



BRUNA AZEVEDO BALDUINO

**USO DE EMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO
CONTROLE DE *Listeria monocytogenes* EM SALSICHA NÃO
CURADA**

**LAVRAS-MG
2021**

BRUNA AZEVEDO BALDUINO

**USO DE EMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Listeria*
monocytogenes EM SALSICHA NÃO CURADA**

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

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS-MG
2021**

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

Balduino, Bruna Azevedo.

Uso de emulsões de óleos essenciais no controle de *Listeria monocytogenes* em salsicha não curada / Bruna Azevedo Balduino.
- 2021.

79 p. : il.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

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

Bibliografia.

1. Conservantes naturais. 2. Patógenos alimentares. 3.
Microorganismos deterioradores. I. Piccoli, Roberta Hilsdorf. II.
Título.

BRUNA AZEVEDO BALDUINO

USO DE EMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Listeria monocytogenes* EM SALSICHA NÃO CURADA

USE OF ESSENTIAL OIL EMULSIONS IN THE CONTROL OF *Listeria monocytogenes* IN UNCURED SAUSAGE

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

APROVADA em 3 de agosto de 2021.

Dr. Eduardo Mendes Ramos

UFLA

Dr. Thales Leandro Coutinho de Oliveira

UNICAMP

Dra. Alcilene de Abreu Pereira

IFMG



Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS-MG
2021**

AGRADECIMENTOS

A Deus por me iluminar, guiar e abençoar ao longo dessa trajetória, me dando forças nos momentos difíceis.

Aos meus pais Maria Tereza Balduino e Flávio Lúcio Carlota, por todo amor, apoio, incentivo, por sempre acreditarem em mim e não medirem esforços para me ajudar.

À minha orientadora, professora Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli, pelos anos de orientação, amizade, compreensão, paciência, dedicação e ensinamentos, contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao professor Dr. Eduardo Mendes Ramos, pelo apoio, conhecimentos compartilhados e contribuição com o projeto.

Ao Dr. Thales por ter me ajudado na condução do experimento e por todo conhecimento compartilhado e contribuição com o projeto.

À professora Dra. Alcilene de Abreu Pereira por ter aceitado participar da banca de defesa, contribuindo para a melhoria do trabalho.

À minha família por ser minha base, por todo amor e carinho.

Aos meus amigos que me acompanharam durante toda a trajetória e estiveram comigo nos momentos bons e nos mais difíceis, fazendo com que tudo fosse mais leve.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos Anderson, Juliana, Michelle, Raquel, Sabrina, Danilo, Fernanda, Mônica e Jeimmy pela amizade, ajuda e conhecimentos compartilhados.

Ao Anderson, Francielly, Thales, Sabrina, Heloísa, Juliana, Michelle e Raquel, por todo apoio, conhecimento e ajuda. Vocês foram fundamentais para a realização desse trabalho!

A Eliane e Pâmela, técnicas do laboratório, por todo auxílio e conhecimentos transmitidos.

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

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos, à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio aos projetos de pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste projeto. Essa vitória também é de vocês!

Muito obrigada!

RESUMO

Listeria monocytogenes é uma bactéria causadora de infecções alimentares que vem ganhando destaque na indústria de produtos cárneos, devido a sua capacidade de se multiplicar em condições adversas como amplas faixas de pH e temperatura e altas concentrações de sal e se desenvolver em superfícies utilizadas no processamento de alimentos, podendo formar biofilmes. Devido a suas características fisiológicas, mesmo que se utilize das boas práticas de fabricação, a contaminação dos produtos por *L. monocytogenes* tem sido de difícil controle. Dessa forma, a utilização de conservantes naturais como os óleos essenciais podem oferecer uma alternativa para a disponibilidade de produtos seguros ao consumidor. Desse modo, o objetivo do trabalho foi a avaliação da atividade antimicrobiana de emulsão de óleos essenciais sobre *L. monocytogenes* inoculada em salsicha não curada e bactérias lácticas contaminantes, bem como o impacto dos óleos sobre as características físico-químicas do produto. Para tanto, foram determinadas as concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos óleos essenciais de orégano, tomilho, coentro, alho e cravo pelo método de microdiluição em caldo, sendo essas, respectivamente, 1,0; 1,0; 1,0 2,0 e 0,5% (v/v). Baseando-se nos valores da CMB e utilizando-se do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), foram gerados 27 ensaios com a mistura dos óleos de orégano, coentro, cravo e alho. Todas as misturas foram bactericidas, sendo o ensaio contendo 0,16% de orégano, 0,05% de coentro, 0,14% de alho e 0,03% de cravo selecionado para utilização como conservante. Foi elaborado um tratamento com salsichas sem adição de nitrito, adicionadas da combinação de óleos essenciais e um controle com salsichas adicionadas de 150 mg/kg de nitrito, que foram inoculadas por imersão em suspensão bacteriana de *L. monocytogenes* padronizada (10^6 UFC/mL), embaladas a vácuo e armazenadas a 10°C por 15 dias. Embora a combinação de óleos essenciais utilizada tenha se mostrado eficiente no controle de *L. monocytogenes in vitro*, seu efeito foi reduzido quando adicionada à formulação das salsichas. No entanto, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, mostrando que a emulsão de óleos essenciais utilizada teve uma ação antimicrobiana similar à do nitrito de sódio. A emulsão de óleos essenciais não alterou a atividade de água das salsichas, mas contribuiu para um aumento nos valores de pH quando comparado ao controle. O tratamento com nitrito foi mais efetivo no controle da oxidação lipídica, mantendo valores mais baixos de oxidação. Houve uma diferença significativa na cor das salsichas com óleos essenciais, que já era esperada, devido a não adição de nitrito de sódio, fazendo com que essas apresentassem uma coloração amarronzada. Portanto, embora a emulsão de óleos essenciais utilizada não tenha sido capaz de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* e bactérias lácticas em salsicha, ela apresentou uma ação similar à do nitrito com relação ao crescimento desses microrganismos, sendo uma possível alternativa para substituição desse conservante. No entanto, é necessária a realização de mais testes com as demais combinações de óleos essenciais que foram eficientes *in vitro* de forma a encontrar alguma que possa ser mais eficiente na redução dos microrganismos em produtos cárneos.

