui efetivamente para destruição de bactérias, juntamente com a combinação dos

efeitos térmicos, reduzida A_w e elevados níveis de sais a fazem um produto estável, durante sua estocagem, cuja refrigeração não é requerida (Fainer, 2006).

A mortadela é um embutido que demonstra, claramente, como o advento da tecnologia dos produtos cárneos, proporcionou um acesso à proteína de origem animal a um contingente populacional que não possuía condições de suprir a quantidade mínima diária recomendada de proteína consumindo carne *in natura*. A tecnologia aliou a funcionalidade da proteína cárnea a propriedades sensoriais que fizeram da mortadela um produto apreciado por todas as classes sociais (Yunes & Boron, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e condução do experimento

A extração dos óleos essenciais, bem como a determinação de rendimento e teor de umidade, foi realizada no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (DQI-UFLA). A caracterização química do óleo essencial foi realizada no laboratório METABIO da Universidade Federal de Sergipe.

A etapa de produção de o modelo alimentar cárneo emulsionado do tipo mortadela, em escala experimental, e respectivas análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Carnes e Pescado do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA-UFLA). Todos os procedimentos microbiológicos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos (UFLA).

Os procedimentos de análise ultraestrutural foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Departamento de Fitopatologia da Universidade federal de Lavras (DFP-UFLA).

O experimento foi conduzido em duas etapas. Na primeira, verificou-se o efeito antimicrobiano *in vitro* do óleo essencial de segurelha (*Satureja montana L.*), sobre o microrganismo estudado (*Clostridium perfringens* Tipo A ATCC 3624), para determinação da concentração inibitória efetiva. Para tal empregou-se a metodologia Difusão Cavidade em Ágar proposta por Deans & Ritchie (1987) com adaptações. A segunda etapa foi caracterizada pela aplicação do óleo essencial na sua concentração efetiva na matriz alimentar inoculada com o microrganismo alvo: *C. perfringens*. A ação antimicrobiana do óleo essencial foi comprovada, por meio de contagem direta em placas, durante o período de estocagem determinado.

3.2 Óleos essenciais

3.2.1 Material vegetal

O condimento utilizado foi a segurelha (*Satureja montana* L.), originária da Albânia, país de clima mediterrâneo e relevo montanhoso localizado na região sudeste da Europa na península Balcânica (41° 21' Norte; 19° 59' Oeste). O material vegetal seco foi adquirido no mercado municipal da cidade de São Paulo – SP (Mr. Josef ERVAS e ESPECIARIAS[®]) sendo sua procedência verificada com base em informações obtidas junto ao fornecedor.

3.2.2 Extração dos óleos essenciais

O processo de extração dos óleos essenciais foi realizado empregando-se o método de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado (Figura 15). As partes aéreas do condimento seco, imerso em água, em balão de 6000mL de fundo redondo e boca esmerilhada, foram submetidas a aquecimento, mantido em ebulição por um período de 2 horas e 30 minutos. Posteriormente, coletou-se o hidrolato (água + óleo), o qual foi centrifugado em centrífuga (FANEM/Baby[®]) 965,36xG/5 minutos, visando à separação da fase orgânica da fase aquosa. O óleo essencial foi removido com auxílio de micropipetas e armazenado em frascos de vidro, previamente, esterilizados (121°C/15 minutos), sendo acondicionados sob temperatura de refrigeração 5±2°C ao abrigo da luz durante toda execução do experimento (Guimarães et al., 2008).



FIGURA 15 Aparelho extrator de Clevenger modificado.

3.2.2.1 Determinação do teor de umidade e rendimento

Para determinação da umidade, cerca 5g do condimento seco foi misturado em 80mL de ciclohexano em balão de 250mL de fundo redondo e boca esmerilada. O sistema foi acoplado a um condensador com coletor volumétrico graduado (Figura 16) e, posto em ebulição, por um período de 2 horas. Após o processo de destilação, quantificou-se o volume de água presente no coletor, sendo expressa como o teor de água contido em 100g de amostra (Pimentel et al., 2006).

No cálculo de rendimento de extração do óleo essencial, aproximadamente, 350g do condimento foram acondicionados em balão e submetidos à extração seguindo os procedimentos descritos no item 3.2.2. O óleo essencial coletado foi armazenado em frasco previamente tarado e pesado, para verificação do rendimento. Em paralelo ao teor de umidade foi possível

obter o rendimento de óleo essencial para planta seca (%) p/p (Base Livre de Umidade – BLU) (Pimentel et al., 2006).



FIGURA 16 Sistema para determinação do teor de umidade.

3.2.3 Avaliação qualitativa e quantitativa dos constituintes dos óleos essenciais

A análise qualitativa do óleo essencial foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), na Universidade Federal de Sergipe, utilizando-se o aparelho Shimadzu CG-17A com detector seletivo de massa modelo QP 5000 sob as seguintes condições experimentais: coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25mm) com fase ligada DB5 (0,25 μ m de espessura de filme); temperatura do injetor: 220°C; programação da coluna com temperatura inicial: 40°C, sendo acrescentados 3°C a cada minuto até atingir 240°C; gás carreador hélio (1mL. min⁻¹); taxa de split 1:10; volume injetado de 1 μ L (1% de solução em diclorometano) e pressão inicial na coluna de 100,2 KPa.

As condições do espectrômetro de massas foram energia de impacto: 70 eV; velocidade de decomposição 1000; intervalo de decomposição: 0.50; e fragmentos de 45 Daltons a 450 Daltons decompostos. Injetou-se, nas mesmas condições das amostras, uma mistura de hidrocarbonetos (C_9H_{20} ; $C_{10}H_{22}$; $C_{11}H_{24}$;... $C_{24}H_{50}$; $C_{25}H_{52}$; $C_{26}H_{54}$). A identificação dos constituintes foi realizada comparando-se os espectros obtidos com os do banco de dados da biblioteca Wiley 229 e pelo índice de Kovats calculado para cada constituinte de acordo com Adams (2007).

A análise quantitativa foi realizada no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de Lavras, utilizando-se cromatógrafo gasoso Shimadzu CG – 17A equipado com detector por ionização de chama (DIC), nas seguintes condições experimentais: coluna capilar DB5; programação da coluna: temperatura inicial de 40°C até 240°C; temperatura do injetor: 220°C; temperatura de detector: 240°C; gás carreador: nitrogênio (2,2 mL min⁻¹); taxa de split 1:10; volume injetado: 1 µL (1% de solução em diclorometano) e pressão na coluna de 115 KPa, sendo a quantificação de cada constituinte obtida por meio de normalização de áreas (%).

3.3 Microrganismo utilizado, manutenção e padronização

Foi utilizada uma cepa de *Clostridium perfringens* tipo A ATCC 3624 (*American Type Culture Collection*), histórico I.C. Hall. (L.S. Mc Clung 1997; A.J. Wildson Tipo A, cep26) INCQS 00053, cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

A cepa liofilizada foi reativada em meio específico semi-sólido *Clostridium* Broth BIOLIFE®. Após o crescimento 24h/37°C em condições anaeróbias a cultura foi centrifugada em microtubos (5000rpm/10min) e o sobrenadante retirado; em seguida o conteúdo celular decantado foi recoberto

por Meio de Congelamento (glicerol 150mL, peptona de carne 5g, extrato de levedura 3g, NaCl 5g, H₂O 1000mL, pH 7,2 ±0,2) e estocado sob temperatura de congelamento durante o período de execução da pesquisa. A cada nova reativação da cultura sua pureza foi verificada por meio de crescimento em meio seletivo e diferencial Agar TSC (Triptose Sulfito Cicloserina), coloração de Gram e testes bioquímicos de motilidade, redução do nitrato a nitrito, fermentação de lactose e crescimento em meio de leite e ferro (coagulação tempestuosa do leite) segundo recomendações do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* da AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (Labbe, 2001).

A padronização foi realizada por meio da elaboração de curva de crescimento; o desenvolvimento do microrganismo, em meio de cultivo caldo BHI (Brain Heart Infusion) HIMEDIA[®], foi monitorado por espectrometria através da evolução da densidade ótica a 620nm e contagem direta em placas contendo BHI Agar, além da quantificação dos esporos.

3.4 Atividade antibacteriana *in vitro* - Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a avaliação da atividade inibitória do óleo essencial foi empregada a metodologia de Difusão Cavidade em Ágar (Deans & Ritchie, 1987), adaptada por Mendonça (2004). Sobre uma camada previamente solidificada de Ágar BHI em placas de 150 mm, foram dispostas pérolas de vidro (Ø 3 mm de diâmetro e 10mm³ de volume) previamente esterilizadas. Posteriormente outra camada do mesmo meio de cultura a ±45°C, inoculado com a cultura reveladora de *Clostridium perfringens* a uma concentração de 10⁸ UFC/mL (OD_{620nm}=1,2972), foi adicionada sobre a camada inicial. Após solidificação, as pérolas de vidro foram removidas com auxílio de pinça estéril para formação dos micropoços onde foram dispensados aproximadamente 10µL dos óleos essenciais diluídos em dimetil sulfóxido ((CH₃)₂SO-DMSO) nas concentrações de 50; 25; 12,5;

6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39% e 0%, sendo esta denominada de controle. O controle positivo foi realizado empregando-se uma solução de cloranfenicol 1000 mg.L⁻¹.

As placas foram incubadas 37°C/24h em condições anaeróbias, sendo os halos inibitórios mensurados posteriormente com auxílio de paquímetro digital DIGIMESS[®].

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como sendo a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo testado (Karapinar & Aktug, 1987; Onawunmi, 1989; Hammer et al., 1999; Delaquis et al., 2002).

3.5 Fabricação do modelo alimentar cárneo emulsionado

Na fabricação do modelo alimentar cárneo emulsionado, foi utilizada a formulação típica de mortadela descrita por Dutra (2009) (Tabela 2), variando os níveis de nitrito de sódio NaNO₂ (0, 100 e 200 mg.Kg⁻¹) e adicionando os óleos essenciais nas concentrações de 0; 0,78; 1,56 e 3,125% p/v, sendo estas concentrações baseadas nos ensaios microbiológicos *in vitro* (concentração inibitória mínima - CIM). As carnes e o toucinho foram obtidos no comércio varejista local e os aditivos cedidos pela New Max Industrial.

Inicialmente o corte bovino (paleta) e o toucinho foram processados em moedor BECARRO[®] (modelo Picador PB-22 “0017”1489”) com disco de moagem número 4, previamente sanificado; em seguida a carne e o toucinho moídos foram acondicionados sob temperatura de congelamento por um período de ± 4h, antes do preparo da massa.

TABELA 2 Formulação utilizada na elaboração das mortadelas

INGREDIENTES/ADITIVOS	(%)
Paleta bovina	58,0
Toucinho	14,0
Água+gelo	20,0
Fécula de Mandioca	5,0
Sal	1,9
Polifosfatos Fosmax 320[®]	0,5
Ácido ascórbico*	0,05
Condimento mortadela 913	0,5
Nitrito de sódio (NaNO₂)*	0,0; 0,01; 0,02

Foi utilizado o máximo de ácido ascórbico sugerido na literatura para reduzir a formação de N-Nitrosaminas. Valores percentuais para obtenção de 0, 100 e 200 mg.Kg⁻¹ de NaNO₂.

Adicionou-se ao multi processador operando em potência máxima a carne moída e o gelo; após completa homogeneização foram adicionados fosfato; sal; nitrito de sódio e condimentos seguindo esta ordem. Posteriormente a velocidade do multi-processador foi reduzida e foram adicionados o toucinho moído a fécula e o ácido ascórbico; seguiu-se a homogeneização até que a temperatura da massa atingisse $\pm 15^{\circ}\text{C}$. Após todo o processo a massa foi pesada, embutida manualmente, e embalada a vácuo.

O processo de cocção foi realizado por imersão em banhos com temperatura controlada, e os binômios escalonados da seguinte maneira: $55^{\circ}\text{C}/30\text{ min}$; $65^{\circ}\text{C}/30\text{ min}$; $75^{\circ}\text{C}/30\text{ min}$ e 85°C até que a temperatura interna da massa atingisse 73°C . Todo o processo de cozimento foi monitorado com uso de termopar fixado no interior do produto, com mensuração da temperatura do banho e temperatura interna. Após o cozimento as mortadelas foram mantidas em banho de água e gelo (0°C) por 10 minutos.

3.5.1 Preparo das amostras

Durante a homogeneização da massa da mortadela, antes da embalagem e processamento térmico, o óleo essencial foi adicionado a massa nas concentrações desejadas (0; 0,78; 1,56 e 3,125% p/v) em cada nível de nitrito empregado (0, 100 e 200 mg.Kg⁻¹) conforme descrito no fluxograma da Figura 17. Para cada tratamento (Nitrito/óleo essencial) foram fabricadas duas bateladas de 500g cada (limitado pelo multi processador), sendo cada mortadela (tratamento) embalada com ±30g; porção suficiente para execução das análises microbiológicas e de cor e o oxidação lipídica.

As amostras destinadas as análises microbiológicas foram inoculadas com o microrganismo padronizado (*Clostridium perfringens*) a uma concentração de 10⁷ UFC.g⁻¹ de células viáveis; sobre a superfície do produto foi depositado um ponto de silicone, e após a secagem, a cultura do microrganismo crescido foi injetada com auxílio de seringa e agulha estéril em capela de fluxo laminar. Foi fabricado um controle (formulação sem adição de *C. perfringens*), a fim de se monitorar a qualidade microbiológica.

Foram utilizados três níveis de nitrito (0, 100, 200 mg.Kg⁻¹) e quatro concentrações de óleo (0; 0,78; 1,56 e 3,125%); as amostras foram estocadas por 30 dias a temperatura ambiente (25°C) e analisadas com 1, 10, 20 e 30 dias de armazenamento.

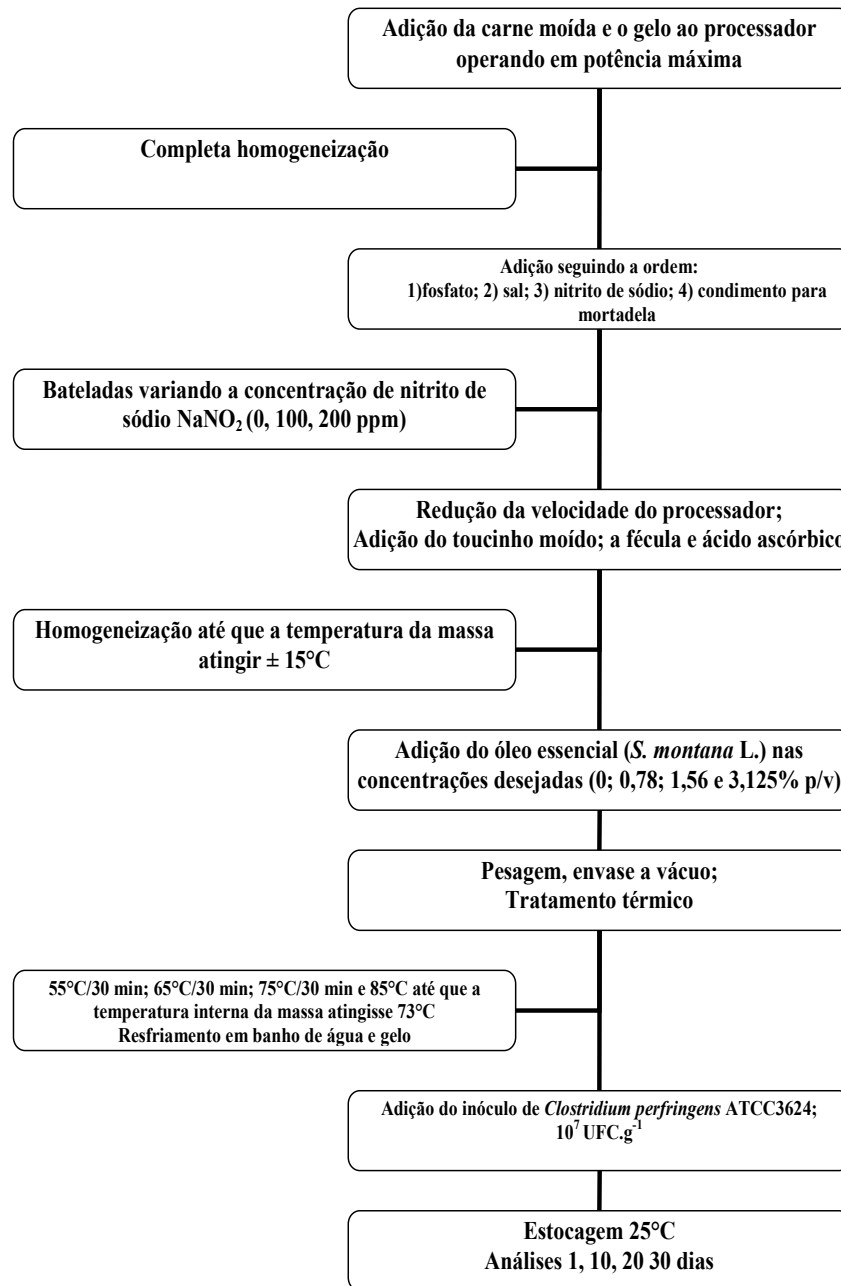


FIGURA 17 Fluxograma das etapas da fabricação da mortadela e preparo das amostras.

3.6 Análises microbiológicas

3.6.1 Enumeração de *Clostridium perfringens*

Abertas as embalagens das mortadelas de forma asséptica, cerca de 10g das amostras foram pesadas e homogeneizadas em 90mL água peptonada 0,1% p/v em Stomacher Metroterm® (490 golpes/2 min). Após diluições seriadas decimais em 9mL de água peptonada 0,1% , alíquotas de 100µL foram semeadas por superfície em ágar seletivo e diferencial TSC (Tryptose Sulfito-cicloserina BIOLOG®), suplementado com D-cicloserina 200mg (inibição da microbiota anaeróbia acompanhante) e emulsão de gema de ovo (12,5 mL de gema, 12,5mL de solução salina 0,85%), para verificar a atividade de fosfolipase da α -toxina (lecitinase). As placas foram incubadas em atmosfera anaeróbia com auxílio de jarras de anaerobiose e geradores de atmosfera anaeróbica PROBAC® a 37°C/24h.

3.6.2 Contagem de esporos de *Clostridium perfringens*

Após homogeneização em água peptonada 0,1% p/v, as amostras de mortadela foram submetidas a um tratamento térmico 75°C/20 minutos para inativação das células viáveis e ativação dos esporos. Posteriormente, alíquotas de 1 mL de diluições apropriadas foram inoculadas em séries de 3 tubos, contendo meio de cultivo RCM (*Reinforced Clostridial Medium*) e recobertas com óleo mineral, para geração de atmosfera anaeróbia, sendo incubadas a 37°C/7dias com avaliações periódicas a cada 24h. Os tubos com crescimento característico (turvação e produção de gás) foram considerados positivos e interpretados em tabelas apropriadas de NMP (Número Mais Provável), sendo os resultados expressos em NMP de esporos/g de amostra (NMP/g) (Scott et al., 2001).

3.6.3. Controle microbiológico

Foram realizadas contagens de *C. perfringens* em mortadelas elaboradas (controle) sem adição do microrganismo alvo, objetivando verificar a contaminação das amostras, fato que poderia resultar na interferência dos resultados observados. Também foi realizada a Contagem Total em Placas buscando avaliar o grau de contaminação das mortadelas. Para tal utilizou-se o ágar PCA (Plate Count Agar).

3.7 Análises Físico-Químicas

3.7.1 Composição centesimal

Para determinação da composição centesimal do modelo alimentar cárneo emulsionado elaborado, foram avaliados os teores de umidade, extrato etéreo, proteína bruta, cinzas (resíduo mineral fixo), fibra bruta e fração glicídica. Todas as análises foram realizadas segundo normas estabelecidas pela Association of Official Analytical Chemists International - AOAC (2000)

A determinação do teor de umidade foi obtida por método gravimétrico com emprego de calor à temperatura de 105°C, até peso constante; o teor de extrato etéreo foi obtido por extração com éter etílico, por 5 horas, em aparelho tipo Soxhlet; o teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de Micro-Kjeldahl compreendendo as etapas de digestão com H₂SO₄, destilação com solução de NaOH 50% e titulação com solução de HCl 0,02 N, utilizando-se um fator de correção de 6,25; o resíduo mineral fixo foi determinado com emprego do método gravimétrico com uso de mufla a 550°C; o teor de fibra bruta foi obtido por gravimetria após digestão em meio ácido; a fração glicídica foi determinada por diferença (*Fração glicídica* = 100 - (umidade + Extrato etéreo + proteínas+ fibras + cinza)), para parâmetros em matéria integral.

3.7.2 Análise da cor objetiva

As leituras de cor foram obtidas com um colorímetro *Chroma Meters CR-300 (Konica Minolta Sensing Inc.)*, sendo estabelecido o ângulo de 10° para o observador e o iluminante D₆₅ para cálculo dos índices de cor no sistema CIELAB seguindo recomendações de Ramos & Gomide (2007). Os parâmetros de cor luminosidade (L^*), índice de vermelho (a^*) e índice de amarelo (b^*) foram obtidos considerando-se o valor médio de seis leituras realizadas em diferentes pontos de fatias de, aproximadamente, quatro centímetros de largura. Foram determinados os índices de saturação C^* ($C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) e ângulo de tonalidade h^* ($h^* = \tan^{-1} (b^*/a^*)$).