Palavras-chave: Conservantes naturais. Patógenos alimentares. Microrganismos deterioradores. Segurança de alimentos.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a bacterium that causes food infections that has been gaining highlight in the meat products industry, due to its ability to multiply in adverse conditions such as wide pH and temperature ranges and high salt concentrations and to develop on surfaces used in the processing foods and can form biofilms. Due to its physiological characteristics, even if it uses good manufacturing practices, the contamination of products by *L. monocytogenes* it has been difficult to control. Thus, the use of natural preservatives such as essential oils can offer an alternative for the availability of safe products for the consumer. Thus, the objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of an essential oil emulsion on *L. monocytogenes* inoculated in uncured sausage and contaminating lactic bacteria, as well as the impact of the oils on the physicochemical characteristics of the product. Therefore, the minimum bactericidal concentrations (MBC) of essential oils of oregano, thyme, coriander, garlic and clove were determined by the broth microdilution method, these being, respectively, 1,0; 1,0; 1,0; 2,0 and 0,5% (v/v). Based on the MBC values and using the Rotational Central Composite Design (RCCD), 27 trials were generated with the mixture of oregano, coriander, clove and garlic oils. All mixtures were bactericidal, being the assay containing 0,16% oregano, 0,05% coriander, 0,14% garlic and 0,03% clove selected for use as a preservative. A treatment with sausages without the addition of nitrite, added with the combination of essential oils and a control with sausages with added 150 mg/kg of nitrite, which were inoculated by immersion in a standardized bacterial suspension of *L. monocytogenes* (10^6 CFU/mL) was developed, vacuum-packed and stored at 10°C for 15 days. Although the combination of essential oils used has shown to be efficient in controlling *L. monocytogenes* in vitro, its effect was reduced when added to the sausage formulation. However, no significant difference was observed between the treatments, showing that the essential oil emulsion used had an antimicrobial action similar to that of the sodium nitrite. The emulsion of essential oil did not change the water activity of the sausages, but it contributed to an increase in pH values when compared to the control. The treatment with nitrite was more effective in controlling the lipid oxidation, maintaining lower oxidation values. There was a significant difference in the color of sausages with essential oils, which was expected, due to not adding sodium nitrite, causing them to have a brownish color. Therefore, although the essential oil emulsion used was not able to inhibit the growth of *L. monocytogenes* and lactic acid bacteria in sausage, it showed an action similar to that of nitrite concerning the growth of these microorganisms, being a possible alternative to replace this preservative. However, it is necessary to carry out more tests with the other combinations of essential oils that were efficient in vitro to find one that could be more efficient in reducing microorganisms in meat products.