3.7.3 Oxidação lipídica

A atividade do óleo essencial sobre a oxidação lipídica nas amostras de mortadela foi avaliada pela quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (índice TBAR's) segundo metodologia descrita por Raharjo et al., (1992).

Porções de 10g da amostra foram coletadas, adicionadas de 40mL ácido tricloroacético a 5% (TCA) e 1mL de antioxidante BHT (2,6-di-tert-butil-4-methylphenol) 0,15% SIGMA-ALDRICH® em etanol, (10 µg.BHT.g⁻¹ de lipídeo) e homogeneizadas em polítron (5 minutos); em seguida procedeu-se a filtração do homogenato e o volume do filtrado foi ajustado para 50mL em balão volumétrico, com TCA 5%. Dos balões foram transferidas alíquotas de 2mL para tubos de ensaio (3 tubos por balão) e adicionadas de 2mL do reagente de TBA (2-thiobarbituric acid) 0,08 Molar SIGMA-ALDRICH® em ácido acético 50% e homogeneizou-se; posteriormente os tubos foram levados ao banho-maria sob temperatura de ebulição por 5 minutos. As leituras foram obtidas em espectrofotômetro (CARY® *Varian*) a 531nm. O malonaldeído pode ser formado a partir de ácidos graxos poliinsaturados e sua concentração pode ser

medida pela reação com ácido tiobarbitúrico, por meio da formação de produtos de condensação com coloração avermelhada, que absorvem 530-535nm (Pokorny, et al., 2001).

Os valores de TBAR's foram expressos em miligramas de malonaldeído por quilo de amostra (mg MDA/Kg), utilizando-se o fator 7,38, obtido através de curva padrão utilizando o 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) como padrão.

3.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A visualização dos danos provocados pelo óleo essencial sobre as células e estruturas de *C. perfringens* foi obtida por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Todos os procedimentos do preparo das amostras para visualização foram realizados segundo metodologia proposta por Kitajima (1998).

A partir da cultura de *C. perfringens* crescida em caldo BHI (Brain Heart Infusion) a 37°C, foram transferidas alíquotas para microtubos e centrifugadas a 5000rpm/5minutos; em seguida foi retirado o sobrenadante e a massa celular decantada recoberta por solução contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion), TWEEN 80 e o óleo essencial de *S. montana* em concentração efetiva determinada na avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*. O conteúdo foi novamente centrifugado 5000rpm/10minutos com retirada do sobrenadante, e lavado por três vezes com solução salina 0,85% p/v. Posteriormente procedeu-se o emblocamento adicionando ao decantado 0,2mL de solução semi-sólida ($\pm 45^{\circ}\text{C}$) de agarose 1,0%, seguida de homogeneização objetivando a formação do bloco (agarose + células). O procedimento foi repetido periodicamente sendo monitorado um período de 6 horas de tempo de contato óleo essencial/cultura.

O bloco formado foi imerso em fixador Karnovsky (2,5% de glutaraldeído, 2,5% de formaldeído em 0,05M tampão cacodilato de sódio e

0,001M tampão CaCl_2 a pH 7,2) e estocado ao abrigo da luz sob temperatura de refrigeração.

Após fixação, o bloco foi lavado por três vezes (10 minutos de contato a cada lavagem) com tampão cacodilato 0,05M para remoção de resíduos de gluteraldeído que poderiam reduzir o tetróxido de ósmio (O_4Os). Cerca de 4 gotas de tetra-óxido de Ósmio foram adicionadas ao bloco e estocados por 4h em câmara de fluxo laminar. Decorrido o período, o ósmio foi retirado e a amostra lavada por 3 vezes com água destilada; após a lavagem adicionou-se solução de acetato de uranila 2%, estocando as amostras sob refrigeração por 12h.

Posteriormente realizou-se a desidratação das amostras em gradiente de etanol: 25%, 50%, 75%, 90% e 100% (10 minutos de contato para cada etapa). Em seguida as amostras foram tratadas com resina (30% 8 horas; 70% 12h; 100% 3x de 12h sendo a última etapa realizada em estufa a 60°C para solidificação).

Após a solidificação os blocos resinados foram submetidos ao desbaste grosseiro e fino, seguidos de cortes semi-fino e ultrafino em ultramicrotomo ULTRACUT[®]. Posteriormente os cortes foram contrastados para observação em microscópio eletrônico ZEISS[®], e obtenção das micrografias.

3.9 Análises estatísticas dos dados

Os tratamentos foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas um fatorial 4x3 com concentrações de óleo essencial (0; 0,78; 1,56; 3,125%) e níveis de nitrito (0, 100 e 200 mg.Kg^{-1}) e na subparcela os tempos (1, 10, 20, 30 dias) de armazenamento. Todas as análises foram realizadas usando o software estatístico R[®] (2010).

Os resultados obtidos para parâmetros de cor e valores do índice TBAR's foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e regressão, sendo a comparação entre médias estabelecida pelo teste de Tukey, adotando um nível de 5% de significância; foi utilizado o pacote “Laercio” (Silva, 2008).

Os resultados obtidos no ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram submetidos à análise do tipo dose-resposta empregando o modelo log-logístico de cinco parâmetros do pacote “drc” (*Analysis of Dose-Response Curves*) (Ritz & Streibig, 2005).

Para os dados de contagem de *Clostridium perfringens* em mortadela, foram plotados os valores médios expressos em $\text{Log}_{10}\text{UCF/g}$ em função do tempo, juntamente com os respectivos erros padrão. Os valores absolutos médios do $\text{Log}_{10}\text{UCF/g}$ foram comparados pelo teste de Scoot & Knott (1974), adotando um nível de significância de 5%, utilizando o pacote Laércio (Silva, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização química do óleo essencial

A composição química do óleo essencial de *S. montana* L. estudado, obtida por CG/EM, bem como suas concentrações quantificadas por normalização de áreas pela análise do cromatograma, obtido por CG com detector FID, são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 Constituintes químicos do óleo essencial de *Satureja montana* L. identificados por CG/EM e seus respectivos teores

Pico	T _r	Composto	(%)	IRR _{exp}	IRR _{lit}
1	6,580	α -tujeno	0,23	924	930
2	6,801	α -pineno	1,37	932	939
3	7,314	canfeno	0,55	948	954
4	8,297	1-octen-3-ol	1,32	979	979
5	8,607	mirceno	0,68	989	990
6	9,549	α -terpineno	1,13	1016	1017
7	9,826	ρ-cimeno	12,00	1024	1024
8	9,985	limoneno	0,62	1028	1029
9	10,094	1,8-cineol	1,26	1031	1031
10	11,030	γ -terpineno	2,91	1057	1059
11	11,480	<i>cis</i> -sabineno hidra.	1,34	1069	1070
12	12,586	linalol	11,00	1100	1096
13	12,815	<i>cis</i> -tujona	1,62	1106	1102
14	14,307	cânfora	1,59	1146	1146
15	15,241	borneol	3,43	1171	1169
16	15,558	terpinen-4-ol	3,96	1180	1177
17	16,100	α -terpineol	1,33	1194	1188
18	17,344	éter metil timol	0,45	1229	1235
19	17,672	éter metil carvacrol	2,16	1238	1244
20	19,356	acetato de isobornila	0,35	1284	1285
21	19,576	timol	28,99	1290	1290
22	19,845	carvacrol	10,71	1298	1299

...continua...

TABELA 3, Cont.

23	24,007	(E)-cariofileno	4,54	1418	1419
24	26,502	NI*	0,52	1494	-
25	26,909	β -bisaboleno	1,86	1507	1505
26	29,071	espatulenol	1,00	1576	1578
27	29,236	Óxido de cariofileno	3,08	1581	1583
Total Identificado			99,48%		
Umidade (Condimento Seco)			9,9561% ($\pm 1,9586$)		
Rendimento (BLU**)			0,4721% ($\pm 0,0006$)		

T_r tempo de retenção (min); IRR_{exp} – índice experimental; IRR_{lit} – Índice literatura; NI* – Composto não identificado; BLU** Base livre de umidade (matéria seca).

Os óleos essenciais podem compreender em sua constituição mais de sessenta componentes químicos individuais. Os constituintes majoritários podem representar mais de 85% desta fração, enquanto outros componentes estão presentes como constituinte traço (Burt, 2004).

Foram identificados 26 componentes químicos (99,48%) para o óleo essencial de *S. montana* L. Os componentes encontrados em maiores concentrações foram o timol (28,99%), *p*-cimeno (12,00%), linalol (11%) e carvacrol (10,71%), coincidindo com componentes químicos identificados por diversos autores que trabalharam com este espécime (Slavkovska et al., 2001; Radonic & Milos, 2003; Skočibušić & Bezić, 2003). O condimento apresentou um rendimento médio de extração de 0,4721% (BLU), e um teor de umidade de 9,9561%. A Figura 18 mostra as estruturas químicas de alguns dos constituintes majoritários do óleo essencial avaliado.

Skočibušić & Bezić (2003), avaliaram a composição química do óleo essencial de *S. montana* originária da Croácia por CG/MS e encontraram carvacrol (50.2%), timol (11%), γ -terpineno (5.8%), carvacrol metil éter (4.6%) e hidrcarbonetos monoterpênicos como *p*-cimeno (4.8%). Também foram encontrados em concentrações menores α -terpineno, α -tujeno e mirceno.

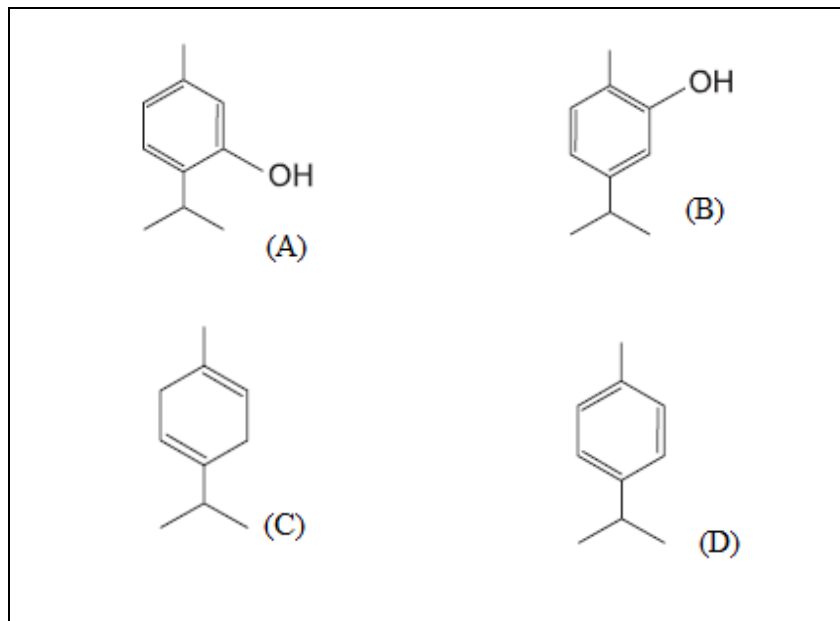


FIGURA 18 Estruturas químicas de alguns compostos presentes no óleo essencial de *Satureja montana* L. (A) Timol; (B) Carvacrol; (C) γ -terpineno; (D) *p*-cimeno.

Mirjana & Nada (2004) estudaram a variação da composição do óleo essencial de segurelha (*S. montana*) antes, durante e depois do período de florescimento. Os autores relataram variações significativas nos teores de carvacrol (52.4>26.2>16.1) e timol (11>5.4>2.6) os quais reduziram suas concentrações, durante o florescimento. Em contrapartida, os índices de *p*-cimeno apresentaram aumentos significativos (3.8<15.2<25.6).

A respeito da variabilidade da composição deste óleo essencial, Slavkovska et al. (2001) reportaram a existência de variação significativa entre populações da mesma subespécie, entre subespécies e entre espécies.

Radonic & Milos (2003) determinaram a composição do óleo essencial de *Satureja montana* L. por CG/MS, identificando 22 componentes; o componente majoritário assim como encontrado neste experimento foi o timol

(45,2%) apresentando também frações de *p*-cimeno (6,4%), γ -terpineno (5,9%), carvacrol metil éter (5,8%), timol metil éter (5,1%), carvacrol (5,3%), geraniol (5%) e borneol (3,9%).

Ćavar et al. (2008) avaliaram óleos obtidos por hidrodestilação de partes aéreas de *Satureja montana* L. oriunda das regiões da Bósnia e Herzegovina por CG/MS, encontrando como componentes majoritários timol (31,7%) e geraniol (22,3%).

A composição final de um óleo essencial é influenciada, geneticamente, sendo específica para cada órgão e seu estágio de desenvolvimento; pelas condições climáticas do local de origem da planta; grau de hidratação do terreno e teor de macro e micro nutrientes; além das condições de secagem a que o material vegetal foi exposto.



FIGURA 19 Óleo essencial de *S. montana* após extração por hidrodestilação.

4.2 Composição centesimal do modelo alimentar

As proporções dos macro constituintes, presentes na matriz alimentar carne emulsionada avaliada nos estudos, em sua formulação empregada são expressas na Tabela 4.

TABELA 4 Composição centesimal do modelo alimentar cáneo do tipo mortadela empregado nos estudos

Mortadela	
Umidade (%)	66,15±1,28
Extrato Etéreo (%)	9,95±0,75
Proteína Bruta (%)	13,28±0,94
Resíduo Mineral (Cinzas) (%)	3,05±0,11
Fibra Bruta (%)	*
Fração Glicídica (%)	7,60±1,32

Valores obtidos para seguinte formulação: (58% carne bovina; 14% toucinho; 20% gelo+água; fécula de mandioca 5%, sal 1,9%; 0,5% polifosfato; 0,05% ácido ascórbico; 150 ppm NaNO₂; 0,5% condimento para mortadela 913).*Valor não significativo. Dados expressos representam a média (%) ± desvio padrão da média (SD).

A composição do produto elaborado encontra-se dentro dos padrões legais vigentes nacionais. De acordo com Brasil (2000), em seu regulamento técnico de identidade e qualidade de mortadela, os limites estabelecidos para o produto são de 10% para carboidratos totais (máx); 65% de umidade (máx); gordura 30% (máx); proteína 12% (min).

Os resultados obtidos são próximos aos observados por Dutra (2009), que trabalhou com mortadelas irradiadas e diferentes níveis de nitrito de sódio (0, 75 e 150ppm de nitrito), utilizando a mesma metodologia proposta para composição centesimal desta pesquisa. Foram obtidos valores de 65,54% para

umidade, 17,52% para proteína, 11,91% de extrato etéreo, 3,62% de cinzas nos tratamentos com 150ppm de nitrito. O autor observou uma variação significativa no teor protéico, em função dos diferentes níveis de nitrito empregados, com valores 2,9% superiores em mortadelas elaboradas com nitrito.

Em estudos realizados por Cassens (1997) foi demonstrado que, após o nitrito (NO_2) ser adicionado no sistema cárneo, aproximadamente 1 a 10% é oxidado a nitrato (NO_3), 5 a 10% reage com a mioglobina, 5 a 15% com os grupos sulfidrila das proteínas, 1 a 5% com gordura; 20 a 30% com proteína e cerca de 1 a 5% transformam em gás e se desprendem do produto.

Santos (2007), ao avaliar a composição centesimal de mortadelas elaboradas com sangue suíno e concentrado proteico de soro de leite, obteve em seu controle (sem adição dos tratamentos) 64,94±1,11 de umidade; 5,44±2,63 para carboidratos totais; 3,23±0,42 de cinzas; lipídios 11,48±2,60; 14,92± 0,72 de proteína bruta.

De acordo com os resultados obtidos, a mortadela se constitui em excelente meio para o crescimento do microrganismo alvo estudado *C. perfringens*, pois, apresenta amplo espectro nutricional e elevado teor proteico, fornecendo os diversos aminoácidos essenciais ao seu desenvolvimento. Além disso, é estocada sob atmosfera com baixas tensões de oxigênio (anaeróbia-vácuo), pode ser armazenada à temperatura ambiente, apresentando em adição pH e A_w apropriados.

4.3 Análise da Cor objetiva

Decisões de compra da carne e produtos cárneos são influenciadas pela cor mais do que qualquer outro atributo de qualidade, uma vez que a cor é usada por consumidores como indicador de qualidade e frescor. Como resultado, de acordo com Smith et al. (2000), cerca de 15% da carne do varejo têm seu preço

descontado em virtude da descoloração da superfície, que corresponde à perda de receita anual de mais de 1 bilhão de dólares.

Foram observados efeitos significativos ($P < 0,05$) da interação tripla entre os tratamentos e tempo de estocagem (concentrações de óleo essencial \times níveis de nitrito \times tempo de estocagem) para luminosidade (L^*), índice de vermelho (a^*), índice de amarelo (b^*), índice de saturação (C^*) e ângulo de tonalidade (h^*). Os efeitos, para todos os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , C^* e h^*) foram decompostos, e cada interação, entre concentrações de óleo essencial e níveis de nitrito aplicados, foi avaliada com o tempo de estocagem por meio de análise de regressão.

A luminosidade (L^*) caracteriza o grau de claridade da cor, variando do preto ao branco, indo de 0 (escuro) a 100 (claro). As variações do parâmetro L^* , em função do tempo de estocagem, de acordo com as concentrações de óleo essencial de *S. montana* L. (0; 0,78; 1,56; 3,125%) e doses de nitrito (0, 100, 200 mg.Kg⁻¹), utilizadas na elaboração do modelo alimentar carne emulsão do tipo mortadela, são representadas na Figura 20. Na Tabela 5 são apresentados os coeficientes de regressão de cada interação dos diversos tratamentos avaliados para L^* .

Para os tratamentos elaborados com 1,56%/100 mg.Kg⁻¹ e 3,125%/200 mg.Kg⁻¹ de óleo essencial/nitrito de sódio foi observado um aumento significativo ($P < 0,05$) para L^* entre o primeiro e o trigésimo dia de estocagem (Tabela 8). O tratamento elaborado com maior concentração de óleo essencial e maior nível de nitrito apresentou valores de luminosidade superiores e crescentes durante todo o período de estocagem.

Este aumento na luminosidade das amostras pode, no entanto, ser considerado favorável para a aceitação do produto.

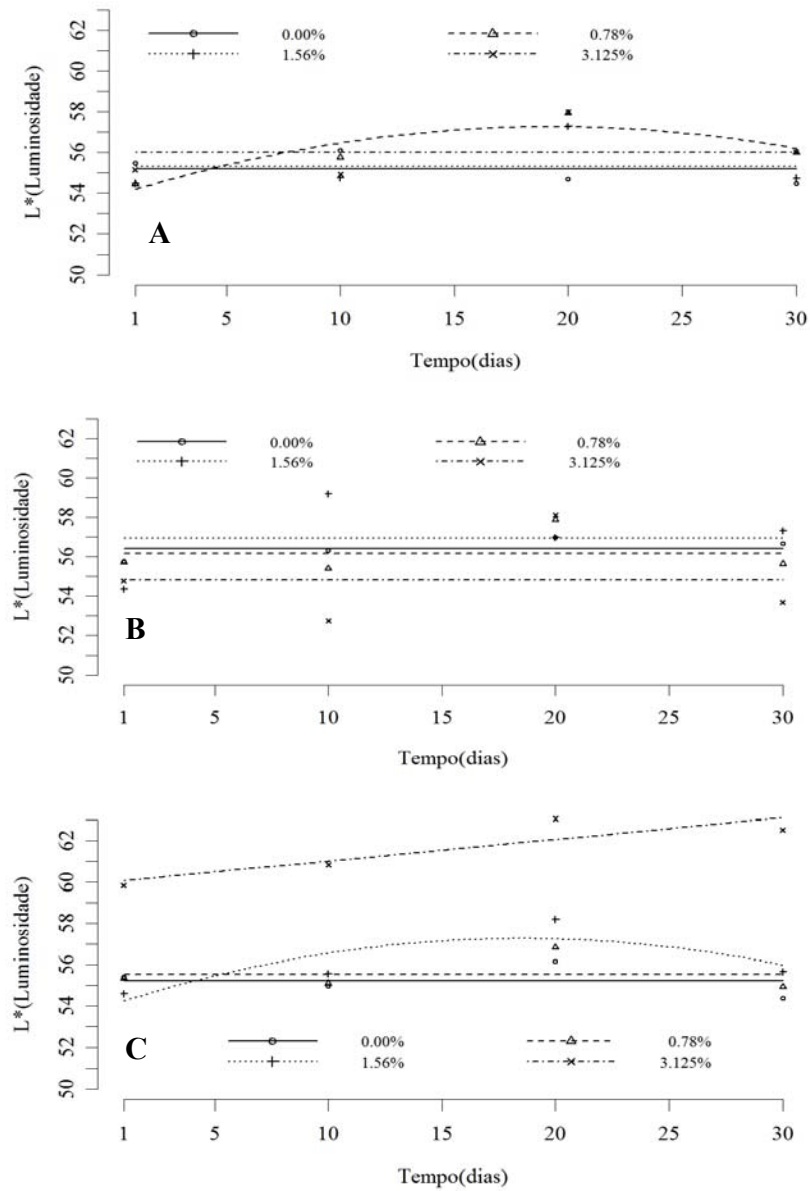


FIGURA 20 Efeito das diferentes concentrações de óleo essencial de *Satureja montana* L. e níveis de nitrito sobre a luminosidade (L^*) durante o armazenamento das mortadelas (25°C). **A**=0; **B**=100; **C**=200 mg.Kg^{-1} de NaNO_2 .