Keywords: Natural preservatives. Foodborn pathogens. Spoilage microorganisms. Food safety.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eletromicrografias de transmissão dos estágios do ciclo de vida intracelular de <i>Listeria monocytogenes</i>	15
Figura 2 - Biossíntese de formação dos metabólitos secundários.	22
Figura 3 - Mecanismo de ação dos óleos essenciais em células bacterianas.....	24
Figura 4 - Estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	25
Figura 5 - Matéria-prima e carne mecanicamente separada de frango.....	38
Figura 6 - Salsichas elaboradas e fracionadas para análises microbiológicas e tecnológicas.	41
Figura 7 - Crescimento de células vegetativas de <i>L. monocytogenes</i> em meio Oxford.	42
Figura 8 - Crescimento de bactérias lácticas em meio MRS.....	43
Figura 9 - Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> inoculada em salsicha ao longo de 15 dias de armazenamento a 10°C.	49
Figura 10 - Crescimento de bactérias ácido lácticas (BAL) em salsicha ao longo de 15 dias de armazenamento a 10°C.	50
Figura 11 - Variação dos valores de pH das salsichas durante 15 dias de armazenamento a 10°C.	55
Figura 12 - Variação da concentração de malonaldeído para as amostras controle de salsicha durante 15 dias de armazenamento a 10°C.	56
Figura 13 - Variação da concentração de malonaldeído para as amostras de salsicha adicionadas de óleos essenciais emulsionados durante 15 dias de armazenamento a 10°C.	57
Figura 14 - Variação do índice tonalidade (h) das salsichas ao longo de 15 dias de armazenamento a 10°C.	60
Figura 15 - Diferença de cor observada entre as salsichas elaboradas com 150 mg/kg de nitrito e com emulsão de óleos essenciais.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de trabalhos desenvolvidos nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e de Tecnologia de Carnes e Derivados da UFLA, buscando estudar a utilização de óleos essenciais como conservantes naturais em produtos cárneos (Continua).....	28
Tabela 2 - Proporções em porcentagem utilizadas nos ensaios das combinações dos óleos essenciais de orégano, coentro, alho e cravo	37
Tabela 3 - Formulação utilizada para elaboração das salsichas.	39
Tabela 4 - Concentrações mínimas bactericidas (CMB) de diferentes óleos essenciais sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	46
Tabela 5 - Atividade antimicrobiana de diferentes combinações entre óleos essenciais sobre <i>L. monocytogenes</i>	48
Tabela 6 - Taxa de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> e bactérias lácticas em salsicha durante 15 dias de armazenamento.....	50
Tabela 7 - Porcentagem média e desvio padrão da composição centesimal da CMS de frango.....	52
Tabela 8 - Valores médios de atividade de água (A_w) do tratamento controle e com adição de misturas de óleos essenciais das salsichas, mantidas refrigeradas (10°C) por 15 dias.....	53
Tabela 9 - Valores médios de pH para as salsichas adicionadas de nitrito e das emulsões de óleos essenciais armazenadas por 15 dias a 10°C.....	54
Tabela 10 - Valores médios do índice TBARS (mg de malonaldeído/kg de produto) encontrados para os tratamentos avaliados durante 15 dias de armazenamento a 10°C.	56
Tabela 11 - Valores médios do índice de luminosidade (L^*), índice de tonalidade (h) e índice de saturação (C^*) do tratamento controle e com óleos essenciais das salsichas ao longo de 15 dias de armazenamento a 10°C.	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCAL TEÓRICO	13
2.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	13
2.1.1	Ciclo intracelular de <i>L. monocytogenes</i>	14
2.2	Deterioração de produtos cárneos.....	15
2.3	Bactérias Ácido Lático (BAL).....	16
2.4	Produtos cárneos emulsionados: salsichas	17
2.5	Nitrito e nitrato	19
2.6	Óleos essenciais	20
2.6.1	Atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais	23
2.6.2	Aplicação de óleos essenciais em matrizes alimentares.....	27
2.7	Plantas condimentares aromáticas.....	30
2.7.1	Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	30
2.7.2	Cravo (<i>Eugenia caryophyllus</i>).....	31
2.7.3	Alho (<i>Allium sativum</i>)	32
2.7.4	Coentro (<i>Coriandrum sativum</i>)	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Óleos essenciais	35
3.2	Microrganismo, padronização e obtenção do inóculo	35
3.3	Determinação da Concentração Mínima Bactericida	36
3.4	Combinações entre os óleos essenciais	36
3.5	Fabricação da salsicha.....	38
3.5.1	Obtenção da Carne Mecanicamente Separada (CMS)	38
3.5.2	Formulação e processo tecnológico	39
3.6	Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> e bactérias ácido lácticas	41
3.7	Análises tecnológicas	43
3.7.1	Composição centesimal da CMS	43
3.7.2	Atividade de água	43
3.7.3	Determinação do pH.....	44
3.7.4	Cor instrumental.....	44
3.7.5	Oxidação lipídica	44
3.8	Cálculo da velocidade de crescimento.....	45
3.9	Análises estatísticas.....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1	Concentração mínima bactericida (CMB) sobre <i>L. monocytogenes</i>	46
4.2	Ação bactericida das combinações de óleos essenciais	47
4.3	Atividade antimicrobiana da emulsão de óleos essenciais	49
4.4	Análises tecnológicas	52
4.4.1	Composição centesimal da CMS de frango	52
4.4.2	Atividade de água e pH	53
4.4.3	Oxidação lipídica	56

4.4.4	Análise de cor objetiva	58
5	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

Patógenos de origem alimentar estão relacionados a uma série de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), sendo um grande problema de saúde pública e uma grande preocupação para a indústria alimentícia, que deve garantir a inocuidade de seus produtos. A deterioração microbiológica dos alimentos também é um problema enfrentado pela indústria, pois leva à perda de qualidade dos produtos, além da redução de sua vida útil, podendo causar o desperdício.

A carne e os produtos cárneos, como a salsicha, possuem características intrínsecas como alta atividade de água, pH acima de 5,4 e alto teor de nutrientes que favorecem o crescimento microbiano e os tornam um meio ideal para o desenvolvimento de patógenos como *L. monocytogenes* e microrganismos deterioradores como as bactérias láticas.

Salsichas são consideradas produtos prontos para o consumo (ready to eat - RTE) que não necessitam de processos térmicos adicionais pré-consumo, potencializando o risco alimentar associado. Durante o processamento, após o processo térmico de cozimento, nas etapas de descasque, tingimento, fracionamento e embalagem devido ao contato superficial ou exposição ambiental pode ocorrer uma recontaminação dos produtos por patógenos e um aumento da carga de microrganismos deteriorantes, levando a uma redução da vida útil desses produtos.

Dentre os microrganismos patogênicos, a *Listeria monocytogenes* se destaca devido sua capacidade de se multiplicar em condições adversas como amplas faixas de pH e temperatura e altas concentrações de sal e sobreviver em ambientes diversos, podendo se desenvolver em superfícies utilizadas no processamento dos alimentos e formar biofilmes. Uma vez presente no alimento, essa bactéria pode ser ingerida e causar a listeriose, uma doença potencialmente letal que afeta principalmente grupos mais susceptíveis como grávidas, idosos, recém-nascidos e indivíduos imunocomprometidos.

As bactérias láticas se destacam entre os microrganismos responsáveis pela deterioração de carnes e produtos cárneos embalados a vácuo, já que são mais resistentes aos métodos de barreira utilizados para conservação. Condições como baixas temperaturas, redução do teor de O₂ e aumento da concentração de CO₂ favorecem seu crescimento. Uma vez presente nos alimentos, sua atividade metabólica leva à produção de compostos que podem causar alterações no aspecto, cor, sabor e odor dos produtos, deixando-os inadequados ao consumo.

Uma forma de controlar a deterioração dos produtos e garantir sua segurança microbiológica é pelo uso de conservantes. Atualmente, os conservantes sintéticos ainda são os

mais utilizados pela indústria. Entre esses conservantes, os sais de nitrito e nitrato são adicionados em produtos cárneos como antioxidantes, agentes de cura e, principalmente, com a função de evitar o crescimento de células vegetativas de *Clostridium botulinum* e a germinação de seus esporos que sobrevivem ao tratamento térmico. Também é relatado que o nitrito em combinação com outros sais e ácidos orgânicos presentes em formulações, possui ação antibacteriana contra outras bactérias patogênicas como *L. monocytogenes*. No entanto, sabe-se que o nitrito é convertido em N-nitrosaminas, que tem efeito cancerígeno ao ser humano, além de não apresentar efeito sobre o crescimento de bactérias lácticas, que conseguem se desenvolver em sua presença.

Portanto, devido a potencial toxicidade relacionada ao uso de conservantes sintéticos e a uma mudança nos hábitos alimentares dos consumidores que buscam, cada vez mais, por saudabilidade, tem-se aumentado a procura de conservantes alternativos naturais, dentre os quais destacam-se os óleos essenciais.

Os óleos essenciais são metabólitos secundários de plantas aromáticas e podem ser encontrados em suas diferentes partes como folhas, flores, raízes, caules, frutos, dentre outras. Eles possuem diversas aplicabilidades devido suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiparasitária, anticâncer e antiviral. Portanto, por serem reconhecidos como seguros GRAS (*Generally Recognized As Safe*) podem ser utilizados em alimentos e aplicados na indústria como conservantes naturais.

No entanto, para obter a mesma atividade antibacteriana dos óleos essenciais *in vitro* em alimentos são necessárias aplicações de concentrações mais elevadas desses óleos, o que pode gerar alterações sensoriais do produto. Desse modo, a utilização de combinações entre óleos essenciais é uma alternativa para tentar reduzir as concentrações de cada óleo utilizado, sem que se perca sua ação antimicrobiana.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de emulsões de óleos essenciais sobre a bactéria *L. monocytogenes* inoculada em salsicha não curada e sobre bactérias lácticas contaminantes, bem como o impacto dos óleos sobre as características físico-químicas do produto.

2 REFERENCAL TEÓRICO

2.1 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* é composto por 17 espécies, sendo 9 espécies de *Listeria* recentemente descritas desde 2009. Dentre elas, um grupo de 6 espécies, composto por *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi*, compartilham características fenotípicas comuns, como capacidade de sobreviver a baixas temperaturas e motilidade flagelar (JAY, 2005; ORSI; WIEDMANN, 2016). Sendo a espécie *L. monocytogenes* patogênica a humanos e animais (BHUNIA, 2008).

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, em forma de bastonete, não formadora de esporos, anaeróbia facultativa, catalase positiva e capaz de sobreviver e se multiplicar em condições adversas, como amplas faixas de pH (4,1 – 9,6), temperatura (1 – 45°C), altas concentrações de sal (10%) e até mesmo na presença de agentes antimicrobianos (BHUNIA, 2008; ROBERTS *et al.*, 2020).

Devido sua capacidade de sobreviver em ambientes diversos e superar vários fatores estressantes, como baixas temperaturas, baixo pH e alta salinidade, *L. monocytogenes* é capaz de sobreviver por um longo período de tempo na indústria de alimentos, aderir e se desenvolver em superfícies de processamento podendo formar biofilmes, sendo de grande preocupação e desafio para indústrias alimentícias (KAWACKA *et al.*, 2021; SHAMLOO *et al.*, 2019).