TABELA 5 Equações* e respectivos coeficientes de regressão (R^2) para os valores de luminosidade (L^*) de modelos alimentares cárneos emulsionados do tipo mortadela, elaborados com diferentes concentrações de óleo essencial e níveis de nitrito, durante o período de estocagem a 25°C (x em dias)

Nitrito NO ₂ (mg.Kg ⁻¹)	Óleo essencial (%)	Equação	R ²
0	0,00	$y=55,187$	-
0	0,78	$y=53,842+0,356.x-0,009.x^2$	0,6238
0	1,56	$y=55,322$	-
0	3,125	$y=56,022$	-
100	0,00	$y=56,423$	-
100	0,78	$y=56,158$	-
100	1,56	$y=56,957$	-
100	3,125	$y=54,830$	-
200	0,00	$y=55,234$	-
200	0,78	$y=55,554$	-
200	1,56	$y=53,876+0,374.x-0,010.x^2$	0,6391
200	3,125	$y=59,959+0,105.x$	-

* Significativas pelo teste de “F” ($P<0,05$)

Embora o índice de vermelho (a^*) seja o parâmetro de cor mais sensível na caracterização da cor vermelha e sua estabilidade (Ramos & Gomide, 2007), a luminosidade é considerada o parâmetro de cor que governa a qualidade da carne e de produtos cárneos (Garcia-Esteban et al., 2003), sendo, segundo Brewer et al. (2001), o que melhor prediz a intensidade visual da cor rósea. Válková et al. (2007) e Scarpa et al. (2009), avaliando a aceitação de produtos curados comerciais, observaram que a luminosidade foi o atributo de cor que mais influenciou a aceitação do produto, sendo preferido amostras mais claras.

O aumento da luminosidade pode ser atribuído ao crescimento de bactérias ácido-láticas naturalmente presentes na carne e produtos cárneos, as quais produzem ácidos orgânicos, em especial o ácido lático, ocasionando a redução do pH. De acordo com Ramos & Gomide (2007) menores valores de pH

resultam no aumento da reflectância interna (dispersão) da luz e conseqüente aumento da luminosidade da superfície.

Os valores de a^* representam tonalidades que vão do verde ao vermelho. Valores positivos de a^* ou a^+ variando de 0 até +50 representam a cor vermelha do produto, enquanto valores negativos de a^* ou a^- de 0 até -50 indicam a coloração verde da amostra (Feiner, 2006).

As variações do índice de vermelho (a^*), em função do tempo de estocagem, de acordo com as concentrações de óleo essencial de *S. montana* L. (0; 0,78; 1,56; 3,125%) e doses de nitrito (0, 100, 200 mg.Kg⁻¹), utilizadas na elaboração do modelo alimentar carne emulsionado do tipo mortadela, são representadas na Figura 21. Na Tabela 6 são apresentados os coeficientes de regressão de cada interação dos diversos tratamentos avaliados para a^* .

De acordo com os resultados obtidos, os valores de a^* foram superiores ($P < 0,05$) para formulações em que foi utilizado o nitrito (NaNO₂), nas concentrações de 100 e 200 mg.Kg⁻¹, quando comparado a amostras elaboradas sem nitrito, indicando maior participação da tonalidade vermelha. Este fato era esperado, pois, o nitrito desempenha papel fundamental na formação da cor característica dos produtos cárneos curados. De acordo com Feiner (2006), para se obter uma coloração característica, intensa e estável de produtos curados, são necessários de 30 a 50 mg de nitrito por Kg de produto.

Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$), para o índice de vermelho (a^*), ao final do primeiro dia de estocagem (Tabela 8), para tratamentos elaborados com 100 e 200 mg.Kg⁻¹ de nitrito, permitindo concluir que a menor dose de nitrito utilizada foi suficiente para formação da tonalidade vermelha na composição da cor característica do produto.

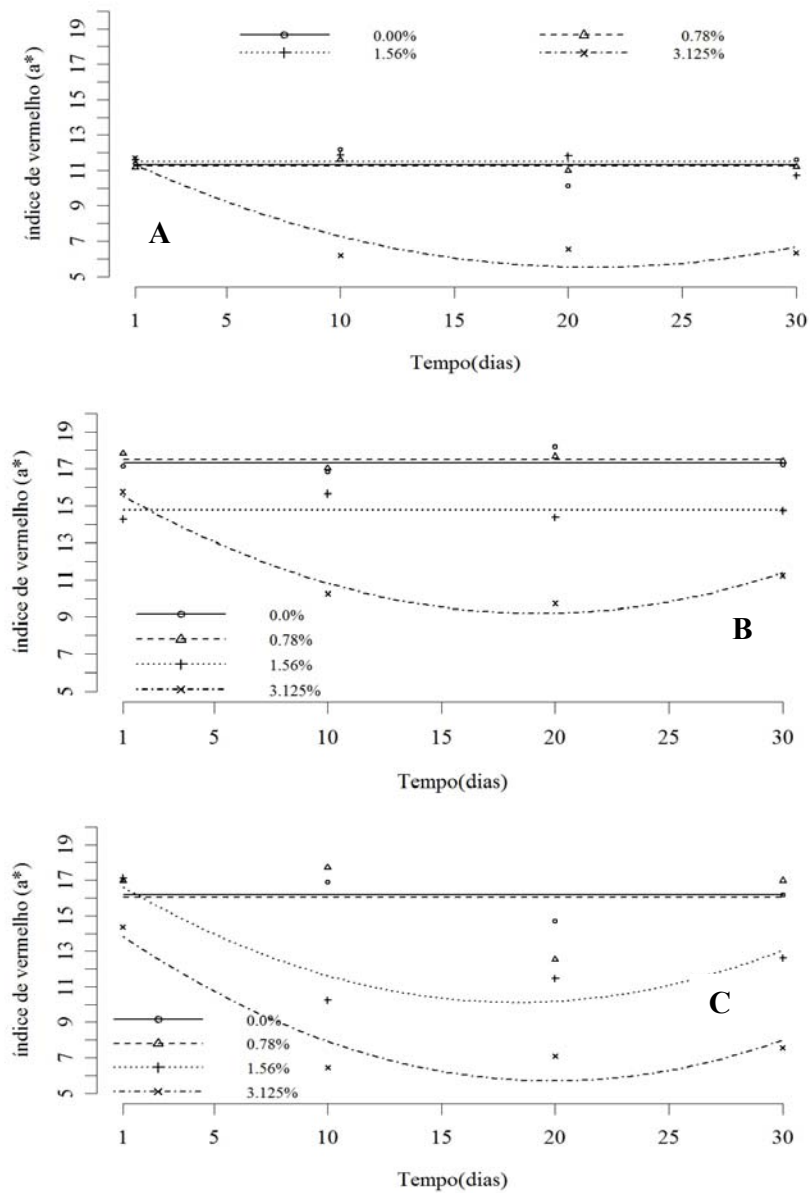


FIGURA 21 Efeito das diferentes concentrações de óleo essencial de *Satureja montana* L. e níveis de nitrito sobre o índice de vermelho (a^*) durante o armazenamento das mortadelas (25°C). A=0; B=100; C=200 mg.Kg⁻¹ de NaNO₂.

TABELA 6 Equações* e respectivos coeficientes de regressão (R^2) para os valores dos índices de vermelho (a^*) de modelos alimentares cárneos emulsionados do tipo mortadela, elaborados com diferentes concentrações de óleo essencial e níveis de nitrito, durante o período de estocagem a 25°C (x em dias)

Nitrito NO ₂ (mg.Kg ⁻¹)	Óleo essencial (%)	Equação	R ²
0	0,00	y=11,333	-
0	0,78	y=11,232	-
0	1,56	y=11,495	-
0	3,125	y=11,918-0,608.x+0,014.x ²	0,8721
100	0,00	y=17,341	-
100	0,78	y=17,475	-
100	1,56	y=14,762	-
100	3,125	y=16,258-0,734.x+0,019.x ²	0,8449
200	0,00	y=16,189	-
200	0,78	y=16,042	-
200	1,56	y=17,415-0,796.x+0,022.x ²	0,7582
200	3,125	y=14,718-0,907.x+0,022.x ²	0,8513

* Significativas pelo teste de “F” (P<0,05)

Dutra (2009), ao avaliar a formação da cor em mortadelas irradiadas e elaboradas com diferentes níveis de nitrito, observou que 75ppm de nitrito foram suficientes para formação da cor característica, não sendo verificadas diferenças perceptíveis para o parâmetro a^* entre este tratamento e amostras formuladas com 150ppm de nitrito. As amostras fabricadas, sem adição de nitrito, também, revelaram valores de a^* inferiores, assim como encontrado nesta pesquisa.

Em estudos buscando reduzir o teor de nitrito empregado na elaboração de salsichas tipo *hot dog*, sem afetar sua segurança e aspectos sensoriais de cor e sabor, Jafari & Emam-Djomeh (2007), observaram que os índices de cor a^* e b^* foram semelhantes em amostras fabricadas com 50 e 120 ppm de nitrito; os autores relataram que 50 ppm de nitrito parecem ser suficientes para desenvolvimento de cor e sabor característicos do produto, no entanto concentrações mais elevadas são requeridas para estabilidade microbiológica.

Estudos conduzidos por Al-Shuibi & Al-Abdullah (2002) avaliaram os aspectos sensoriais de cor em mortadelas elaboradas com níveis variados de nitrito de sódio substituídos pela adição de sorbato de sódio. Os autores relataram que provadores atribuíram notas para o atributo cor (escala de 0 a 10) que não diferiram significativamente ($P>0,05$) entre mortadelas elaboradas com 120 e 40 ppm de nitrito; no entanto amostras elaboradas sem a adição de nitrito e com sorbato receberam notas significativamente inferiores ($P<0,05$).

Foi observado um impacto negativo na formação da cor característica do produto cárneo curado com a adição do óleo essencial de *S. montana* L. em concentração superior a 1,56% nas mortadelas elaboradas com 100 e 200 mg.Kg⁻¹. Os resultados revelaram índices de a^* reduzidos ($P<0,05$) já ao final do primeiro dia de estocagem (Tabela 8) para os tratamentos onde foram aplicados óleos essenciais nestas concentrações. A estabilidade da cor formada também foi afetada, e ao decorrer do período de estocagem esta queda se tornou mais pronunciada, principalmente em tratamentos onde foi utilizado o óleo essencial na concentração de 3,125%, tratamentos onde foram detectados efeitos significativos ($P<0,05$) durante o período de estocagem.

A redução dos índices de vermelho como consequência da aplicação do óleo essencial em concentrações elevadas pode ser explicada pela possível interação ocorrida entre o nitrito de sódio e os componentes químicos aromáticos presentes na fração do óleo essencial, indisponibilizando o composto químico (NO_2) para se ligar ao ferro (Fe^{2+}) da molécula de mioglobina e desempenhar seu papel na formação da cor. Em paralelo a este fenômeno a própria coloração do óleo essencial (amarela) adicionado em concentrações elevadas pode afetar a cor do modelo alimentar fabricado. Este fato poderia influenciar na aceitabilidade do produto, uma vez que o índice de vermelho (a^*) é um dos parâmetros fundamentais na avaliação da cor característica de produtos cárneos curados.

Valores de b^* representam tonalidades que vão do azul (valores negativos) ao amarelo (valores positivos). As variações do índice de amarelo (b^*), em função do tempo de estocagem, de acordo com as concentrações de óleo essencial de *S. montana* L. (0; 0,78; 1,56; 3,125%) e doses de nitrito (0, 100, 200 mg.Kg⁻¹), utilizadas na elaboração do modelo alimentar cárneo emulsionado do tipo mortadela, são representadas na Figura 22. Na Tabela 7 apresentam-se os coeficientes de regressão de cada interação dos diversos tratamentos avaliados para b^* .

Para intensidade do índice de amarelo não foram observadas alterações ($P>0,05$), em decorrência dos diferentes níveis de nitrito, empregados ao final do primeiro dia de estocagem; a adição de óleo essencial nas concentrações de 0,78% e 1,56% não resultou em alterações perceptíveis, ao passo que, na concentração de 3,125%, este índice se mostrou superior e crescente ao longo do período de estocagem. Nos tratamentos elaborados com 100 mg.Kg⁻¹ foram observadas menores alterações para este parâmetro de cor.

O aumento dos índices de amarelo (b^*) pode ser atribuído a mudanças no estado químico dos pigmentos heme, ocasionado pelas alterações de pH e as possíveis condições pró-oxidantes, durante o armazenamento, alterando suas características de absorção e reflexão da luz. Estas alterações são evidenciadas pelo aumento do ângulo de tonalidade (h^*) do produto com o tempo de estocagem, que indica maior participação da tonalidade de amarelo.

Além dos efeitos da ação antimicrobiana e consequente queda de pH, também, não podem ser descartados os efeitos da taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO) da embalagem nas alterações de cor durante o armazenamento. Maiores reduções nos valores de a^* e aumento nos valores de L^* e b^* têm sido observados em produtos curados com maiores valores de oxigênio residual na embalagem ocasionado por maiores valores de TPO (Mooler et al., 2003; Juncher et al., 2003).

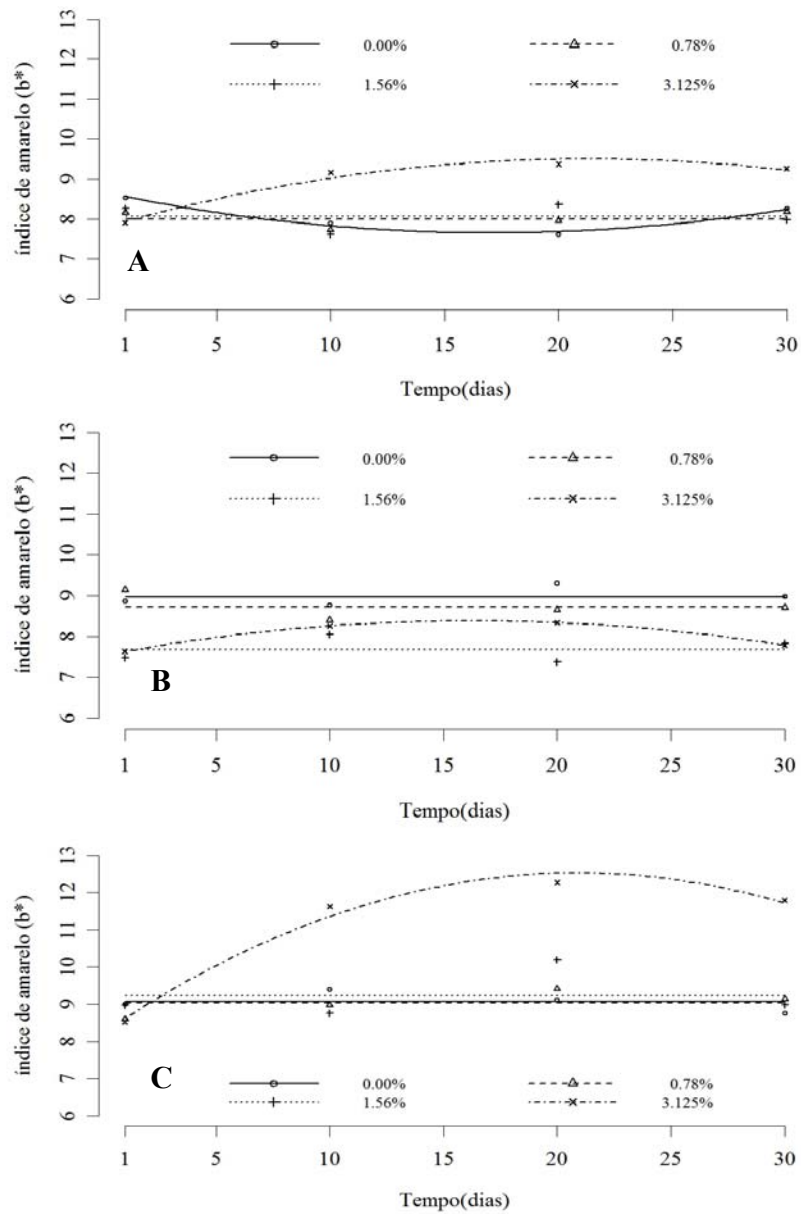


FIGURA 22 Efeito das diferentes concentrações de óleo essencial de *Satureja montana* L. e níveis de nitrito sobre o índice de amarelo (b^*) durante o armazenamento das mortadelas (25°C). **A**=0; **B**=100; **C**=200 mg.Kg⁻¹ de NaNO₂.

TABELA 7 Equações* e respectivos coeficientes de regressão (R^2) para os valores dos índices de amarelo (b^*) de modelos alimentares cárneos emulsionados do tipo mortadela, elaborados com diferentes concentrações de óleo essencial e níveis de nitrito, durante o período de estocagem a 25°C (x em dias)

Nitrito NO ₂ (mg.Kg ⁻¹)	Óleo essencial (%)	Equação	R ²
0	0,00	$y=8,677-0,119.x+0,003.x^2$	0,6549
0	0,78	$y=7,996$	-
0	1,56	$y=8,052$	-
0	3,125	$y=7,786+0,162.x-0,003.x^2$	0,7767
100	0,00	$y=8,973$	-
100	0,78	$y=8,719$	-
100	1,56	$y=7,674$	-
100	3,125	$y=7,533+0,104.x-0,03.x^2$	0,5915
200	0,00	$y=9,069$	-
200	0,78	$y=9,032$	-
200	1,56	$y=9,229$	-
200	3,125	$y=8,227+0,412.x-0,009.x^2$	0,9160

* Significativas pelo teste de “F” ($P<0,05$)

Viuda-Martos et al. (2010) avaliaram os efeitos da adição de óleos essenciais de tomilho e alecrim a uma concentração de 0,02%, sobre os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* , na fabricação de mortadelas tipo bologna. Os autores observaram aumentos significativos ($P<0,05$) para luminosidade (L^*) e índice de amarelo (b^*) e reduções nos valores de (a^*) ($P>0,05$) em decorrência da adição dos óleos essenciais.

Lee et al. (2010), estudando a eficácia de extratos de mostarda (*Brassica juncea*) sobre a oxidação lipídica em carne crua de porco moída, avaliaram os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* , obtendo resultados semelhantes aos obtidos nesta pesquisa. Os autores reportaram que os valores de L^* e a^* diminuíram com a adição do extrato de mostarda enquanto que valores de b^* foram maiores, tornando-se mais evidentes em maiores concentrações de extrato aplicadas (0,05, 0,1 e 0,2%). Foi observado, também, que a adição do extrato promoveu

uma maior estabilização do valor a^* , quando comparado ao controle e atribuíram este fato à presença de compostos fenólicos no extrato de mostarda.

A Tabela 8 apresenta os valores médios absolutos dos parâmetros de cor L^* , a^* e b^* para os diversos tratamentos avaliados no primeiro e no trigésimo dia de estocagem.

TABELA 8 Valores médios de luminosidade (L^*), índice de vermelho (a^*) e índice de amarelo (b^*) obtidos para produtos cárneos emulsionados do tipo mortadela elaborados com 0, 100 e 200 mg.Kg⁻¹ de nitrito de sódio e 0; 0,78; 1,56 e 3,125% de óleo essencial (O.E) de *S. montana* L. durante estocagem por 30 dias (dia 1 e dia 30) a 25°C

Tratamento		Luminosidade (L^*)		
NO ₂ (mg.Kg ⁻¹)	O.E (%)	1 (dia)	30 (dias)	P
0	0	54,80(±1,31) ^B	54,51(±0,90) ^{BC}	0,7666
0	0,78	54,44(±0,80) ^B	55,99(±0,81) ^{BC}	0,0802
0	1,56	54,51(±0,91) ^B	54,74(±0,47) ^{BC}	0,7165
0	3,125	55,16(±0,12) ^B	56,03(±1,28) ^{BC}	0,3061
100	0	55,75(±0,93) ^B	56,65(±0,83) ^{BC}	0,2782
100	0,78	55,71(±0,84) ^B	55,64(±0,41) ^{BC}	0,899
100	1,56	54,36(±0,99) ^B	57,31(±1,46) ^B	0,045*
100	3,125	54,78(±0,31) ^B	53,67(±1,99) ^C	0,3965
200	0	55,42(±0,39) ^B	54,83(±1,44) ^{BC}	0,2955
200	0,78	55,34(±0,59) ^B	54,94(±0,20) ^{BC}	0,3273
200	1,56	54,61(±0,40) ^B	55,49(±0,51) ^{BC}	0,0786
200	3,125	59,84 (±0,81) ^A	62,51(±0,60) ^A	0,010*

Tratamento		índice de vermelho (a^*)		
		1 (dia)	30 (dias)	P
0	0	11,41(±0,05) ^D	11,61(±0,98) ^{BC}	0,7398
0	0,78	11,17(±0,63) ^D	11,21(±0,63) ^{BC}	0,9415
0	1,56	11,61(±0,99) ^D	10,70(±0,92) ^{CD}	0,3055
0	3,125	11,71(±0,62) ^D	6,35(±0,10) ^E	0,0001*
100	0	17,14(±0,26) ^{AB}	17,22(±0,40) ^A	0,7848
100	0,78	17,83(±0,39) ^A	17,39(±0,46) ^A	0,2835
100	1,56	14,29(±0,94) ^C	14,73(±0,46) ^{AB}	0,5127
100	3,125	15,75 (±0,56) ^{BC}	11,22 (±1,79) ^{BC}	0,0140*
200	0	16,97(±0,21) ^{AB}	16,18(±2,47) ^A	0,6106
200	0,78	16,95(±0,12) ^{AB}	16,98(±0,27) ^A	0,8687
200	1,56	17,14(±0,25) ^{AB}	12,63(±2,13) ^{BC}	0,0220*
200	3,125	14,38(±0,19) ^C	7,55(±0,71) ^{DE}	8.783e-05*

...continua...