Uma vez presente no alimento, esse patógeno pode ser ingerido e causar listeriose, doença de origem alimentar com altas taxas de letalidade que afeta principalmente grupos mais susceptíveis, como recém-nascidos, idosos, mulheres grávidas e indivíduos imunocomprometidos (BUCHANAN *et al.*, 2017; KAWACKA *et al.*, 2021; RODRIGUEZ *et al.*, 2021). Já que, *L. monocytogenes* quando ingerida, tem a capacidade de atravessar as barreiras epiteliais, causar invasão celular e replicação intracelular devido a fatores de virulência como internalinas e hemolisinas (MATEREKE; OKOH, 2020).

A listeriose é uma doença que afeta humanos e animais e pode ocorrer de forma invasiva ou não invasiva (ZAMUZ *et al.*, 2021). Em humanos pode causar encefalite, septicemia, meningite, sintomas gastrointestinais e nascimento prematuro ou aborto em mulheres grávidas (MATLE; MBATHA; MADORоба, 2020). A forma não invasiva é caracterizada por sintomas mais brandos como gastroenterite febril e geralmente acomete pessoas saudáveis que ingeriram elevado número de células da bactéria. Já a listeriose invasiva é mais severa e normalmente ocorre em pessoas com sistema imunológico debilitado, sendo caracterizada pela

disseminação da doença pelo sistema nervoso central e unidade fetoplacentar (VASCONCELOS; MARIN, 2008).

A principal via de transmissão de *L. monocytogenes* é pela ingestão de alimentos contaminados, principalmente peixes, carnes, produtos lácteos, frutas, hortaliças e alimentos prontos para consumo (ready to eat – RTE). Já que, devido sua alta resistência a condições estressantes, que acarreta em um difícil controle ao longo da cadeia alimentar, essa contaminação pode ocorrer durante o processamento, distribuição e, até mesmo em armazenamento refrigerado (BUCUR *et al.*, 2018; DUZE; MRIMANI; PATEL, 2021; ROBERTS *et al.*, 2020; ZAMUZ *et al.*, 2021). Apesar de não ser um microrganismo formador de esporos e ser facilmente destruída por tratamentos térmicos, pode ocorrer a recontaminação de alimentos RTE durante o processamento, sendo de extrema importância para a indústria de alimentos o controle de *L. monocytogenes* nesses produtos (DUSSAULT; VU; LACROIX, 2016).

O resultado da ingestão de alimentos contaminados vai depender de interação complexa entre a composição da matriz alimentar, a imunidade do hospedeiro e as características de virulências da cepa (KALLIPOLITIS; GAHAN; PIVETEAU, 2020).

2.1.1 Ciclo intracelular de *L. monocytogenes*

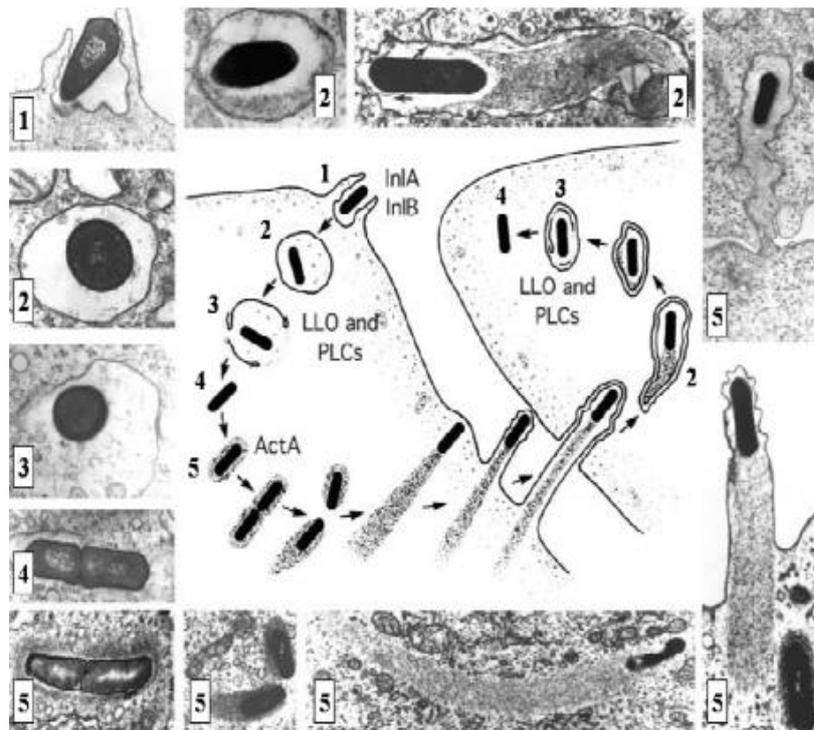
Ao ser contraído por via oral, *L. monocytogenes* é capaz de colonizar o trato intestinal. Uma vez ali presente, a bactéria é capaz de invadir o tecido, como a placenta em mulheres grávidas, entrar na corrente sanguínea e, então, atingir outras células susceptíveis do corpo. Já que, por ser um patógeno intracelular, inicialmente ocorre a penetração em células susceptíveis, para posterior processo de replicação dentro dessas células. Em células não fagocíticas é necessário a presença de proteínas, denominadas internalina A (In1A) e internalina B (In1B), que se ligam à superfície da bactéria e de receptores presentes na superfície das células do hospedeiro para facilitar sua entrada na célula (JAY, 2005).

Listeria monocytogenes sobrevive dentro do macrófago e, devido ao auxílio da listeriolisina O (LLO), consegue sair da membrana fagolisossomal e passar para o citoplasma, onde a proteína de superfície denominada ActA auxilia na formação de uma cauda de actina que impulsiona o microrganismo através da membrana citoplasmática, na qual é formada uma membrana dupla de vacúolo. Com ajuda da LLO e de duas fosfolipases bacterianas, a fosfolipase C fosfatidilinositol específica e uma fosfolipase C não específica, ocorre a liberação das bactérias e a repetição do processo de penetração das células hospedeiras adjacentes. Em

seguida, ocorre a projeção da membrana e a formação de um filopódio, que é absorvido por uma célula adjacente, levando a repetição do processo de invasão. Desse modo, não é necessário que a bactéria saia do interior das células hospedeiras para se espalhar para outras células (JAY, 2005).

Os diferentes estágios do ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes* podem ser observados na Figura 1.

Figura 1 - Eletromicrografias de transmissão dos estágios do ciclo de vida intracelular de *Listeria monocytogenes*.



Legenda: (1) A penetração no epitélio intestinal ocorre pela atuação de duas proteínas de superfície: internalina A (InlA) e internalina B (InlB). (2) A bactéria é fagocitada por macrófagos do hospedeiro. (3) A lise da membrana fagocítica ocorre pela atuação da listeriolisina O (LLO) e de fosfolipases C (PLCs). (4) A bactéria ganha acesso ao citoplasma celular. (5) O movimento inter e intracelular ocorre pela polimerização de uma cauda de actina no citoplasma do hospedeiro, pela ação da proteína de superfície ActA. A bactéria se dissemina pela corrente sanguínea, ganhando acesso a diferentes órgãos.

Fonte: Adaptado de Martins (2016) e Tilney e Portnoy (1989).

2.2 Deterioração de produtos cárneos

A deterioração dos alimentos é um problema global que requer atenção, pois ela limita o prazo de validade e a qualidade dos alimentos. Desse modo, o desenvolvimento de características que tornam o alimento inadequado ao consumo pode levar ao desperdício. Independentemente da fonte de contaminação, microrganismos deterioradores como bactérias,

leveduras e fungos filamentosos estão relacionados a esse problema. Além disso, fatores como a temperatura de armazenamento, procedimentos durante o processamento, transporte dos alimentos, pH, disponibilidade de água, armazenamento inadequado e manipuladores de alimentos influenciam na taxa de deterioração (ODEYEMI *et al.*, 2020).

A carne e seus derivados são alimentos muito perecíveis, já que possuem alta atividade de água, teor elevado de nutrientes e pH igual ou acima de 5,4, o que os tornam ambiente ideal para a replicação de microrganismos (HÚNGARO *et al.*, 2016). Sendo assim, os microrganismos utilizam esses nutrientes e como resultado tem-se a formação de limosidade superficial, mudanças na coloração e aparecimento de odores e sabores desagradáveis (GOMIDE; RAMOS; FONTES, 2013).

Os gêneros microbianos mais comuns associados à deterioração de carnes frescas e produtos cárneos são *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Micrococcus*, bactérias lácticas e *Enterobacter* (DOULGERAKI *et al.*, 2012). No entanto, em carnes e produtos cárneos embalados a vácuo o grupo de microrganismos predominantes são o das bactérias lácticas (ODEYEMY *et al.*, 2019).

Alguns fatores como baixo pH, baixa temperatura e embalagens com baixo teor de oxigênio, como as embalagens a vácuo ou com atmosfera modificada, são responsáveis pela seleção de bactérias ácido lácticas como principal grupo bacteriano causador de deterioração.

2.3 Bactérias Ácido Láctico (BAL)

As bactérias do ácido láctico são bastonetes e cocos Gram-positivos, não esporulados, anaeróbios aerotolerantes, geralmente catalase-negativos e ácido tolerantes. São muito utilizadas em diversas aplicações industriais que variam de culturas iniciadoras em laticínios a probióticos, em suplementos alimentares, e agentes de bioconversão (ZHANG; CAI, 2014). Essas bactérias são classificadas como homofermentativas ou heterofermentativas. As bactérias homofermentativas são aquelas que produzem como único ou principal produto da fermentação da glicose o ácido láctico, enquanto as heterofermentativas produzem a mesma quantidade molar de etanol, dióxido de carbono e lactato a partir de hexoses (JAY, 2005).

De acordo com a classificação taxonômica, as bactérias ácido lácticas pertencem ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales* e são divididas em 6 famílias, sendo elas *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leucocostocaceae* e *Streptococcaceae*, dentre as quais estão distribuídos 12 gêneros, *Aerococcus*, *Carnobacterium*,

Enterococcus, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (VIVEK *et al.*, 2019).