TABELA 8, Cont.

		índice de amarelo (b^*)		
Tratamento		1 (dia)	30 (dias)	P
0	0	8,54(\pm 0,14) ^{ABCD}	8,27(\pm 0,55) ^{BCD}	0,4598
0	0,78	8,16(\pm 0,25) ^{BCDE}	8,18(\pm 0,20) ^{BCD}	0,8938
0	1,56	8,27(\pm 0,55) ^{ABCDE}	7,98(\pm 0,49) ^{CD}	0,5318
0	3,125	7,90(\pm 0,41) ^{CDE}	9,26(\pm 0,22) ^B	0,0071*
100	0	8,86(\pm 0,33) ^{ABC}	8,98(\pm 0,10) ^{BC}	0,5693
100	0,78	9,13(\pm 0,38) ^A	8,71(\pm 0,32) ^{BCD}	0,2107
100	1,56	7,47(\pm 0,43) ^E	7,82(\pm 0,25) ^D	0,2963
100	3,125	7,63(\pm 0,02) ^{DE}	7,78(\pm 0,20) ^D	0,2911
200	0	9,00(\pm 0,21) ^{AB}	8,76(\pm 0,78) ^{BCD}	0,2955
200	0,78	8,6(\pm 0,26) ^{ABC}	9,14(\pm 0,16) ^B	0,0385*
200	1,56	8,97(\pm 0,30) ^{AB}	9,00(\pm 0,39) ^{BC}	0,9298
200	3,125	8,53(\pm 0,29) ^{ABCD}	11,8(\pm 0,18) ^A	7.973e-05*

Valores médios (\pm Erro Padrão). Médias na coluna acompanhadas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). *Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) para médias comparadas entre 1 e 30 dias de estocagem.

O índice de saturação corresponde intensidade ou quantidade de uma tonalidade. As variações do índice de saturação (C^*) em função do tempo de estocagem de acordo com as concentrações de óleo essencial de *S. montana* L. (0; 0,78; 1,56; 3,125%) e doses de nitrito (0, 100, 200 mg.Kg⁻¹) utilizadas na elaboração do modelo alimentar cárneo emulsionado do tipo mortadela são representadas na Figura 23. A Tabela 9 apresenta os coeficientes de regressão de cada interação dos diversos tratamentos avaliados para C^* .

De acordo com os resultados o índice de saturação foi afetado pela concentração de nitrito utilizado na elaboração das mortadelas, onde tratamentos adicionados de nitrito apresentaram maior índice C^* , indicando maior intensidade da tonalidade vermelha. Os tratamentos adicionados de óleo essencial em concentração superior a 1,56% apresentaram saturação reduzida, quando comparados aos demais tratamentos. Em mortadelas elaboradas com 3,125% de óleo foi observado um efeito significativo de tempo de estocagem ($P < 0,05$) com índices C^* inferiores ao final do armazenamento.

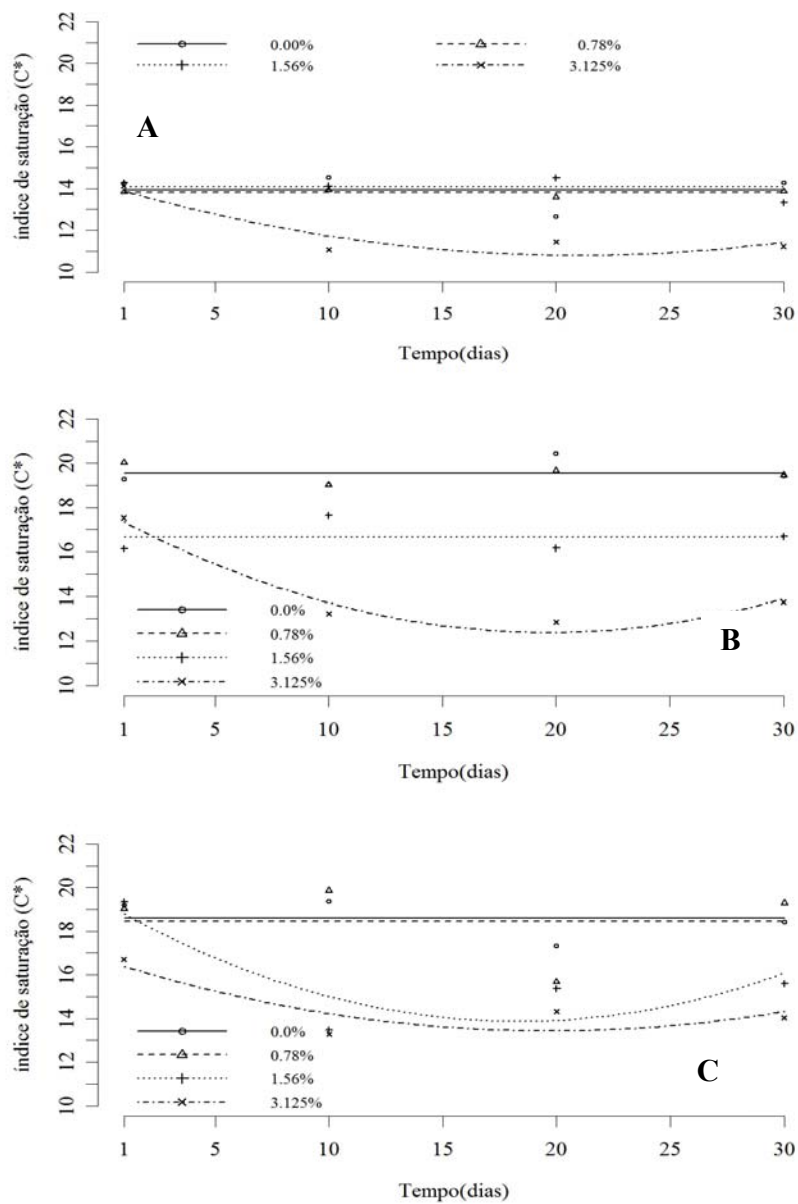


FIGURA 23 Efeito das diferentes concentrações de óleo essencial de *Satureja montana* L. e níveis de nitrito sobre o índice de saturação (C^*) durante o armazenamento das mortadelas (25°C). **A**=0; **B**=100; **C**=200 mg.Kg^{-1} de NaNO_2 .

TABELA 9 Equações* e respectivos coeficientes de regressão (R^2) para os valores dos índices de saturação (C^*) de modelos alimentares cárneos emulsionados do tipo mortadela, elaborados com diferentes concentrações de óleo essencial e níveis de nitrito, durante o período de estocagem a 25°C (x em dias)

Nitrito NO ₂ (mg.Kg ⁻¹)	Óleo essencial (%)	Equação	R ²
0	0,00	$y=13,938$	-
0	0,78	$y=13,804$	-
0	1,56	$y=14,063$	-
0	3,125	$y=14,211-0,325.x+0,007.x^2$	0,8151
100	0,00	$y=19,541$	-
100	0,78	$y=19,542$	-
100	1,56	$y=16,658$	-
100	3,125	$y=17,858-0,558.x+0,014.x^2$	0,8273
200	0,00	$y=18,587$	-
200	0,78	$y=18,549$	-
200	1,56	$y=19,373-0,597.x+0,016.x^2$	0,6310
200	3,125	$y=16,725-0,340.x+0,008.x^2$	0,7108

* Significativas pelo teste de “F” ($P<0,05$)

O ângulo de tonalidade (h^*) é a grandeza que caracteriza a qualidade da cor. As variações do parâmetro (h^*) em função do tempo de estocagem de acordo com as concentrações de óleo essencial de *S. montana* L. (0; 0,78; 1,56; 3,125%) e doses de nitrito (0, 100, 200 mg.Kg⁻¹) utilizadas na elaboração do modelo alimentar cárneo emulsionado do tipo mortadela são representadas na Figura 24. A Tabela 10 apresenta os coeficientes de regressão de cada interação dos diversos tratamentos avaliados para h^* .

A Tabela 11 apresenta os valores médios absolutos dos parâmetros de cor C^* e h^* para os diversos tratamentos avaliados no primeiro e no trigésimo dia de estocagem.

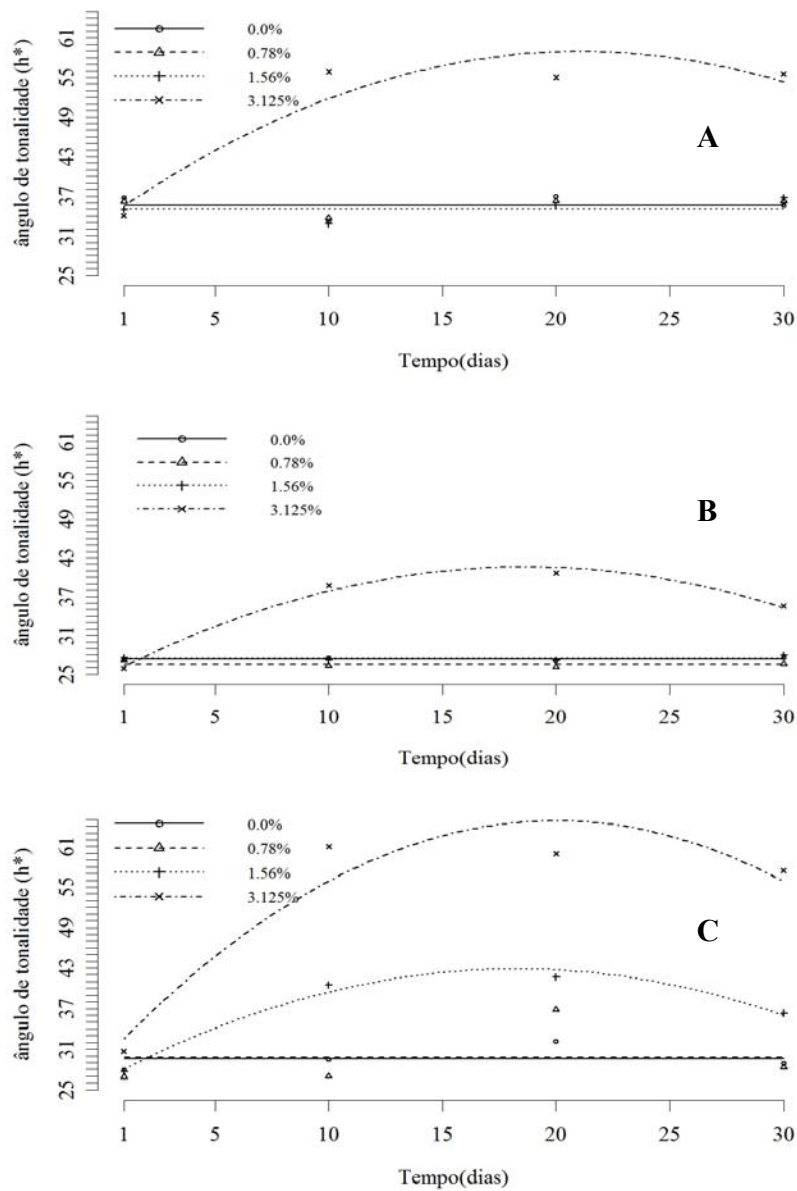


FIGURA 24 Efeito das diferentes concentrações de óleo essencial de *Satureja montana* L. e níveis de nitrito sobre o ângulo de tonalidade (h^*) durante o armazenamento das mortadelas (25°C). **A**=0; **B**=100; **C**=200 mg.Kg⁻¹ de NaNO₂.

TABELA 10 Equações* e respectivos coeficientes de regressão (R^2) para os valores dos ângulos de tonalidade (h^*) de modelos alimentares cárneos emulsionados do tipo mortadela, elaborados com diferentes concentrações de óleo essencial e níveis de nitrito, durante o período de estocagem a 25°C (x em dias)

Nitrito NO ₂ (mg.Kg ⁻¹)	Óleo essencial (%)	Equação	R ²
0	0,00	$y=35,625$	-
0	0,78	$y=35,587$	-
0	1,56	$y=35,026$	-
0	3,125	$y=33,100+2,454.x-0,058.x^2$	0,8776
100	0,00	$y=27,367$	-
100	0,78	$y=26,502$	-
100	1,56	$y=27,479$	-
100	3,125	$y=24,378+1,871.x-0,051.x^2$	0,8285
200	0,00	$y=29,607$	-
200	0,78	$y=29,741$	-
200	1,56	$y=26,220+1,840.x-0,051.x^2$	0,8824
200	3,125	$y=29,064+3,578.x-0,089.x^2$	0,8671

* Significativas pelo teste de “F” ($P<0,05$)

Dentre os níveis de nitrito testados, a utilização do nitrito (NaNO₂) na concentração de 100 mg.Kg⁻¹ pareceu ser suficiente para formação da cor característica (tonalidade vermelha). A utilização do óleo essencial em concentrações superiores a 1,56% afetou negativamente a cor do produto, com reduções do índice de vermelho (a^*), e aumento da participação da tonalidade de amarelo (aumento de b^* e h^*).

TABELA 11 Valores médios dos índices de saturação (C^*) e ângulos de tonalidade (h^*) obtidos para produtos cárneos emulsionados do tipo mortadela elaborados com 0, 100 e 200 mg.Kg⁻¹ de nitrito de sódio e 0; 0,78; 1,56 e 3,125% de óleo essencial (O.E) de *S. montana* L. durante estocagem por 30 dias (dia 1 e dia 30 a 25°C)

Tratamento		índice de saturação (C^*)		
NO ₂ (mg.Kg ⁻¹)	O.E (%)	1 (dia)	30 (dias)	<i>P</i>
0	0	14,25(±0,12) ^D	14,28(±0,53) ^{CDE}	0,9324
0	0,78	13,84(±0,35) ^D	13,88(±0,58) ^{CDE}	0,9181
0	1,56	14,28(±0,53) ^D	13,34(±1,03) ^{DE}	0,2346
0	3,125	14,14(±0,30) ^D	11,23(±0,14) ^E	0,0001*
100	0	19,29(±0,37) ^A	19,42(±0,40) ^A	0,7068
100	0,78	20,03(±0,49) ^A	19,45(±0,50) ^A	0,2278
100	1,56	16,12(±1,04) ^C	16,67(±0,52) ^{ABC}	0,4597
100	3,125	17,50(±0,50) ^B	13,68(±1,53) ^{CDE}	0,0146*
200	0	19,21(±0,28) ^A	18,41(±2,53) ^{AB}	0,6140
200	0,78	19,01(±0,20) ^A	19,28(±0,22) ^A	0,1804
200	1,56	19,35(±0,36) ^A	15,54(±1,90) ^{BCD}	0,0267*
200	3,125	16,72(±0,09) ^{BC}	14,02(±0,24) ^{CDE}	5.3e-05*
ângulo de tonalidade (h^*)				
		1 (dias)	30 (dias)	<i>P</i>
0	0	36.82(±0,37) ^A	35.55 (±4,03) ^B	0,6172
0	0,78	36.19 (±2,39) ^A	36.17 (±1,37) ^B	0,9915
0	1,56	35.55 (±4,03) ^{AB}	36.74 (±0,68) ^B	0,6406
0	3,125	34.02 (±2,75) ^{AB}	55.54 (±1,01) ^A	0,0002*
100	0	27.33(±0,53) ^C	27.55 (±0,28) ^D	0,5742
100	0,78	27.12(±0,64) ^C	26.60 (±0,76) ^D	0,4170
100	1,56	27.61 (±0,19) ^C	27.97 (±0,28) ^D	0,1387
100	3,125	25.88 (±0,86) ^C	35.02 (±4,03) ^{BC}	0,0184*
200	0	27.94 (±0,28) ^C	28.61 (±1,85) ^{CD}	0,5729
200	0,78	26.90 (±0,63) ^C	28.29 (±0,67) ^{CD}	0,0579
200	1,56	27.63 (±0,46) ^C	35.79 (±4,03) ^B	0,0253*
200	3,125	30.69 (±1,15) ^{BC}	57.42 (±2,83) ^A	0,0001*

Valores médios (±Erro Padrão). Médias na coluna acompanhadas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). *Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) para médias comparadas entre 1 e 30 dias de estocagem.

A Figura 25 representa com fotografias as variações da coloração das mortadelas para os diversos tratamentos avaliados.

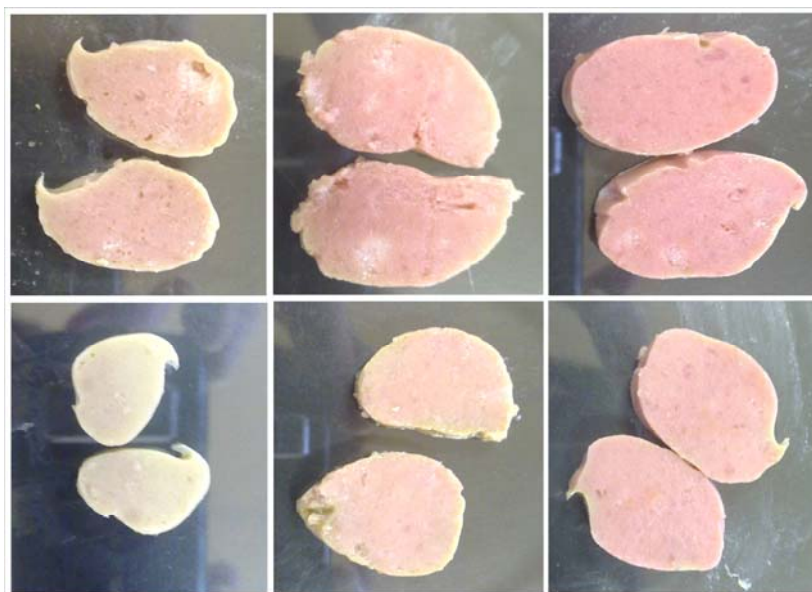


FIGURA 25 Efeito das diferentes concentrações de óleo essencial e nitrito na coloração das mortadelas. A=0/0; B=0,78/100; C=0,0/100; D=3.125/0; E=1,56/100; F=0/200 de óleo essencial/nitrito.

4.4 Oxidação lipídica (Índice TBAR's)

O efeito do óleo essencial de *S. montana* L. sobre a oxidação lipídica no modelo alimentar cárneo emulsionado do tipo mortadela foi avaliado por meio do índice TBAR's (*Reactive substances tiobarbituric acid*). O malonaldeído pode ser formado a partir de ácidos graxos poliinsaturados e sua concentração pode ser medida pela reação com ácido tiobarbitúico, por meio da formação de produtos de condensação com coloração avermelhada por espectrofotometria (Gordon, 2001).

Foram observados efeitos significativos ($P < 0,05$) da interação tripla entre os tratamentos e tempo de estocagem (concentrações de óleo essencial \times níveis de nitrito \times tempo de estocagem) para os índices TBAR's. Os efeitos para os índices foram decompostos e cada interação entre concentrações de óleo essencial e níveis de nitrito aplicados foi avaliada, com o tempo de estocagem, por meio de análise de regressão.

As variações dos índices TBAR's, em função do tempo de estocagem, de acordo com as concentrações de óleo essencial de *S. montana* L. (0; 0,78; 1,56; 3,125%) e doses de nitrito (0, 100, 200 mg.Kg⁻¹), utilizadas na elaboração do modelo alimentar cárneo, emulsionado do tipo mortadela, são representadas na Figura 26. Na Tabela 12 apresentam-se os coeficientes de regressão de cada interação dos diversos tratamentos avaliados para os índices TBAR's.

Os resultados apresentados evidenciam o potencial antioxidante do óleo essencial utilizado. Nas mortadelas fabricadas sem adição de nitrito de sódio (Gráfico A, Figura 26) e também sem aplicação do óleo essencial do condimento (controle), foram observados índices TBAR's, significativamente, ($P < 0,05$) superiores aos encontrados, para todos demais tratamentos, avaliados ao final do período de estocagem (30 dias). Na Tabela 13 apresentam-se os valores médios absolutos dos índices TBAR's, para os diversos tratamentos avaliados no primeiro e no trigésimo dia de estocagem.