Com relação às necessidades para crescimento, as bactérias ácido lácticas são exigentes e necessitam de nutrientes complexos como carboidratos, aminoácidos, vitaminas e minerais (HOLZAPFEL; WOOD, 2014). Ainda que essas bactérias sejam classificadas como mesofílicas, algumas são capazes de crescer em temperaturas abaixo de 5°C ou acima de 45°C. A maioria cresce em uma faixa de pH entre 4,0 e 4,5, embora existam algumas que podem crescer abaixo de 3,2 e outras acima de 9,6 (JAY, 2005).

Essas bactérias não apresentam afinidade com um substrato específico da carne, mas geralmente são resistentes e tolerantes aos métodos de conservação utilizados na indústria (POTHAKOS *et al.*, 2015). Sendo assim, as bactérias que melhor se adaptam ao ambiente de seleção se sobressaem, tornam-se dominantes e atingem números elevados (DOULGERAKI *et al.*, 2012).

A segurança microbiológica de carnes e produtos cárneos embalados em atmosfera modificada ou a vácuo geralmente está relacionada à presença de bactérias lácticas nesses alimentos. Pois, quando armazenados em condições de baixa temperatura, alto teor de CO₂ e baixo teor de O₂, o crescimento de patógenos é evitado pela microbiota indígena em virtude da redução do pH, competição por O₂ e possível produção de substâncias antimicrobianas, além de outros fatores. Além disso, em produtos com altas concentrações de nitrito, as bactérias lácticas tornam-se dominantes devido sua relativa insensibilidade ao nitrito (JAY, 2005). Devido a atividade metabólica dessas bactérias, pode ocorrer o aparecimento de exsudados leitosos e viscosos, estufamento da embalagem pela produção de gás, sabores e odores desagradáveis, além do esverdeamento e acidificação do produto (SAMELIS; KAKOURI; REMENTZIS, 2000).

Uma importante fonte de contaminação de carnes por bactérias ácido lácticas é o ambiente de processamento, pois os microrganismos presentes na carne crua podem contaminar utensílios e superfícies de processamento e, desse modo, a contaminação cruzada dos produtos com microrganismos presentes na carne crua ocorre por meio da dispersão pelo ar e por superfícies contaminadas (POTHAKOS *et al.*, 2015).

2.4 Produtos cárneos emulsionados: salsichas

Produtos cárneos são aqueles obtidos de carnes, de miúdos e de partes comestíveis das diferentes espécies animais, com as propriedades originais das matérias-primas modificadas por

meio de tratamento físico, químico ou biológico, ou ainda pela combinação destes métodos em processos que podem envolver a adição de ingredientes, aditivos ou coadjuvantes de tecnologia (RIISPOA, 2020a). Segundo Oliveira *et al.* (2017), o consumo de produtos cárneos como linguiças, mortadelas e salsichas estão cada vez mais presentes no hábito alimentar dos brasileiros, o que tem contribuído para alta expansão e competitividade do mercado de embutidos na última década.

Salsicha é o produto cárneo obtido da emulsão de carne de uma ou mais espécies de animais, com adição ou não de gordura, de pele, de miúdos e de partes animais comestíveis, com adição de ingredientes e de condimentos específicos, embutido em envoltório natural ou artificial de calibre próprio, e submetido a processo térmico característico (RIISPOA, 2020b). As salsichas poderão ter como processo alternativo o tingimento, depelagem, defumação e a utilização de recheios e molhos (BRASIL, 2000).

Além dos ingredientes obrigatórios (carnes de diferentes animais de açougue e sal), as salsichas podem conter ingredientes opcionais como miúdos e vísceras comestíveis (estômago, coração, língua, rins, tendões, pele, medula e miolos), os quais devem ser utilizados no percentual limite de 10% de forma isolada ou combinada, podem ser adicionadas de carne mecanicamente separada (até 60% em salsichas comuns) e também água, agentes de liga, gordura animal ou vegetal, açúcares, aditivos intencionais e proteína vegetal e/ou animal (BRASIL, 2000).

Os sais de nitrito e nitrato são aditivos adicionados intencionalmente nas salsichas, pois são importantes para o desenvolvimento da cor e sabor característicos dos produtos curados, além de contribuir para a inibição do crescimento microbiano e da oxidação do produto (JO *et al.*, 2020).

As salsichas e linguiças contêm microrganismos provenientes de ingredientes e especiarias comumente adicionados durante a produção. A microbiota das salsichas consiste basicamente em microrganismos Gram-positivos como *Micrococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, microbactérias, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e leveduras (JAY, 2005).