O óleo essencial de *Satureja montana* apresenta como constituintes majoritários o timol e carvacrol e sua atividade sobre a oxidação lipídica é creditada à presença destes compostos, antioxidantes consagrados (Baydar et al., 2004; Dorman et al., 2003; Yanishlieva et al., 2006). A atividade antioxidante destes compostos fenólicos está relacionada com a presença de radicais hidroxil ligados ao anel aromático, capazes de doar átomos de hidrogênio com elétrons e estabilizar radicais livres (Figura 27). O radical formado é estabilizado pelas estruturas de ressonância na molécula.

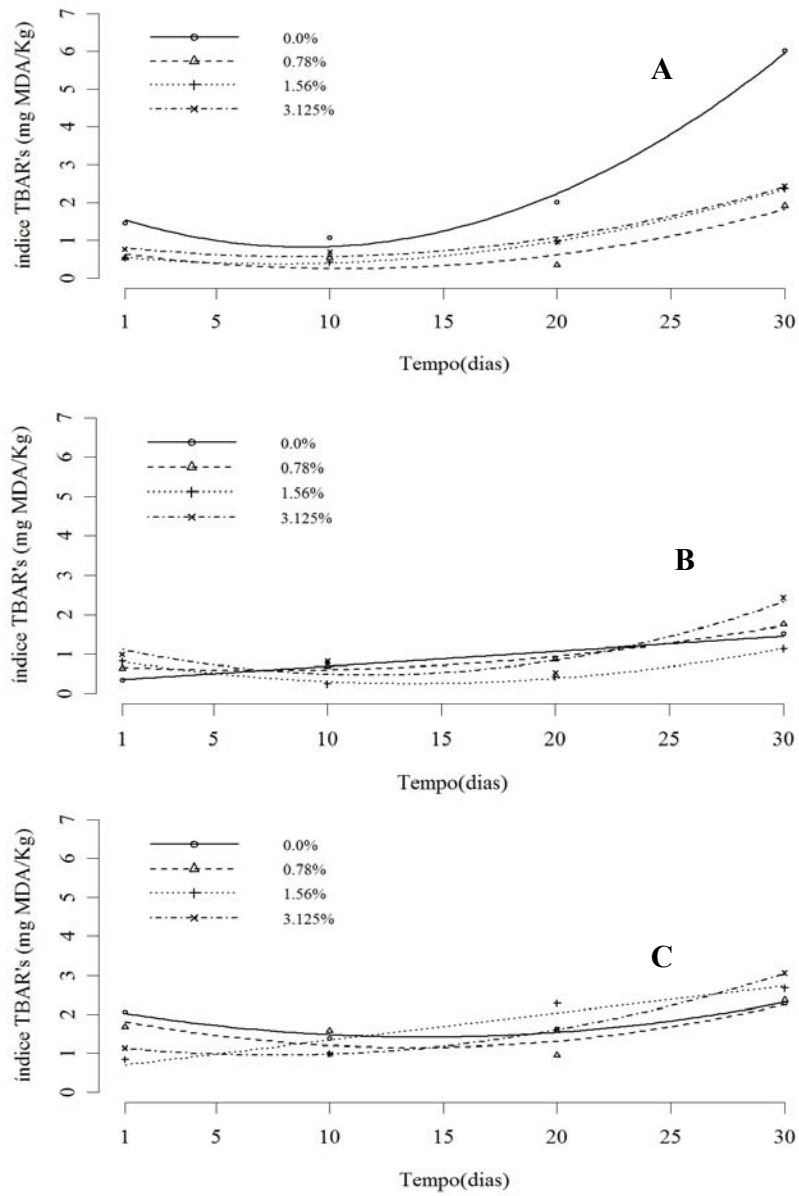


FIGURA 26 Efeito das diferentes concentrações de óleo essencial de *Satureja montana* L. e níveis de nitrito sobre o índice TBAR's durante o armazenamento das mortadelas (25°C). A=0; B=100; C=200 mg.Kg⁻¹ de NaNO₂.

TABELA 12 Equações* e respectivos coeficientes de regressão (R^2) para os índices TBAR's expressos em mg de malonaldeído por kilo de amostra (mg MDA)/Kg de modelos alimentares cárneos emulsionados do tipo mortadela, elaborados com diferentes concentrações de óleo essencial e níveis de nitrito, durante o período de estocagem a 25°C (x em dias)

Nitrito NO ₂ (mg.Kg ⁻¹)	Óleo essencial (%)	Equação	R ²
0	0,00	$y=1,743-0,207.x+0,011.x^2$	0,9910
0	0,78	$y=0,715-0,088.x+0,004.x^2$	0,8882
0	1,56	$y=0,600-0,060.x+0,004.x^2$	0,9954
0	3,125	$y=0,870-0,072.x+0,004.x^2$	0,9662
100	0,00	$y=0,303+0,038.x$	0,9202
100	0,78	$y=0,683-0,031.x+0,002.x^2$	0,9773
100	1,56	$y=0,887-0,095.x+0,003.x^2$	0,9708
100	3,125	$y=1,248-0,133.x+0,006.x^2$	0,8651
200	0,00	$y=2,125-0,102.x+0,004.x^2$	0,9472
200	0,78	$y=1,909-0,113.x+0,004.x^2$	0,6845
200	1,56	$y=0,620+0,070.x$	0,9168
200	3,125	$y=1,184-0,063.x+0,004.x^2$	0,9925

* Significativas pelo teste de "F" ($P<0,05$)

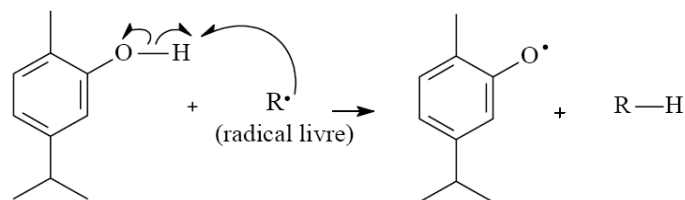


FIGURA 27 Estrutura do carvacrol sendo atacada por um radical livre (R[•])
 FONTE: Lima (2008).

TABELA 13 Valores médios para os índices TBAR's (mg de malonaldeído/Kg de amostra) obtidos para produtos cárneos emulsionados do tipo mortadela elaborados com 0, 100 e 200 mg.Kg⁻¹ de nitrito de sódio e 0; 0,78; 1,56 e 3,125% de óleo essencial (O.E.) de *S. montana* L. durante estocagem por 30 dias/25°C

Tratamento		índice TBAR's (mg de MDA/Kg)		
NO ₂ (mg.Kg ⁻¹)	O.E (%)	1 (dia)	30 (dias)	<i>P</i>
0	0	1.46 (±0,01) ^C	6.03 (±0,18) ^A	1.915e-06*
0	0,78	0.53 (±0,01) ^H	1.91 (±0,08) ^{DE}	1.035e-05*
0	1,56	0.54 (±0,01) ^{GH}	2.35 (±0,09) ^{CD}	5.346e-06*
0	3,125	0.76 (±0,01) ^F	2.44 (±0,24) ^C	0.0002*
100	0	0.32 (±0,01) ^I	1.52 (±0,11) ^{EF}	4.482e-05*
100	0,78	0.62 (±0,01) ^G	1.74 (±0,04) ^E	2.709e-06*
100	1,56	0.81 (±0,03) ^F	1.13 (±0,1) ^F	0.0079*
100	3,125	0.99(±0,06) ^E	2.43(±0,28) ^C	0.0010*
200	0	2.06 (±0,04) ^A	2.28(±0,05) ^{CD}	0.0060*
200	0,78	1.66 (±0,03) ^B	2.36 (±0,17) ^C	0.0022*
200	1,56	0.84(±0,01) ^F	2.67(±0,11) ^{BC}	9.162e-06*
200	3,125	1.12 (±0,05) ^D	3.06(±0,15) ^B	3.352e-05*

Valores médios (±Erro Padrão). Médias na coluna acompanhadas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05). *Diferenças significativas (P≤0,05) para médias comparadas entre 1 e 30 dias de estocagem.

Outros componentes, presentes no óleo essencial *S. Montana*, utilizado nesta pesquisa, também, apresentam atividade antioxidante relatada na literatura. Ruberto & Baratta (2000), avaliando cerca de 100 constituintes purificados de diversos óleos essenciais, verificou atividade antioxidante pronunciada nos compostos μ e γ -terpineno, inclusive comparando seus efeitos aos de constituintes fenólicos quando em elevadas concentrações.

Radonic & Milos (2003), utilizando a metodologia TBAR's, avaliaram a atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial de *S. montana* e também de seus componentes principais timol e carvacrol em sua fração isolada. Os autores trabalharam com concentrações de 100 e 1000ppm e relataram atividade pronunciada em ambas as concentrações, para os óleos e frações isoladas de seus componentes, atribuindo o efeito a seus principais constituintes (timol e

carvacrol). Nesta pesquisa concluiu-se que o óleo de segurelha possui forte efeito antioxidante, podendo ser comparado a antioxidantes sintéticos e naturais (α -tocoferol) consagrados.

Ćavar et al. (2008) avaliaram a atividade antioxidante do óleo essencial de *S. montana* pelo método DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila), dosando a habilidade dos componentes do óleo de doar átomos de hidrogênio ou elétrons neutralizando radicais livres. Os autores reportaram atividade efetiva e atribuíram o efeito do óleo essencial sobre o radical DPPH aos constituintes fenólicos timol e carvacrol.

Com a finalidade de inibir a oxidação lipídica, diversos antioxidantes sintéticos como BHA, BHT, TBHQ são utilizados na indústria de alimentos. No entanto, o uso tem sido restrito, em virtude de possíveis riscos à saúde e toxicidade. O uso de aditivos naturais tem despertado interesse, e alguns autores reportam eficiências equivalentes ou superiores de compostos naturais com relação à atividade antioxidante. Sebranek et al. (2005) compararam a atividade antioxidante de extratos de alecrim com antioxidantes sintéticos BHA/BHT, adicionados em salsichas, utilizando o método TBAR's. Os autores observaram eficiência semelhante nos testes realizados.

Nas mortadelas elaboradas com 100 mg.Kg⁻¹ de nitrito (Gráfico B, Figura 26), observaram-se índices TBAR's inferiores mesmo em amostras sem adição óleo essencial. O nitrito possui efeito antioxidante por meio da formação de compostos estáveis com a mioglobina indisponibilizando o Fe, para atuar como catalisador ativo das reações de oxidação (Karl-Otto, 2008).

Estudos foram realizados por Al-Shuib & Al-Abdullah (2002) com mortadelas elaboradas contendo diferentes níveis de nitrito e estocadas por 14 semanas a 4 e 25°C. Ao final do período de armazenamento foram observados índices TBAR's reduzidos para amostras que continham nitrito, observando ainda, índices significativamente superiores nas amostras estocadas a 25°C.

De maneira geral, nesta pesquisa, o efeito antioxidante foi mais pronunciado em mortadelas fabricadas com 100 mg.Kg^{-1} de nitrito quando comparadas às elaboradas com 200 mg.Kg^{-1} . Este efeito também foi observado por Al-Shuibi & Al-Abdullah (2002), que encontrou em seus resultados com mortadelas valores de TBA para tratamentos com 40 e 80 ppm de nitrito na faixa de 0,53-0,59mg/Kg e valores de 0,65mg/Kg para amostras com 120ppm.

Segundo Lücke (2000), as concentrações de nitrito, necessárias para ocorrência dos diversos efeitos nos produtos cárneos, seriam de 30 a 50ppm, para desenvolvimento de cor; de 20 a 40ppm para desenvolvimento de aroma; de 80 a 150ppm para o efeito conservante, e entre 20 a 50ppm para o efeito antioxidante. Esses valores são dependentes do tipo de produto cárneo.

Melton (1983) reportou sabores oxidados detectáveis em carne suína e bovina, com valores de TBA na faixa de 0,3-1,0; frango 1,0-2,0 e peru $> 3,0$. No entanto, estes valores de TBA não devem ser considerados como referência para os limiares de odor rançoso da carne, pois, os valores de TBA são influenciados por diversos fatores. Produtos cárneos condimentados parecem mascarar os efeitos de “*off flavor*” desenvolvidos.

Pode-se inferir também que ocorreu um efeito significativo do tempo de estocagem na oxidação lipídica para todos os tratamentos avaliados, onde os índices TBAR's se mostraram superiores ($P \leq 0,05$) ao final do período de armazenamento (Tabela 13).

Lee et al. (2010) avaliaram a eficácia do extrato de mostarda (*Brassica juncea*) no retardamento do ranço oxidativo em carne crua de porco moída, e reportaram aumentos significativos ($P < 0,05$) nos dos índices TBAR's e percentual de ácidos graxos livres durante os 14 dias de estocagem a 4°C . Este fato também foi observado com as mortadelas elaboradas e analisadas neste experimento.

Estevéz & Cava (2006) avaliaram a eficácia do óleo essencial de alecrim (150, 300, 600ppm) na inibição da oxidação lipídica em salsichas estocadas a 4°C por 60 dias. Foi observado um incremento nos valores de TBAR's durante o armazenamento; o óleo aplicado na concentração de 150 ppm não demonstrou efeito ao passo que doses de 300 e 600ppm foram efetivas, com atividade mais pronunciada na maior concentração testada.

Viuda-Martos et al. (2010) avaliaram o efeito da adição de óleos essenciais de alecrim e tomilho (0,02%) sobre o índice TBAR's de mortadelas estocadas por 24 dias em embalagens com atmosferas diferenciadas. Os autores observaram índices inferiores ($P < 0,05$) para mortadelas adicionadas de óleos essenciais quando comparadas ao controle. Foi observado também um efeito significativo do tempo de estocagem, fato também observado nesta pesquisa.

Nas mortadelas elaboradas com 200 mg.Kg⁻¹ de nitrito um evento inesperado pode ser observado, onde índices TBAR's maiores para concentrações de óleo essencial maior foram detectados. Este fato não condiz com a maioria dos relatos da literatura. Este fenômeno sugere uma possível interação entre o nitrito e compostos químicos presentes na fração do óleo essencial de *S. montana* L. Os compostos aromáticos poderiam interagir com nitrito (Figura 28) e o antagonismo existente prejudicar efeito antioxidante isolado do óleo essencial e nitrito.

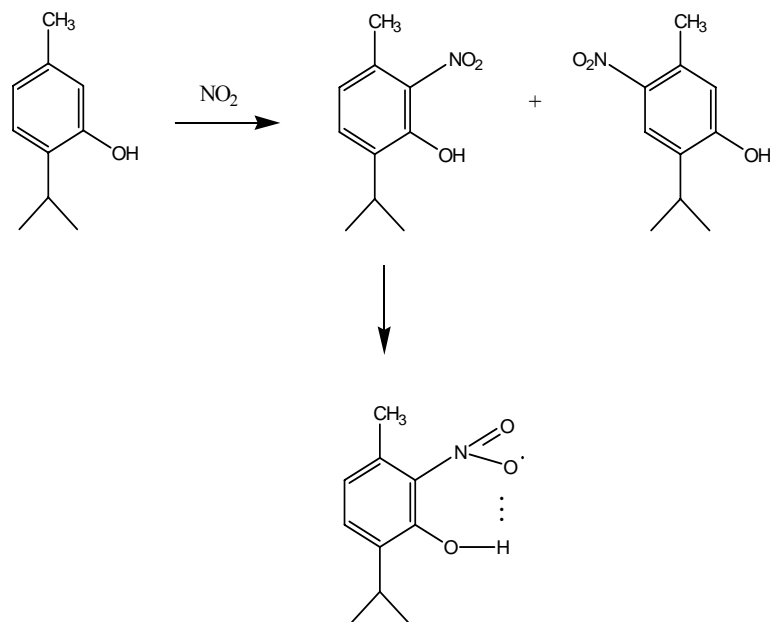


FIGURA 28 Esquema de reação da possível interação existente entre compostos aromáticos (timol) do óleo essencial e o nitrito. Linha pontilhada representa a ligação de hidrogênio.

A metodologia empregada para avaliação do efeito inibitório sobre a oxidação lipídica é baseada na reação entre o malonadeído e o ácido tiobarbitúrico, entretanto esta reação não é específica e a reação com uma ampla variedade de outros produtos pode contribuir para a absorção. Alcadienos como o 2,4 decadienal também podem reagir com TBA. Diversos componentes de alimentos incluindo proteínas, produtos de reação de Maillard e produtos da degradação de açúcares podem afetar a determinação. Para enfatizar a falta de especificidade os valores obtidos no teste são descritos com substância reativas ao ácido tiobarbitúrico (Gordon, 2001).

4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima – CIM

Os óleos essenciais e alguns de seus constituintes foram testados *in vitro* por diversos autores, e demonstraram possuir atividade antimicrobiana comprovada sobre patógenos e bactérias deterioradoras (Oussalah et al., 2007; Donaldson et al., 2005; Hsieh, et al., 2001; Dorman & Deans, 2000; Kotzekidou et al., 2008).

A formação dos halos de inibição sobre a cultura testada evidenciam o efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Satureja montana* L. Os valores observados para o diâmetro dos halos inibitórios na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial sobre *C. perfringens* são apresentados na Figura 29.

Foi observada a formação de halos inibitórios, em concentrações superiores a 1,56% ($15,6\mu\text{L.mL}^{-1}$), com diâmetro médio de 2mm, sendo esta determinada a concentração mínima inibitória (CIM). A concentração mínima inibitória é citada pela maioria dos pesquisadores como a medida do desempenho antibacteriano dos óleos essenciais (Burt, 2004).

Para demais concentrações os diâmetros médios dos halos foram 5,67mm em $31,25\mu\text{L.mL}^{-1}$; 8,67mm para $62,50\mu\text{L.mL}^{-1}$; 10mm para $125\mu\text{L.mL}^{-1}$; 10,67 para $250\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 11,67mm para $500\mu\text{L.mL}^{-1}$.

No micropoço controle, o qual continha somente o diluente DMSO (dimetil sulfóxido) não foi observada a formação de halo inibitório, demonstrando a não interferência do diluente empregado na atividade do óleo sobre o microrganismo. O halo inibitório mais pronunciado foi observado na maior concentração de óleo aplicada 50% ($500\mu\text{L.mL}^{-1}$), provavelmente, em virtude da maior concentração dos componentes ativos do óleo essencial.

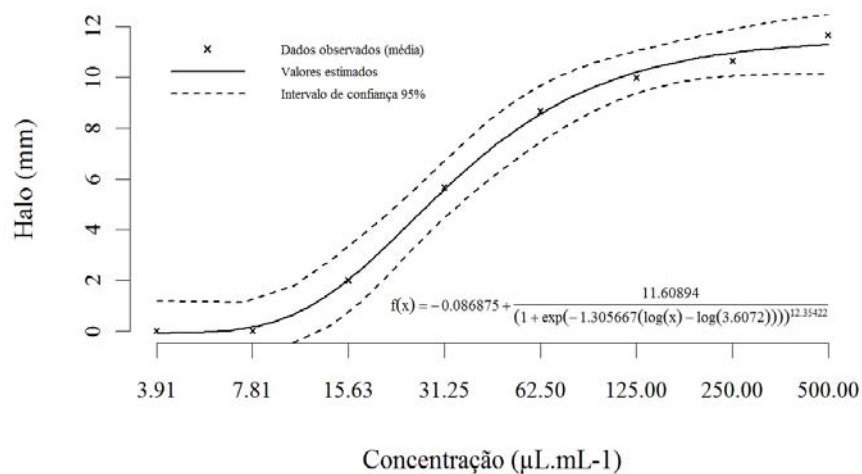


FIGURA 29 Diâmetro dos halos inibitórios (mm) em função das diferentes concentrações de óleo essencial de *S. montana* sobre *Clostridium perfringens* tipo A ATCC3624. x média dos dados observados; descontados os diâmetros dos micropoços.

Foi realizado um controle positivo com solução de cloranfenicol 1000 mg.L⁻¹, sendo observado um valor médio para o halo de 16,67mm (halo central na placa Figura 30).

Geralmente, óleos essenciais que possuem propriedades antimicrobianas pronunciadas são aqueles que apresentam elevado percentual de compostos fenólicos como eugenol, timol e carvacrol. A importância da presença de grupos hidroxil em compostos fenólicos tem sido confirmada (Dorman & Deans, 2000).

O óleo essencial testado apresentou elevadas concentrações de timol e carvacrol suportando seu efeito sobre o microrganismo testado.



FIGURA 30 Formação dos halos de inibição sobre *C. perfringens* pela metodologia Difusão Cavidade em Ágar.

Timol e carvacrol são capazes de desintegrar a membrana externa de bactérias Gram-negativas liberando lipopolissacrídeos e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP (Helander et al., 1998). Juven et al. (1994) avaliaram o efeito do timol sobre *S. typhimurium* e *S. aureus* e formularam a hipótese de que o componente se liga às proteínas de membrana hidrofobicamente e, por meio de pontes de hidrogênio, alterando as características de permeabilidade da membrana.

Em estudos com *B. cereus* demonstrou-se que o carvacrol interage com a membrana celular e se dissolve na bicamada fosfolipídica e presume-se alinhar entre as cadeias de ácidos graxos. Esta distorção da estrutura física causaria expansão e desestabilização da membrana, aumentando sua fluidez que, por sua vez, aumenta a permeabilidade passiva (Ultee et al., 2000).

O timol é, estruturalmente, semelhante ao carvacrol, com um grupo hidroxil ligado em posições diferentes no anel fenólico. A diferente localização do grupamento hidroxil não aparenta influenciar na atividade do óleo essencial. O efeito do timol sobre *B. cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* aparenta ser comparável ao do carvacrol, por exemplo (Lambert et al., 2001). A significância do anel fenólico na atividade (desestabilidade eletrônica) é comprovada pela ausência de atividade do mentol quando comparado ao carvacrol estruturalmente semelhante (Ultee et al., 2002).

Paralelamente à inibição do crescimento de células vegetativas, a inibição da produção de toxinas é de grande interesse para microbiologia de alimentos. O carvacrol é capaz de inibir a síntese de toxinas de *B. cereus*. Duas teorias são propostas para o modelo de ação na limitação de toxinas: se a excreção de toxinas é um processo ativo pode ocorrer insuficiência de ATP e força próton motiva para exportá-la do meio intracelular; alternativamente, a baixa taxa de crescimento específica resulta num maior consumo de energia para manutenção da viabilidade celular, conseqüentemente, prejudicando os estoques energéticos para síntese de toxinas (Ultee & Smid, 2001).

O *p*-cimeno, também, foi encontrado em concentrações significativas na fração do óleo essencial. O *p*-cimeno é o precursor biológico do carvacrol e causa um inchaço da membrana citoplasmática, tornando-a mais extensa do que a molécula de carvacrol. Não possui efeito se atuar sozinho, mas combinando com o carvacrol possui um efeito sinérgico atuando sobre *B. cereus in vitro* e arroz. Sobre este microrganismo, o *p*-cimeno parece ser incorporado à bicama lipídica, facilitando o transporte de carvacrol por meio da membrana citoplasmática (Ultee et al., 2002).

Ciani et al. (2000) avaliaram a atividade do óleo essencial de *Satureja montana* L. *in vitro*, sobre 46 espécies de leveduras, incluindo leveduras

deterioradoras, patogênicas e industriais. Os autores reportaram valores de MIC na faixa de 0,10 a 0,25 μ L.mL⁻¹.

Mirjana & Nada (2004) estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de segurelha (*S. montana*) colhida na parte central da Dalmácia (Croácia) sobre cinco bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabile*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhi*) quatro bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*) e cinco fungos filamentosos e leveduras patogênicas (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Candida rugosa* e *Saccharomyces cerevisiae*) utilizando o método de diluição em ágar. Os autores relataram forte atividade do óleo sobre todas as linhagens testadas com exceção de *Pseudomonas aeruginosa*; a atividade máxima foi observada sobre *E. coli*, *S. aureus* e fungos, com valor de CIM para *E. coli* de 0,06%.

Bezbradica et al. (2005) utilizando a mesma metodologia utilizada nesta pesquisa, a de difusão cavidade em ágar, avaliaram a atividade do óleo essencial de *S. montana* sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium* sp. e *Pseudomonas putida*. O óleo essencial numa concentração de 5% diluído em etanol demonstrou atividade antimicrobiana sobre todas as bactérias testadas, sendo *Corynebacterium* sp. o organismo mais suscetível.

Čavar et al. (2008) avaliaram o efeito inibitório do óleo essencial de *Satureja montana* L. obtido por hidrodestilação utilizando a metodologia de difusão em discos, sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. Todos os microrganismos testados foram inibidos pelo óleo essencial.

Si et al. (2009) avaliaram o potencial de inibição de 66 óleos essenciais e alguns de seus componentes isolados sobre *Clostridium perfringens* tipo A, encontrando uma inibição de mais de 80% em 33 destes componentes testados. Os valores de CIM₉₅ variaram entre 167 e 425 µg.mL⁻¹, sendo os componentes timol e carvacrol uns dos mais eficientes inibidores dentre os testados pelos autores.

Para aplicação nas mortadelas foram escolhidas as concentrações de 1,56% (concentração inibitória mínima); 0,78% para verificação de efeitos combinados as doses de nitrito; e 3,125% levando em consideração a redução de atividade provocada pelos constituintes (lipídios, carboidratos e proteínas) dos alimentos.

4.5.1 Análise ultraestrutural do efeito do óleo essencial de *S. montana* sobre *Clostridium perfringens*

Os danos causados à parede celular bacteriana e a perda de constituintes celulares podem ser observados por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

As alterações morfológicas das células de *Clostridium perfringens* ATCC3624, causadas pelo tratamento com óleo essencial de *Satureja montana* L., na sua concentração inibitória mínima (CIM), são apresentadas nas micrografias eletrônicas de transmissão da Figura 31.

As micrografias da cultura celular não tratada, sem exposição ao óleo essencial, demonstraram uma parede fina e contínua e demais estruturas celulares bem definidas. As células de *C. perfringens*, submetidas ao contato com o óleo (Figuras 31 C, D, E e F), apresentaram morfologia adulterada; a parede celular apresenta irregularidades e alterações degenerativas, em alguns casos conduzindo à ruptura da parede e consequente lise celular.

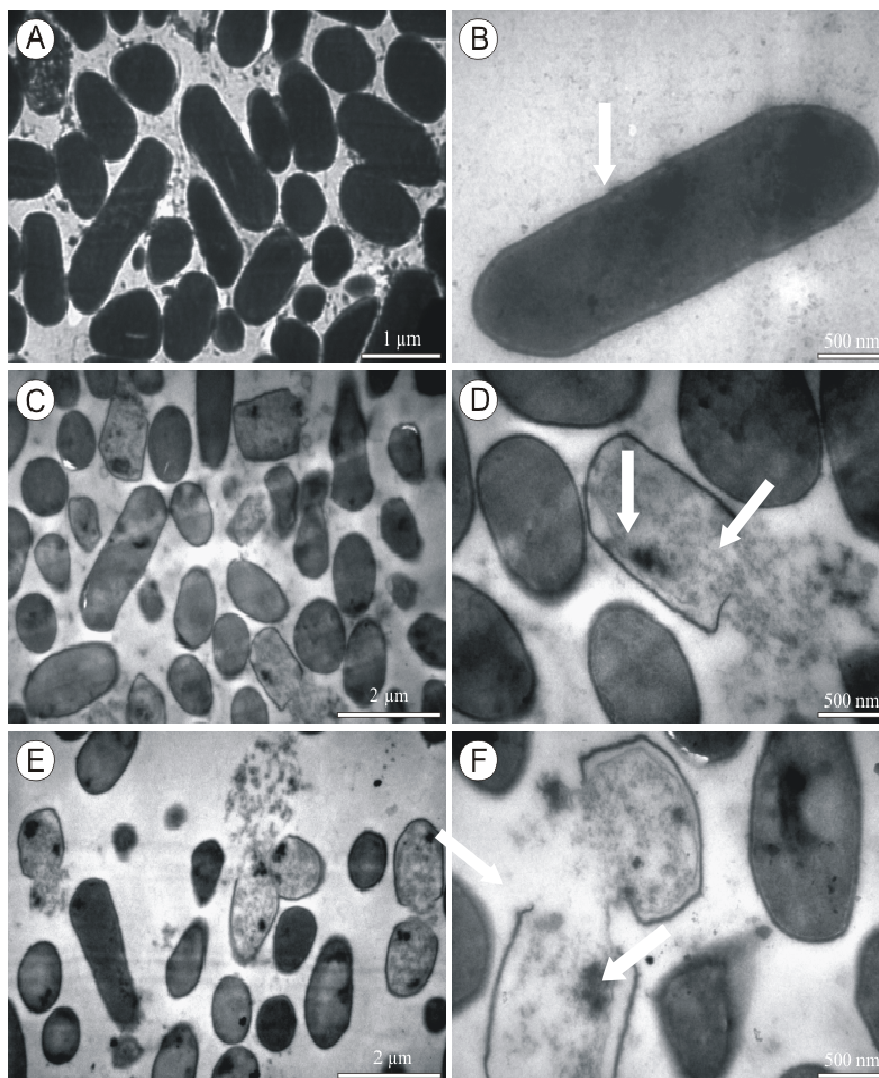


FIGURA 31 MET – Micrografias eletrônicas de transmissão. Aumento em A x7000; B x12000; C x4400; D x12000; E x4400; F x12000. Figuras A e B células de *Clostridium perfringens* ATCC 3624 sem tratamento com óleo essencial (controle). Figuras C e D representam células de *C. perfringens* tratadas com óleo essencial de *Satureja montana* L. na Concentração inibitória mínima (CIM) após 15 minutos de contato; figuras E e F após 45 minutos de contato. As setas apontam os danos causados pelo tratamento com óleo essencial.

Conforme indicado pelas setas brancas, nas células tratadas também foi observado uma distribuição desigual do citoplasma, ocorrendo coagulação e aglomeração de materiais intracelulares (regiões negras concentradas). As células também demonstraram ausência de citoplasma em determinadas regiões em virtude da perda da funcionalidade da membrana, característico do mecanismo de ação dos componentes majoritários do óleo essencial de *S. montana* L., como descrito anteriormente.

Não foi observada a formação de esporos em virtude do contato do óleo essencial com as células viáveis do microrganismo estudado.

4.6 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *S. montana* sobre *C. perfringens* inoculado em mortadela

As variações nas contagens de células viáveis de *Clostridium perfringens* tipo A ATCC 3624 nas mortadelas elaboradas com diferentes concentrações de óleo essencial (0,0; 0,78; 1,56; 3,125%) e níveis de nitrito (0, 100 e 200 mg.Kg⁻¹), estocadas a 25°C por 30 dias são apresentadas na Figura 32. A Tabela 14 apresenta os valores absolutos das populações nos diversos tratamentos avaliados durante o período de armazenamento.

Nas mortadelas elaboradas sem adição de óleo essencial e sem nitrito, o controle positivo, ao final do primeiro dia de estocagem foi observado um aumento de 2 ciclos logarítmicos nas contagens de células viáveis (10⁷ para 10⁹ UFC.g⁻¹). A matriz alimentar, utilizada no experimento, é um bom meio para o crescimento de *C. perfringens*, e fatores como a temperatura de estocagem e embalagem a vácuo contribuíram para este crescimento.

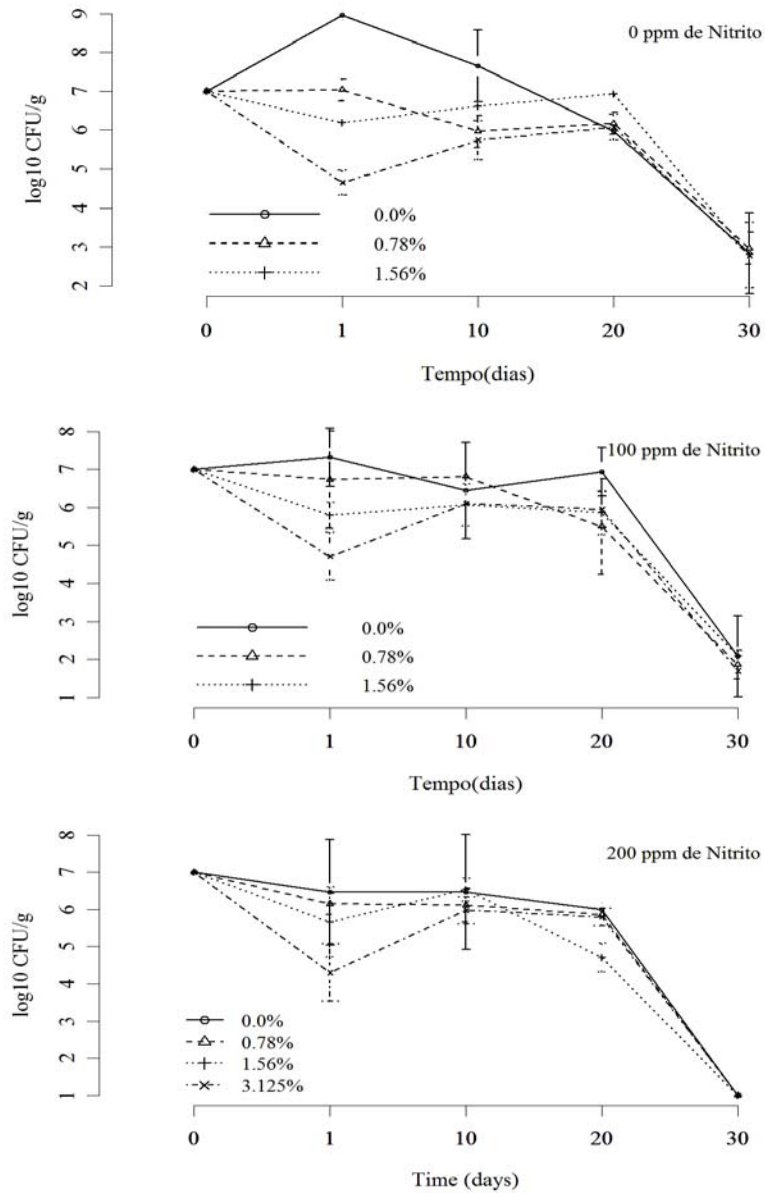


FIGURA 32 Contagens médias (\pm Erro Padrão) de *Clostridium perfringens* tipo A ATCC3624 em mortadelas elaboradas com diferentes níveis de nitrito e concentrações de óleo essencial estocadas por 30 dias a 25°C.

TABELA 14 Populações de *Clostridium perfringens* tipo A ATCC 3624 (\log_{10} UFC.g⁻¹) em modelos cárneos emulsionados do tipo de mortadela elaborados com diferentes níveis de nitrito de sódio (0, 100 e 200 mg.Kg⁻¹) e concentrações de óleo essencial (O.E) de *Satureja montana* L. (0,0; 0,78; 1,56; 3,125%) durante estocagem por 30 dias/25°C

Tratamento		LOG ₁₀ UFC.g ⁻¹									
NITRITO (mg.Kg ⁻¹)	O.E (%)	DIA 0		DIA 1		DIA 10		DIA 20		DIA 30	
0	0,00	7,00 (±0,00)	Ac	8,95 (±0,03)	Aa	7.65 (±0,21)	Ab	5.97 (±0,04)	Bd	2.83 (±0,24)	Ae
0	0,78	7,00 (±0,00)	Aa	7,04 (±0,07)	Ba	5.96 (±0,10)	Cb	6.17 (±0,07)	Bb	2.96 (±0,09)	Ac
0	1,56	7,00 (±0,00)	Aa	6,20 (±0,02)	Cc	6.60 (±0,06)	Bb	6.93 (±0,04)	Aa	2.79 (±0,05)	Ad
0	3,125	7,00 (±0,00)	Aa	4,65 (±0,07)	Ec	5.74 (±0,12)	Cb	6.07 (±0,08)	Bb	2.78 (±0,19)	Ad
100	0,00	7,00 (±0,00)	Aa	7,32 (±0,18)	Ba	6.45 (±0,29)	Ba	6.94 (±0,15)	Aa	2.08 (±0,25)	Bb
100	0,78	7,00 (±0,00)	Aa	6,73 (±0,30)	Ba	6.81 (±0,06)	Ba	5.50 (±0,29)	Bb	1.86 (±0,09)	Cc
100	1,56	7,00 (±0,00)	Aa	5,79 (±0,08)	Db	6.06 (±0,13)	Cb	5.86 (±0,13)	Bb	2.08 (±0,25)	Bc
100	3,125	7,00 (±0,00)	Aa	4,71 (±0,15)	Ec	6.10 (±0,02)	Cb	5.94 (±0,11)	Bb	1.69 (±0,00)	Cd
200	0,00	7,00 (±0,00)	Aa	6,46 (±0,33)	Ca	6.47 (±0,36)	Ba	5.99 (±0,04)	Ba	1.00 (±0,00)	Db
200	0,78	7,00 (±0,00)	Aa	6,15 (±0,07)	Cb	6.11 (±0,11)	Cb	5.86 (±0,04)	Bc	1.00 (±0,00)	Dd
200	1,56	7,00 (±0,00)	Aa	5,66 (±0,22)	Dc	6.53 (±0,07)	Bb	4.71 (±0,09)	Bd	1.00 (±0,00)	De
200	3,125	7,00 (±0,00)	Aa	4,30 (±0,18)	Ec	5.98 (±0,08)	Cb	5.80 (±0,05)	Cb	1.00 (±0,00)	Dd

Valores médios (± Erro Padrão). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, e mesma letra minúscula na linha não diferem entre si (P>0,05) pelo teste de Scott & Knott (1974).

Para amostras sem nitrito, adicionadas de óleo essencial na concentração de 0,78%, não foram observadas reduções significativas ($P < 0,05$) nas populações ao final do primeiro dia. Já para concentração de 1,56% foi observada uma redução de 0,8 ciclos nas contagens; a maior redução (2,35 ciclos) ocorreu nas amostras de mortadela elaboradas com 3,125% de óleo essencial de segurelha. O efeito do óleo sobre o microrganismo alvo foi reduzido consideravelmente quando aplicado no modelo alimentar cárneo emulsionado.

A aplicação de óleos essenciais para o controle de patógenos e bactérias deterioradoras requer a avaliação da sua eficácia em produtos alimentícios ou em modelos que simulam de forma aproximada a composição dos alimentos. Geralmente a eficácia de alguns aditivos e agentes antimicrobianos naturais podem ser reduzidas por certos componentes de alimentos (Glass & Johnson, 2004).

Em geral, supõe-se que os elevados níveis de gordura e/ou proteínas dos alimentos possam proteger as bactérias da ação dos OE, de alguma forma. O óleo essencial, dissolvido na fase lipídica do alimento é, relativamente menos disponível, para a ação sobre bactérias presentes na fase aquosa (Mejlholm & Dalgaard, 2002). O elevado percentual de gordura de 9,95%, encontrado para as mortadelas fabricadas, pode resultar na redução do efeito inibitório do óleo essencial testado.

Outra sugestão é de que o menor teor de água dos alimentos, em comparação com os meios de laboratório, pode impedir o progresso de agentes antibacterianos para o local alvo na célula bacteriana (Smith-Palmer et al., 2001). O óleo essencial de menta, em produtos com altos teores de lipídeos como patês e saladas de ovas de peixe, exibiu um efeito antimicrobiano reduzido sobre *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*, quando comparados a alimentos como saladas de iogurte e pepino cuja atividade foi muito maior (Tassou et al., 1995). O teor de proteínas, também, tem sido apresentado como fator inibidor da ação

do óleo de cravo em *S. Enteritidis* em queijo de baixo teor de gordura (Smith-Palmer et al., 2001). Carboidratos dos alimentos não parecem proteger as bactérias da ação dos OES tanto quanto gordura e proteína o fazem. A alta atividade de água e/ou altos níveis de sal facilitam a ação do OE (Skandamis & Nychas, 2000).

O teor de proteínas, também, tem sido apresentado como fator inibidor da ação do óleo de cravo em *S. Enteritidis* em queijo de baixo teor de gordura (Smith-Palmer et al., 2001). Carboidratos dos alimentos não parecem proteger as bactérias da ação dos OES tanto quanto gordura e proteína o fazem. A alta atividade de água e/ou altos níveis de sal facilitam a ação do OE (Skandamis & Nychas, 2000).

A estrutura física do alimento pode limitar o efeito antimicrobiano do óleo essencial. Um estudo do desempenho do óleo de orégano sobre *S. Typhimurium* em meio líquido (caldo) e em gel de gelatina revelou que a matriz gélica reduziu, drasticamente, o efeito inibitório do óleo, provavelmente, em virtude da limitação da difusão pela estrutura da matriz gélica (Skandamis et al., 2000). A mortadela, após o processo de cozimento, apresenta estrutura física semissólida podendo interferir na difusão do óleo e prejudicar seu efeito antimicrobiano.

Geralmente a susceptibilidade da bactéria ao efeito antimicrobiano do óleo essencial aumenta com a queda de pH no alimento, menores temperaturas de estocagem e teor de oxigênio na embalagem. Em baixos valores de pH, a hidrofobicidade do óleo essencial aumenta tornando a dissolução dos lipídeos da membrana celular mais facilitada (Skandamis & Nychas, 2000; Tsigarida et al., 2000).

Gill et al. (2002) sugerem que a grande viabilidade de nutrientes em alimentos comparados aos meios utilizados em laboratório pode habilitar a bactéria a reparar danos nas células mais rapidamente. A este respeito não

somente as propriedades intrínsecas dos alimentos (gordura, proteína, teor de água, antioxidantes, conservantes, pH, sal e outros aditivos) são importantes, mas fatores extrínsecos são determinantes (temperatura, embalagem em atmosfera modificada e características do microrganismo) e podem afetar a sensibilidade bacteriana (Burt, 2004).

Gutierrez et al. (2008a) avaliaram a interferência de constituintes de alimentos (amido, extrato de carne, óleo de girassol) e pH na atividade do óleo essencial de orégano e tomilho sobre *Listeria monocytogenes*. Os autores reportaram que amido e óleo de girassol, nas concentrações de 5 e 10%, tiveram impacto negativo na eficácia da atividade dos óleos; por outro lado, os óleos foram mais efetivos em elevadas concentrações de proteínas e em pH 5, comparados com 6 ou 7

Conforme observado na Figura 32 mortadelas elaboradas com 100 mg.Kg⁻¹ de nitrito e sem adição do óleo essencial apresentaram um crescimento menor, ao final do primeiro dia de armazenamento, quando comparada ao tratamento controle, evidenciando a ação bacteriostática do nitrito sobre *C. perfringens*.

A respeito do efeito de inibição do nitrito sobre microrganismos vários mecanismos são relatados na literatura. Riha & Solberg (1975) propuseram que a inibição do nitrito sobre *C. perfringens* se dá na reação do nitrito e ácido nitroso com SH-constituintes de células bacterianas. A reação do ácido nitroso com tiols pode produzir nitrosotiols, os quais podem interferir na ação de enzimas como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

Foi demonstrado que em *Clostridium botulinum* o nitrito reage nas ligações ferro-enxofre de algumas proteínas, por exemplo, a ferredoxina, para formar complexos ferro-óxido nitrosos, inibindo o sistema fósforoclástico, o qual envolve a conversão do piruvato a acetil-fosfato, transferência de elétrons e síntese de ATP (Cammack et al., 1999). Estes mesmos autores reportaram ainda

o efeito do nitrito sobre o DNA e expressão genética além de danos a membrana e parede celular. O'Leary & Solberg (1976) relataram que células de *C. perfringens* inibidas por 14 mM de nitrito se apresentaram cinza escuras ou marrons, além de apresentar consistência alterada e se mostrar mais difíceis de dispersar em solução tampão. Os autores postularam que esta pigmentação esta associada com paredes celulares e membranas sugerindo que os danos a estas estruturas seriam os eventos primários na atividade do nitrito sobre este microrganismo.

Para mortadelas elaboradas com 100 mg.Kg⁻¹ de nitrito e 0,78% uma pequena redução foi observada; este fato poderia induzir um efeito combinado tornando possível a redução de nitrito de sódio quando em uso combinado com o óleo essencial.

As reduções nas contagens foram mais pronunciadas para tratamentos com 100 mg.Kg⁻¹ nas concentrações de óleo mais elevadas, com redução de 2,29 ciclos na concentração de 3,125% ao final do primeiro dia de estocagem das amostras.

Nas mortadelas elaboradas com 200 mg.Kg⁻¹ de nitrito foi observado um efeito mais pronunciado quando comparado aos tratamentos com 0 e 100 mg.Kg⁻¹ de nitrito, inclusive com pequena redução (P>0,05) de células viáveis nos tratamentos sem óleo essencial. A atividade sobre o microrganismo foi maior em concentrações de óleo mais elevadas.

Para a maioria dos tratamentos avaliados entre o primeiro e o décimo dia de estocagem houve um aumento no número de células viáveis de *C. perfringens*. Este fato pode ser explicado pela temperatura de estocagem (25°C) das mortadelas, favorável ao crescimento do microrganismo. Segundo Labbé (2000) *C. perfringens* é capaz de crescer em temperaturas entre 15 e 50° com um ótimo de 45°C. Uma possível alternativa seria o uso de tecnologias de “barreiras múltiplas” aliando além de nitrito e óleo essencial com efeitos antimicrobianos

comprovados, o uso de baixas temperaturas, garantido assim um produto seguro durante toda sua vida de prateleira. Mendonça (2004) e Alarcón (2007) avaliaram o efeito de óleos essenciais sobre *S. aureus* e *E. coli* em ricota estocada a 7°C e observaram uma redução nas contagens dos microrganismos após 24h de tratamento, sendo estas contagens mantidas até o final do período de estocagem (21 dias).

O gênero *Clostridium* possui habilidade de metabolizar uma ampla faixa de moléculas orgânicas incluindo açúcares e outros carboidratos; desde monossacarídeos até largos polímeros podem ser fermentados para obtenção de compostos de carbono e energia. Em comum com outras fermentações, uma considerável quantidade de carbono do substrato é convertida a produtos finais de fermentação os quais são característicos do microrganismo. Polímeros como celulose, amido e pectina são importantes substratos para Clostrídios na natureza, os quais podem ser degradados por enzimas extracelulares e complexos enzimáticos, resultando em compostos de baixo peso molecular passíveis de assimilação pela célula (Mitchell, 2001). Com relação à deterioração de alimentos os clostrídios podem ser classificados em proteolíticos (putrefativos) capazes de decompor proteínas peptídeos e aminoácidos, produzindo compostos sulfurosos com odor pútrido; e um segundo grupo, do qual faz parte *Clostridium perfringens*, ditos sacarolíticos (não-proteolíticos) com fermentação de carboidratos característica e produção de ácidos butíricos e acético, além de dióxido de carbono e hidrogênio. O crescimento é caracterizado por odor butírico e produção de gás (Scott et al., 2001).

A acentuada queda no número de células viáveis ao final do período de armazenamento pode ser relacionada com a queda de pH no produto; a mortadela apresenta em sua constituição quantidade considerável de carboidrato fermentável (fécula), a qual deu origem a ácidos orgânicos responsáveis pela brusca queda de pH. Como foi relatado anteriormente o microrganismo

apresenta pH ótimo de crescimento de 7,2 com mínimo entre 5,5 e 5,8. Em adição, a redução no número de células viáveis pode ser estimulada pelo crescimento de bactérias ácido-láticas naturalmente presentes na carne, as quais possuem habilidade de crescer em pHs de até 3,8. As bactérias ácido-láticas (*Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*) são capazes de produzir vários fatores antimicrobianos como bacteriocinas (nisina) e ácidos orgânicos como o ácido lático; os ácidos orgânicos interferem na força próton motiva e nos mecanismos de transporte ativo da membrana citoplasmática bacteriana (Forsythe, 2002).

Em virtude da elevada concentração celular inoculada o produto se apresentou completamente deteriorado com odor desagradável característico, alteração de consistência “amolecida” e aspecto “estufado”, característico do crescimento do microrganismo estudado.

As contagens de esporos de *C. perfringens* durante o período de estocagem são apresentadas na Tabela 15. De maneira geral pode-se observar um maior número de esporos ao final do período de estocagem para todos os tratamentos avaliados. De acordo com Mitchell (2001) a esporulação é iniciada em resposta a escassez de nutrientes; outros fatores que podem alterar a esporulação são pH, oxigênio e temperatura. Em geral a esporulação é favorecida por condições que resultem em redução da taxa de crescimento.

Com o desenvolvimento do microrganismo do produto as condições podem ter se tornadas desfavoráveis para o crescimento e favoráveis para o início processo de esporulação.

TABELA 15 Contagens de esporos de *Clostridium perfringens* tipo A ATCC 3624 em mortadelas elaboradas com diferentes níveis de nitrito e concentrações de óleo essencial durante estocagem por 30 dias a 25°C

Nitrito (ppm)	Tempo (dias)	Óleo essencial			
		0%	0,78%	1,56%	3,125%
0	1	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
	10	2,3x10 ²	<3,0	<3,0	<3,0
	20	3,1x10 ²	3,0x10 ¹	1,33x10 ²	3,3x10 ²
	30	2,4x10 ⁴	2,4x10 ⁴	7,8x10 ³	2,4x10 ³
100	1	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
	10	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
	20	4,3x10 ²	1,8x10 ²	2,1x10 ²	3,6x10 ¹
	30	7,8x10 ³	6,7x10 ³	2,4x10 ³	2,4x10 ³
200	1	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
	10	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
	20	3,3x10 ²	2,3x10 ²	1,85x10 ²	3,3x10 ²
	30	4,6x10 ³	2,4x10 ³	2,4x10 ³	7,8x10 ³

*Valores médios NMP/g de esporos

5 CONCLUSÕES

- O óleo essencial de Segurelha (*Satureja montana* L.) apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *Clostridium perfringens* Tipo A ATCC3624 inoculado em mortadela em concentrações superiores a 1,56%.
- A utilização do óleo essencial em concentrações elevadas pode promover alterações sensoriais indesejáveis, fato observado nas análises de cor objetiva, por meio da alteração da coloração característica do produto;
- A atividade antioxidante do óleo essencial em mortadelas também foi comprovada;
- Os resultados obtidos sugerem uma possível utilização do óleo essencial combinado com doses minimizadas de nitrito, uma vez que foram retardadas reações oxidativas e reduzidas contagens de *C. perfringens* nas amostras de mortadela.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils componets by gás chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. 4. ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.

AHN, J.; GRUN, I. U.; FERNANDO, L. N. Antioxidant properties of natural plant extracts containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 4, p. 1364-1369, May 2002.

ALARCÓN, M. M. V. **Efeito inibitório de óleos essenciais no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em queijo ricota**. 2007. 66 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ALIGIANNIS, A.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, Sept. 2001.

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

ARIDOGAN, B. C.; BAYDAR, H.; KAYA, S.; DEMIRCY, M.; OZBASAR, D.; MUMCU, E. Antimicrobial activity and chemical composition of some assential oils. **Archives Pharmacal Research**, Seoul, v. 25, n. 6, p. 860-864, Dec. 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17. ed. Gaithersburg, 2000. v. 1.

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

AZAZ, A. D.; MÜRKCÜOĞLU, M.; SATIL, F.; BASER, K. H. C.; TÜMEN, G. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of some *Satureja* essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 20, n. 6, p. 587-591, Nov./Dec. 2005.

BADI, H. N.; YAZDANI, D.; ALI, S. M.; NAZARI, F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products**, Boston, v. 19, n. 3, p. 231-236, May 2004.

BAHL, H.; DÜRRE, P. **Clostridia: biotechnology and medical applications**. Weinheim: Wiley-VHC, 2001. 287 p.

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

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória: EDUFES, 2008. 623 p.

BASSOLE, I. H. N.; OUATTARA, A. S.; NEBIE, R.; OUATTARA, C. A. T.; KABORE, Z. I.; TRAORE, S. A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**, New York, v. 62, n. 2, p. 209-212, Jan. 2003.

BAYDAR, H.; SAĞDIÇ, O.; GÜLCAN, O.; KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra*, and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 3, p. 169-172, Apr. 2004.

BEZBRADICA, D. I.; TOMOVIC, J. M.; VUKASINOVIC, M. S.; SILER-MARINKOVIC, S. Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Satureja montana* L. collected in Serbia and Montenegro. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 17, n. 4, p. 462-465, 2005.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago. 1999.

BOWLES, E. J. **The chemistry of aroma therapeutic oils**. 3. ed. Australia: Allen & Unwin, 2003. 257 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Mortadela. Brasília, 2000. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 5 abr. 2000. Seção I, p. 6-10.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Ofício Circular nº 15 /2009/GAB/DIPOA**, de 8 de maio de 2009. Uso de conservantes/aditivos em produtos cárneos: procedimentos de registro e fiscalização, 2009. Disponível em: <
http://www.uba.org.br/site3/arquivos/15/conservantes_e%20_aditivos_registro_fiscalizacao_brasil.pdf>. Acesso em: 12 out. 2009.

BREWER, M. S.; ZHU, L. G.; BIDNER, B.; MEISINGER, D. J.; MCKEITH, F. K. Measuring pork color: effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. **Meat Science**, Barking, v. 57, n. 2, p. 176-196, Feb. 2001.

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

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.

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 162-167, Mar. 2003.

BUSATTA, C.; VIDAL, R. S.; POPIOLSKI, A. S.; MOSSIA, A. J.; DARIVA, C.; RODRIGUES, M. R. A.; CORAZZA, F. C.; CORAZZA, M. L.; VLADIMIR, J.; OLIVEIRA, R. L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 1, p. 207-211, Feb. 2008.

CALLUCCI, L.; PINZONO, C.; ZANDOMENEGHI, M.; CAPOCCHI, A. Effects of gamma-irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 4, p. 927-934, Feb. 2003.

CAMMACK, R.; JOANNOU, C. L.; CUI, X. Y.; MARTINEZ, C. T.; MARAJ, S. R. B.; MARTIN, N. H. Review - nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1411, n. 2/3, p. 475-488, May 1999.

CANILLAC, N.; MOUREY, A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 3, p. 261-268, June 2001.

CARDOSO, M. G.; CASTRO, D. P.; AGUIAR, P. M.; SILVA, V. S.; SALGADO, A. P. S.; MUNIZ, F. R.; GAVILANES, M. N.; PINTOS, J. E. B. P. **Plantas aromáticas e condimentares**. Lavras: Ed. UFLA, 2005. 83 p.

CARDOSO, M. G.; GAVILANES, M. L.; MARQUES, M. C. S.; SHAN, A. Y. K. V.; SANTOS, B. R.; OLIVEIRA, A. C. B. de; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, A. P. S. **Óleos essenciais**. Lavras: Ed. UFLA, 2000. 42 p.

CAREAGA, M.; FERNANDEZ, E.; DORANTES, L.; MOTA, L.; JARAMILLO, M. E.; HERNANDEZ-SANCHEZ, Z. H. Antibacterial activity of Capsicum extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beefmeat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 3, p. 331-335, June 2003.

CARMAN, R. J.; SAYEEDB, S.; LIB, J.; GENHEIMERA, C. W.; HILTONSMITHA, M. F.; WILKINSA, T. D.; BRUCE, A. *Clostridium perfringens* toxin genotypes in the feces of healthy North Americans. **Anaerobe**, Blacksburg, v. 14, n. 2, p. 102-108, Apr. 2008.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, June 2002.

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

CASSENS, R. G. Residual nitrite in cured meat. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n. 2, p. 53-55, Feb. 1997.

CASTRO, D. P.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; SANTOS, N. M.; BALIZA, D. P. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 27-32, jun. 2006.

ÁVAR, S.; MAKSIMOVIĆ, M.; ŠOLIC, M. E.; MUJKIĆ, A. J.; BEŠTA, R. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two Satureja essential oils. **Food Chemistry**, Chicago, v. 111, n. 3, p. 648-653, Dec. 2008.

ĆETKOVIĆ, G. S.; MANDIĆ, A. I.; ČANADANOVIĆ-BRUNET, J. M.; DJILAS, S. M.; TUMBAS, V. T. HPLC screening of phenolic compounds in winter savory (*Satureja montana* L.) extracts. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v. 30, n. 2, p. 293-306, Jan. 2007.

CHOI, J. M.; RYU, H. J.; CHUNG, J. H.; PARK, J. C.; HWANG, J. K.; SHIN, D. B. Antioxidant property of genistein: inhibitory effect on HOCl induced protein degradation, DNA cleavage, and cell death. **Food Science and Biotechnology**, [S.l.], v. 14, n. 3, p. 399-404, 2005.

CIANI, M.; MENGHINI, L.; MARIANI, F.; PAGIOTTI, R.; MENGHINI, A.; FATICHENTI, F. Antimicrobial properties of essential oil of *Satureja montana* L. on pathogenic and spoilage yeast. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 22, n. 12, p. 1007-1010, June 2000.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; BRUYNE, T. de; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 79, n. 2, p. 213-220, Feb. 2002.

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Decision 1999/217/EC as regards the register of flavouring substances used in or on foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v. 42, p. 1-7, July 1999. Disponível em: <http://members.wto.org/crnattachments/2008/sps/EEC/08_4080_00_e.pdf>. Acesso em: 20 out. 2009.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, T. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 170-175, Jan. 2000.

CRESSY, H. K.; JERRETT, A. R.; OSBORNE, C. M.; BREMER, P. J. A novel method for the reduction of numbers of *Listeria monocytogenes* by freezing in combination with an essential oil in bacteriological medium. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 3, p. 390-395, Mar. 2003.

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

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

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

DEANS, S. G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 165-180, 1987.

DELAQUIS, P. J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74, n. 1/2, p. 101-109, Mar. 2002.

DESCALZO, A.M.; SANCHO, A.M. A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. **Meat Science**, Barking, v. 79, n. 3, p. 423-436, July 2008.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 703-714, Dec. 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. Ottawa: J. Wiley, 2002. 507 p.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. New York: J. Wiley, 2009. 546 p.

DICKENS, J. A.; BERRANG, M. E.; COX, N. A. Efficacy of an herbal extract on the microbiological quality of broiler carcasses during a simulated chill. **Poultry Science**, Chicago, v. 79, n. 8, p. 1200-1203, Aug. 2000.

DONALDSON, J. R.; WARNER, S. L.; CATES, R. G.; YOUNG, D. G. Assessment of antimicrobial activity of fourteen essential oils when using dilution and diffusion methods. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 43, n. 8, p. 687-69, 2005.

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

DORMAN, H. J. D.; PELTOKETO, A.; HILTUNEN, R.; TIKKANEN, M. J. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, London, v. 83, n. 2, p. 255-262, Nov. 2003.

DUTRA, M. P. **Qualidade de mortadelas elaboradas com diferentes níveis de nitrito e submetidas a diferentes doses de irradiação**. 2009. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DZIEZAK, J. D. Spices. **Food Technology**, Chicago, v. 43, n. 1, p. 102-116, Jan. 1989.

EL-GAZZAR, A.; WATSON, I. A taxonomic study of Labiatae and related genera. **New Phytologist**, Cambridge, v. 69, n. 2, p. 451-486, Apr. 1970.

ESTÉVEZ, M.; CAVAS, R. Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: contradictory effects in different types of frankfurters. **Meat Science**, Barking, v. 72, n. 2, p. 348-355, Feb. 2006.

FARAG, R. S.; DAW, Z. Y.; HEWED, F. M.; EL-BAROTY, G. S. A. Antimicrobial activity of some Egyptian spice oils. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 52, n. 9, p. 665-667, Sept. 1989.

FARMER, E. H.; BLOOMFIELD, G. F.; SUNDRALINGAM, A.; SUTTON, D. A. The course and mechanism of autoxidation reactions in olefinic and polyolefinic substances, including rubber. **Transactions of the Faraday Society**, London, v. 38, p. 348-356, Apr. 1942.

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Cooling Food Code Department of Health and Human Services Public Health Service College Park, MD**. Springfield, 2005. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/FoodCode/FoodCode2005/default.htm>>. Acesso em: 20 out. 2009.

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

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

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

GALINDO-CUSPINERA, V.; WESTHOFF, D. C.; RANKIN, S. A. Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage organisms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 6, p. 1074-1078, June 2003.

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

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

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Nature of *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* inhibition by eugenol, cinnamaldehyde and sodium lactate. **Annual Meeting of the International Association for Food Protection**, New Orleans, p. 113, 2003. Abstract.

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

GORDON, M. H. The development of oxidative rancidity in foods. In: POKORNY, J.; YANISLIEVA, N.; GORDON, M. (Ed.). **Antioxidants in food: practical applications**. Boca Raton: CRC, 2001. p. 7-21.

GRANUM, P. E. *Clostridium perfringens* toxins involved in food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 10, p. 101-112, 1990.

GRIFFIN, S. G.; WYLLIE, S. G.; MARKHAM, J. L.; LEACH, D. N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 14, n. 5, p. 322-332, Sept./Oct. 1999.

GUENTHER, E. **The essential oils**. New York: D. Van Nostrand, 1948.

GUIMARÃES, L. G. de L.; CARDOSO, M. das G.; ZACARONI, L. M.; LIMA, R. K. de; PIMENTEL, F. A.; MORAIS, A. R. Influence of light and temperature on the oxidation of the essential oil of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, set. 2008.

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

GUTIERREZ, J.; RODRIGUEZ, G.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Efficacy of plant essential oils against food-borne pathogens and spoilage bacteria associated with ready to eat vegetables: antimicrobial and sensory screening. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, n. 9, p. 1846-1854, Sept. 2008b.

HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 89, n. 1, p. 67-71, Nov. 2003.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 6, p. 985-990, June 1999.

HARPAZ, S.; GLATMAN, L.; DRABKIN, V.; GELMAN, A. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 3, p. 410-417, Mar. 2003.

HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 80, n. 1, p. 177-188, July 1996.

HARTMANS, K. J.; DIEPENHORST, P.; BAKKER, W.; GORRIS, L. G. M. The use of carvone in agriculture: sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plant diseases. **Industrial Crops and Products**, Porto, v. 4, n. 1, p. 3-13, June 1995.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H.-L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; WRIGHT, A. von. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, Sept. 1998.

HEWITT, J.; MORRIS, J. G. Superoxide dismutase in some obligately anaerobic bacteria. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 50, n. 3, p. 315-318, Feb. 1975.

HOLLEY, R. A.; PATEL, A. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials- review. **Food Microbiology**, London, v. 22, n. 4, p. 273-292, Aug. 2003.

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

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

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

JO, C.; AHN, H. J.; SON, J. W.; LEE, J. W.; BYUN, M. W. Packaging and irradiation effect on lipid oxidation, color, residual nitrite content, and nitrosamine formation in cooked pork sausage. **Food Control**, Guildford, v. 14, n. 1, p. 7-12, Jan. 2003.

JOHNSON, S.; GERDING, D. Enterotoxemic infections. In: ROOD, J.; MCCLANE, B. A.; SONGER, J. G.; TITBALL, R. W. (Ed.). **The Clostridia: molecular biology and pathogenesis**. London: Academic, 1997. p. 117-140.

JUN, W. J.; HAN, B. K.; YU, K. W.; KIM, W. S.; CHANG, I. S.; KIM, H. Y.; CHO, H. Y. Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals. **Food Chemistry**, London, v. 75, n. 4, p. 439-444, Dec. 2001.

JUNCHER D., RØNN, B., HANSEN, T.B., HENCKEL, P., KARLSSON, A., SKIBSTED, L.H., BERTELSEN, G. Effect of pre-slaughter physiological conditions on the oxidative stability of colour and lipid during chill storage of sliced, retail packed roast ham. **Meat Science**, v.63, n.2, p.151-159, Feb. 2003.

JUNEJA, V. K.; MARKS, H.; THIPPAREDDI, H. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked ground chicken. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Berlin, v. 10, n. 2, p. 260-266, Apr. 2009.

JUNEJA, V. K.; NOVAK, J. S.; HUANG, L.; EBLEN, B. S. Increased thermotolerance of *Clostridium perfringens* spores following sublethal heat shock. **Food Control**, Guildford, v. 14, n. 3, p. 163-168, Apr. 2003.

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

KARAPINAR, M.; AKTUG, S. E. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 161-166, Mar. 1987.

KARATZAS, A. K.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J.; BENNIK, M. H. J. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 3, p. 463-469, Mar. 2001.

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

KITAJIMA, E. W. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de transmissão**, Piracicaba: ESALQ, 1998. 43p.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULAMATSIS, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 41, n. 1, p. 119-127, Jan. 2008.

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. the paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 125, n. 1, p. 58-60, Jan. 2001.

LABBÉ, R. G. *Clostridium perfringens*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health, 2001. chap. 34, p. 325-330.

LABBÉ, R. G. *Clostridium perfringens*. In: LUND, B.; BAIRD- PARKER, T.; GOULD, G. (Ed.). **The microbiological safety and quality of food**. Gaithersburg: Aspen, 2000. p. 1110-1135.

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

LAMPRONTI, I.; SAAB, A. M.; GAMBARI, R. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the *Magnoliophyta* division. **International Journal of Oncology**, New York, v. 29, n. 4, p. 989-995, Oct. 2006.

LEE, K. G.; SHIBAMATO, T. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds. **Food Chemistry**, London, v. 74, n. 4, p. 443-448, Sept. 2001.

LEE, M. A.; CHOI, J. H.; CHOI, Y. S.; HAN, D. J.; KIM, H. K.; SHIM, S. Y.; CHUNG, H. K.; KIM, C. J. The antioxidative properties of mustard leaf (*Brassica juncea*) kimchi extracts on refrigerated raw ground pork meat against lipid oxidation. **Meat Science**, Barking, v. 84, n. 3, p. 498-504, Mar. 2010.

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

LEMAY, M.-J.; CHOQUETTE, J.; DELAQUIS, P. J.; GARIEPY, C.; RODRIGUE, N.; SAUCIER, L. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 3, p. 217-226, Oct. 2002.

LI, J.; MCCLANE, B. A. Comparative effects of osmotic, sodium nitrite-induced, and pH-induced stress on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 12, p. 7620-7625, Dec. 2006.

LIMA, R. K. Óleos essenciais de *Myristica fragans* Houtt. e de *Salvia microphylla* H.B.K.: Caracterização química, atividade biológica e antioxidante. 2008. 162 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LIN, Y. T.; LABBE, R. G.; SHETTY, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5672–5678, Sept. 2004.

LINDROTH, R. L.; HSIA, M. T. S.; SCRIBER, J. M. Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 681-686, Nov. 1987.

LIOLIOS, C. C.; GORTZI, O.; LALAS, S.; TSAKNIS, J.; CHINO, I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. **Food Chemistry**, London, v. 112, n. 1, p. 77-83, Jan. 2009.

LÜCKE, F. K. Use of nitrite and nitrate in the manufacture of meat products. **Fleischwirtschaft International**, Frankfurt, v. 4, p. 38-41, 2000.

MARIN-INIESTA, F. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 17, n. 1, p. 47-55, June 1997.

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

MASTELIĆ, J.; JERKOVIĆ, I. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L. **Food Chemistry**, London, v. 80, n. 1, p. 135-140, Jan. 2003.

MCCLANE, B. A. *Clostridium perfringens*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, 1997. p. 305-326.

MCCLANE, B. A. *Clostridium perfringens*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 2. ed. Washington: ASM, 2001. p. 351-372.

MCCLANE, B. A. *Clostridium perfringens* enterotoxin and intestinal tight junctions. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 8, n. 4, p. 145-146, Apr. 2000.

MCCLANE, B. A.; ROOD, J. I. Clostridial toxins involved in human enteric and histotoxic infection. In: BAHL, H.; DÜRRE, P. (Ed.). **Clostridia: biotechnology and medical applications**. Weinheim: Wiley-VHC, 2001. p. 169-220.

MCKEAN-COWDIN, R.; POGODA, J. M.; LIJINSKY, W.; HOLLY, E. A.; MUELLER, B. A.; PERSTON-MARTIN, S. Maternal prenatal exposure to nitrosatable drugs and childhood brain tumors. **International Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 211-217, Apr. 2003.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 5, p. 607-625, Sept. 1999.

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

MELTON, S. L. Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. **Food Technology**, Chicago, v. 38, n. 7, p. 105-111, July 1983.

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 70 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

MIRJANA, S.; NADA, B. Chemical composition and antimicrobial variability of *Satureja montana* L. essential oils produced during ontogenesis. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 16, n. 4, p. 387-391, 2004.

MITCHELL, W. J. General biology and physiology. In: BAHL, H.; DÜRRE, P. (Ed.). **Clostridia: biotechnology and medical applications**. Weinheim: Wiley-VHC, 2001. p. 49-104.

MOLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Nitric oxide and myoglobins. **Chemical Reviews**, Washington, v. 102, n. 4, p. 1167-1178, Aug. 2002.

MOLLER, J.K.S.; JAKOBSEN, M.; WEBER, C.J.; MARTINUSSEN, T.; SKIBSTED, L.H.; BERTELSEN, G. Optimization of colour stability of cured ham during packaging and retail display by a multifactorial design. **Meat Science**, v.63, n.2, p.169-175, Feb. 2003.

MOUREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, Guildford, v. 13, n. 4/5, p. 289-292, June/July 2002.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, Â. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 108-113, jan./mar. 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard M7-A6. Wayne, 2003.

NAZER, A. I.; KOBILINSKY, A.; THOLOZANA, J.-L.; DUBOIS-BRISSONNETA, F. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? **Food Microbiology**, London, v. 22, n. 5, p. 391-398, Oct. 2005.

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

NOVAK, J. S.; JUNEJA, V. K.; MCCLANE, B. A. An ultrastructural comparison of spores from various strains of *Clostridium perfringens* and correlations with heat resistance parameters. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 3, p. 239-247, Sept. 2003.

O'LEARY, V.; SOLBERG, M. Effect of sodium nitrite inhibition on intracellular thiol groups and on activity of certain glycolytic enzymes in *Clostridium perfringens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 31, n. 2, p. 208-212, Feb. 1976.

OLSEN, S. J.; MACKINNON, L. C.; GOULDING, J. S.; BEAN, N. H.; SLUTSKER, L. Surveillance of foodborne disease outbreaks - United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. CDC Surveillance Summaries, Atlanta, v. 49, p. 1-62, Mar. 2000.

ONAWUNMI, G. O. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 105-108, Sept. 1989.

OUATTARA, B.; SABATO, S. F.; LACROIX, M. Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre cooked shrimp (*Penaeus* spp.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 68, n. 1/2, p. 1-9, Aug. 2001.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

PALHARES, P. C.; RAMOS, A. L. S. Caracterização de presuntos e apresuntados comerciais: avaliação sensorial e instrumental da cor. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 8., 2009, São Paulo. **Anais...** São Paulo: UNICAMP, 2009. CD-ROM.

PANDIT, V. A.; SHELEF, L. A. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Food Microbiology**, London, v. 11, n. 1, p. 57-63, Feb. 1994.

PAREDES-SABJA, D.; GONZALEZ, M.; SARKER, M. R.; TORRES, J. A. Combined effects of hydrostatic pressure, temperature and pH on the inactivation of spores of *Clostridium perfringens* type A and *Clostridium sporogenes* in buffer solutions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 6, p. 202-206, Aug. 2007.

PAREDES-SABJA, D.; RAJU, D.; TORRES, J. A.; SARKER, M. R. Role of small, acidsoluble spore proteins in the resistance of *Clostridium perfringens* spores to chemicals. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 3, p. 333-335, Mar. 2008a.

PAREDES-SABJA, D.; TORRES, J. A.; SETLOW, P.; SARKER, M. R. *Clostridium perfringens* spore germination: characterization of germinants and their receptors. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 4, p. 1190-1201, Feb. 2008b.

PARRY, J. W. **Spices**: morfology, histology, chemitry. New York: Chemical, 1962. v. 2, 183 p.

PASTER, N.; JUVEN, B. J.; SHAYYA, E.; MENASHEROV, M.; NITZAN, R.; WEISSLOWICZ, H.; RAVID, U. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 33-37, July 1990.

PAYNE, G.; BRINGI, V.; PRINCE, C.; SHULLER, M. The quest for commercial production of chemicals from plant cell culture. In: _____. **Plant cell and tissue culture in liquid systems**. Oxford: Oxford University, 1991. p. 1-10.

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

PEREIRA, A. A. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos**. 2006. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

PERRY, N. S.; BOLLEN, C.; PERRY, E. K.; BALLARD, C. Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Fayetteville, v. 75, n. 3, p. 651-659, July 2003.

PETER, K. V. **Handbook of herbs and spices**. Cambridge: CRC, 2000. 319 p.

PHUTHI, J. S. **Spices and condiments: chemistry, microbiology, technology**. New York: Academic, 1980. 449 p.

PIERSON, M. D.; SMOOT, L. A. Nitrite, nitrite alternatives, and the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 17, n. 2, p. 141-187, 1982.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; AGUIAR, P. M.; SILVA, V. F.; MORAIS, A. R.; NELSON, D. L. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, maio/abr. 2006.

PIZZALE, L.; BORTOLOMEAZZI, R.; VICHI, S.; CONTE, L. S. Antioxidant activity of sage and oregano extracts related to their phenolic compound content. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 82, n. 14, p. 1645-1651, Nov. 2002.

POKORNY, J.; YANISLIEVA, N.; GORDOM, M. **Antioxidants in food: practical applications**. Boca Raton: CRC, 2001. 380 p.

POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2007. p. 75-91.

POURAZRANG, H.; MOAZZAMI, A.; FAZLY BAZZAZ, B. S. Inhibition of mutagenic N-nitroso compound formation in sausage samples by using l-ascorbic acid and α -tocopherol. **Meat Science**, Barking, v. 62, n. 4, p. 479-483, Dec. 2002.

PRIETO, J. M.; IACOPINI, P.; CIONI, P.; CHERICONI, S. In vitro activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. **Food Chemistry**, London, v. 104, n. 3, p. 889-895, 2007.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2004. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

RADONIC, A.; MILOS, M. Chemical composition and *in vitro* evaluation of antioxidant effect of free volatile compounds from *Satureja montana* L. **Free Radical Research**, London, v. 37 n. 6, p. 673-679, June 2003.

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

RAJU, D.; SETLOW, P.; SARKER, M. R. Antisense-RNA-mediated decreased synthesis of small, acid-soluble spore proteins leads to decreased resistance of *Clostridium perfringens* spores to moist heat and UV radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 7, p. 2048-2053, Apr. 2007.

RAJU, D.; WATERS, M.; SETLOW, P.; SARKER, M. R. Investigating the role of small, acid-soluble spore proteins (SASPs) in the resistance of *Clostridium perfringens* spores to heat. **BMC Microbiology**, [S.l.], v. 6, p. 50, 2006.

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

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

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs: review. **Toxicon**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 603-613, May 2001.

RHODEHAMEL, E. J.; HARMON, S. M. *Clostridium perfringens*. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual (BAM)**. Gaithersburg: AOAC International, 1998. Disponível em: <<http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

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

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 23, n. 2/3, p. 127-149, July/Aug. 1988.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, Los Angeles, v. 12, n. 5, p. 1-22, Jan. 2005.

ROLLER, S.; SEEDHAR, P. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4°C and 8 °C. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 390-394, Nov. 2002.

RUBERTO, G.; BARATTA, T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, London, v. 69, n. 2, p. 167-174, May 2000.

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, Apr. 2002.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 48 p. (Documentos, 20).

SALGADO, A. P. S. **Efeito da luz na planta e no óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)**. 2005. 49 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2007. p. 323-354.

SARKER, M. R.; SHIVERS, R. P.; SPARKS, S.; JUNEJA, V. K.; MCCLANE, B. A. Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid versus chromosomal enterotoxin genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3234-3240, Aug. 2000.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SCOTT, V. N.; ANDERSON, J. E.; WANG, G. Mesophilic anaerobic sporeformers. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. chap. 34, p. 325-330.

SEBRANEK, J. G.; SEWALT, V. J. H.; ROBBINS, K. L.; HOUSER, T. A. Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. **Meat Science**, Barking, v. 69, n. 2, p. 289-296, Feb. 2005.

SEVARDA, L. A.; KUZNJECOVA, A. G.; PAVLOVIC, S.; ZIVANOVIC, P.; JANCIC, R. Quantity and composition of essential oil and anatomic structure *Satureja montana* L. (Lamiaceae). **Pharmacy**, Hertfordshire, v. 36, n. 4, p. 167-175, 1986.

SHAFI, P. M.; ROSAMMA, M. K.; JAMIL, K.; REDDY, P. S. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oil. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, n. 5, p. 414-416, Aug. 2002.

SHARIF ALI, S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, S.; SAHU, A.; BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants-review. **Food Research International**, Barking, v. 41, n. 1, p. 1-15, 2008.

SHELEF, L. A. Antimicrobial affects of spices. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 6, n. 1, p. 29-44, Mar. 1984.

SI, W.; NI, X.; GONG, J.; YU, H.; TSAO, R.; HAN, Y.; CHAMBERS, J. R. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards *Clostridium perfringens*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 106, n. 1, p. 213-220, Jan. 2009.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, Apr. 1994.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 2, p. 201-222, June 1995.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, jan. 1999.

SILVA, F. V. M.; MARTINS, A.; SALTA, J.; NENG, N. R.; NOGUEIRA, J. M. F.; MIRA, D.; GASPAR, N.; JUSTINO, J.; GROSSO, C.; URIETA, J. S.; PALAVRA, A. M. S.; RAUTER, A. P. Phytochemical profile and Anticholinesterase and antimicrobial activities of supercritical versus conventional extracts of *Satureja montana*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 24, p. 11557-11563, Dec. 2009.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 89, n. 2/3, p. 277-283, Dec. 2003.

SILVA, L. J. **Laercio**: duncan test, tukey test and scott-knott test: R package version 1.0-0. [S.l.: s.n.], 2008. 5 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. S.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 552 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2007. 1102 p.

SINGH, A.; SINGH, R. K.; BHUNIA, A. K.; SINGH, N. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, v. 36, n. 8, p. 787-794, Dec. 2003.

SINGH, N.; SINGH, R. K.; BHUNIA, A. K.; STROSHINE, L. R. L. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, v. 35, n. 8, p. 720-729, Dec. 2002.

SKANDAMIS, P.; TSIGARIDA, E.; NYCHAS, G.-J. E. Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within a gelatin gel with or without the addition of oregano essential oil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 31-35, Feb. 2000.

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

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G.-J. E. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 6, p. 1011-1022, Dec. 2001.

SKOČIBUŠIĆ, M.; BEZIĆ, N. Chemical composition and antidiarrhoeal activities of winter savory (*Satureja montana* L.) essential oil. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 41, n. 8, p. 622-626, Dec. 2003.

SCOTT, A. J. & KNOTT, M. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v.30, p.507-512, 1974.

SLAVKOVSKA, V.; JANCIC, R.; BOJOVIC, S.; MILOSAVLJEVIC, S.; DJOKOVIC, D. Variability of essential oils of *Satureja Montana* L. and *Satureja Kitaibelli* Wier. ex Heuff from the central part of the Balkan Peninsula. **Phytochemistry: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology**, New York, v. 57, n. 1, p. 71-76, May 2001.

SMITH, G. C.; BELK, K. E.; SOFOS, J. N.; TATUM, J. D.; WILLIAMS, S. N. Economic implications of improved color stability in beef. In: DECKER, E. A.; FAUSTMAN, C.; LOPEZ-BOTE, C. J. (Ed.). **Antioxidants in muscle foods: nutritional strategies to improve quality**. New York: Wiley Interscience, 2000. p. 397-426.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 118-122, Feb. 1998.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 4, p. 463-470, Aug. 2001.

SOLOMAKOS, N.; GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; BOTSOGLOU, N. 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, n. 2, p. 159-166, Oct. 2008.

SUBURG, H.; PANTEN, J. **Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses**. 5. ed. Weinheim: WILEY-VCH, 2006.

TAKAISI-KIKUNI, N. B.; TSHILANDA, D.; BABADY, B. Antibacterial activity of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus*. **Fitoterapia**, Milano, v. 71, n. 1, p. 69-71, Feb. 2000.

TAORMINA, P. J.; BARTHOLOMEW, G. W.; DORSA, W. J. Incidence of *Clostridium perfringens* in commercially produced cured raw meat product mixtures and behavior in cooked products during chilling and refrigerated storage. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 1, p. 72-81, Jan. 2003.

TASSOU, C. C.; DROSINOS, E. H.; NYCHAS, G.-J. E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 °C and 10 °C. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 78, n. 6, p. 593-600, June 1995.

TASSOU, C. C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. **Food Research International**, Barking, v. 33, n. 3, p. 273-280, Apr. 2000.

TSIGARIDA, E.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G.-J. E. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 jC. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, n. 6, p. 901-909, Dec. 2000.

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**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, Apr. 2002.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F. A.; SMID, E. J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 174, n. 4, p. 233-238, Sept. 2000.

ULTEE, A.; SLUMP, R. A.; STEGING, G.; SMID, E. J. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 5, p. 620-624, May 2000.

ULTEE, A.; SMID, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 373-378, Mar. 2001.

UPNMOOR, I. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Guaíba: Agropecuária, 2003. 56 p.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **National Genetic Resources Program Phytochemical and Ethnobotanical Databases**. Beltsville: National Germplasm Resources Laboratory, 2003.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radical metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 160, n. 1, p. 1-40, Mar. 2006.

VÁLKOVÁ, V.; SALÁKOVÁ, A.; BUCHTOVÁ, H.; TREMLOVA, B. Chemical, instrumental and sensory characteristics of cooked pork ham. **Meat Science**, Barking, v. 77, n. 4, p. 608-615, Dec. 2007.

VARDAR-UNLU, G.; CANDAN, F.; SOKMEN, A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, M.; DONMEZ, E.; TEPE, B. Antimicrobial and antitoxic activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 1, p. 63-67, Jan. 2003.

VARNAN, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Bebidas: tecnología, química y microbiología**. Zaragoza: ACRIBIA, 1995. 487 p.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of mortadella, **Meat Science**, (2010), doi: 10.1016/j.meatsci.2010.03.007

VRINDA MENON, K.; GARG, S. R. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 6, p. 647-650, Dec. 2001.

WALSH, S. E.; MAILLARD, J.-Y.; RUSSELL, A. D.; CATRENICH, C. E.; CHARBONNEAU, D. L.; BARTOLO, R. G. Activity and mechanism of action of selective biocidal agents on Gram-positive and negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 2, p. 240-247, Aug. 2003.

WILLIAMS, L. R.; STOCKLEY, W. Essential oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 8, n. 4, p. 30-40, Oct./Dec. 1998.

WILSON, C. L.; DROBY, S. **Microbial food contamination**. Boca Raton: CRC, 2000.

WINTER, C. K.; DAVIS, S. F. Organic foods. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 9, p. 117-124, Dec. 2006.

YAMASAKI, K.; NAKANO, M.; KAWAHATA, T.; MORI, H.; OTAKE, T.; UEBA, N.; OISHI, I.; INAMI, R.; YAMANE, M.; NAKAMURA, M.; MURATA, H.; NAKANISHI, T. Anti-HIV-1 activity of herbs in *Labiatae*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 21, n. 8, p. 829-833, Aug. 1998.

YANISHLIEVA, N. V.; MARINOVA, E.; POKORNY, J. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 108, n. 9, p. 776-793, Sept. 2006.

YOUNES, J. F. F.; BORON, A. Mortadelas. In: OLIVO, R. **O mundo do frango**. São Paulo: Varela, 2006. cap. 33, p. 47-90.

ZANARDI, E.; DORIGONI, V.; BANDIANI, A.; CHIZZOLINI, R. Lipid and colour stability of Milano-type sausages: effect of packing conditions. **Meat Science**, Barking, v. 61, n. 1, p. 7-14, May 2002.