A salsicha se destaca como um dos produtos de carne cozida prontos para consumo (RTE) mais populares e adequados ao estilo de vida moderno. Esses produtos estão sujeitos a contaminação por patógenos, como *L. monocytogenes* e microrganismos deterioradores, como as bactérias lácticas. A contaminação por esses microrganismos ocorre durante o processamento, principalmente após a etapa de cozimento, nos processos de retirada da tripa e embalagem, sendo essa contaminação a causa de perdas econômicas significativas para a indústria alimentícia (HORITA *et al.*, 2018; INMANEE; KAMONPATANA; PIRAK, 2019). Devido ao

fato de que estes microrganismos conseguem se desenvolver em temperaturas de refrigeração, as condições de comercialização, transporte e armazenamento doméstico das salsichas podem favorecer o crescimento das bactérias lácticas, levando à deterioração e o crescimento do patógeno a níveis perigosos antes do consumo, podendo ocasionar doenças de origem alimentar (RISTORI *et al.*, 2014).

Ristori *et al.* (2014) avaliaram a prevalência das populações e sorotipos de *L. monocytogenes* em 552 amostras de produtos cárneos refrigerados (carne moída, coxas de frango, linguiça suína e salsichas) coletados em supermercados da cidade de São Paulo e detectaram sua presença em 269 (48,7%) amostras, o que demonstra os riscos de listeriose associados ao consumo de produtos cárneos em São Paulo.

2.5 Nitrito e nitrato

O uso de conservantes em produtos enlatados e embutidos é importante para evitar danos relacionados a agentes químicos, físicos ou biológicos. Sua função é retardar a deterioração dos alimentos e evitar alterações em sua aparência ou sabor. Substâncias como os sais de nitrito e nitrato são comumente utilizados como aditivos alimentares no processamento de produtos cárneos, pois os sais de nitrito conservam a carne contra a deterioração bacteriana e também são agentes de cura (IAMARINO *et al.*, 2015).

A principal função do uso do nitrito e nitrato como aditivos é a inibição de *Clostridium botulinum*, responsável por causar botulismo. O efeito antibotulínico consiste na inibição do crescimento de células vegetativas e na prevenção da germinação e do crescimento dos esporos sobreviventes do processamento térmico ou da defumação durante o armazenamento (JAY, 2005).

A ação dos sais de nitrito e nitrato sobre bactérias do gênero *Clostridium* é bem conhecida. No entanto, estes não são tão efetivos no controle de *L. monocytogenes*. Desse modo, o impacto bacteriostático do nitrito em *L. monocytogenes* é menos pronunciado do que suas propriedades inibitórias que afetam o crescimento e produção de toxinas por *C. botulinum* (KING *et al.*, 2016).

O nitrito desempenha um papel contribuinte no controle de *L. monocytogenes*, principalmente quando em combinação com obstáculos de barreira adicionais como nível de sal, pH, temperatura, atividade de água, sendo responsável pelo aumento da atividade bacteriostática em carnes RTE. Desse modo, o nitrito pode causar estresse em *L. monocytogenes*, embora outras espécies nitrosadas provenientes de suas reações com

componentes do sistema de carne curada, também possam interferir diretamente no crescimento de *L. monocytogenes* ou eliminar cofatores necessários para seu crescimento (KING *et al.*, 2016).

Há relatos de que o nitrito de sódio oferece um tipo de inibição ao crescimento de *L. monocytogenes* em produtos cárneos RTE, embora não apresentem ação listericida. Sendo o aumento de sua concentração utilizada muitas vezes relacionado ao aumento da fase de latência do microrganismo e consequente redução da taxa de crescimento geral em um certo período de tempo (BUCHANAN; PHILLIPS, 1990; DUFFY; VANDERLINDE; GRAU, 1994; MYERS *et al.*, 2013a; VITAS *et al.*, 2004).

Myers *et al.* (2013b) avaliaram a influência do nitrito de sódio no crescimento de *L. monocytogenes* em presunto fatiado e peito de peru e observaram uma contagem significativamente menor de *L. monocytogenes* do 5º ao 28º dia de avaliação, para amostras contendo nitrito de sódio. Além de comprovarem o fato de que o nitrito é responsável por retardar, mas não parar o crescimento de *L. monocytogenes*.

O íon nitrato não é considerado tóxico, no entanto, quando adicionado aos alimentos, é convertido em nitrito devido à ação de bactérias. O nitrito pode então reagir com aminas secundárias e formar compostos conhecidos como N-nitrosaminas que são considerados cancerígenos aos seres humanos (JAY, 2005; KALAYCIOGLU; ERIM, 2019).

Desse modo, a RDC 272 da ANVISA de 2019, estabelece que a soma dos nitritos e nitratos utilizados em produtos cárneos curados, determinados como quantidade máxima residual, não deve ultrapassar 0,015 g/100 g, expressa como nitrito de sódio.

No entanto, os consumidores têm buscado cada vez mais por alimentos mais saudáveis e sustentáveis e, desse modo, os produtos têm sido reformulados visando à substituição de aditivos sintéticos, como corantes, aromatizantes e conservantes por alternativas naturais que atendam essa demanda (RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019). Portanto, devido a certa toxicidade relacionada ao uso do nitrito e sua ineficácia no controle de bactérias lácticas, o desenvolvimento de um conservante natural que possa substituir o nitrito, garantir a inocuidade do produto e atuar no controle da deterioração, torna-se interessante, sendo os óleos essenciais uma alternativa promissora.

2.6 Óleos essenciais

Além do metabolismo primário, responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais, as

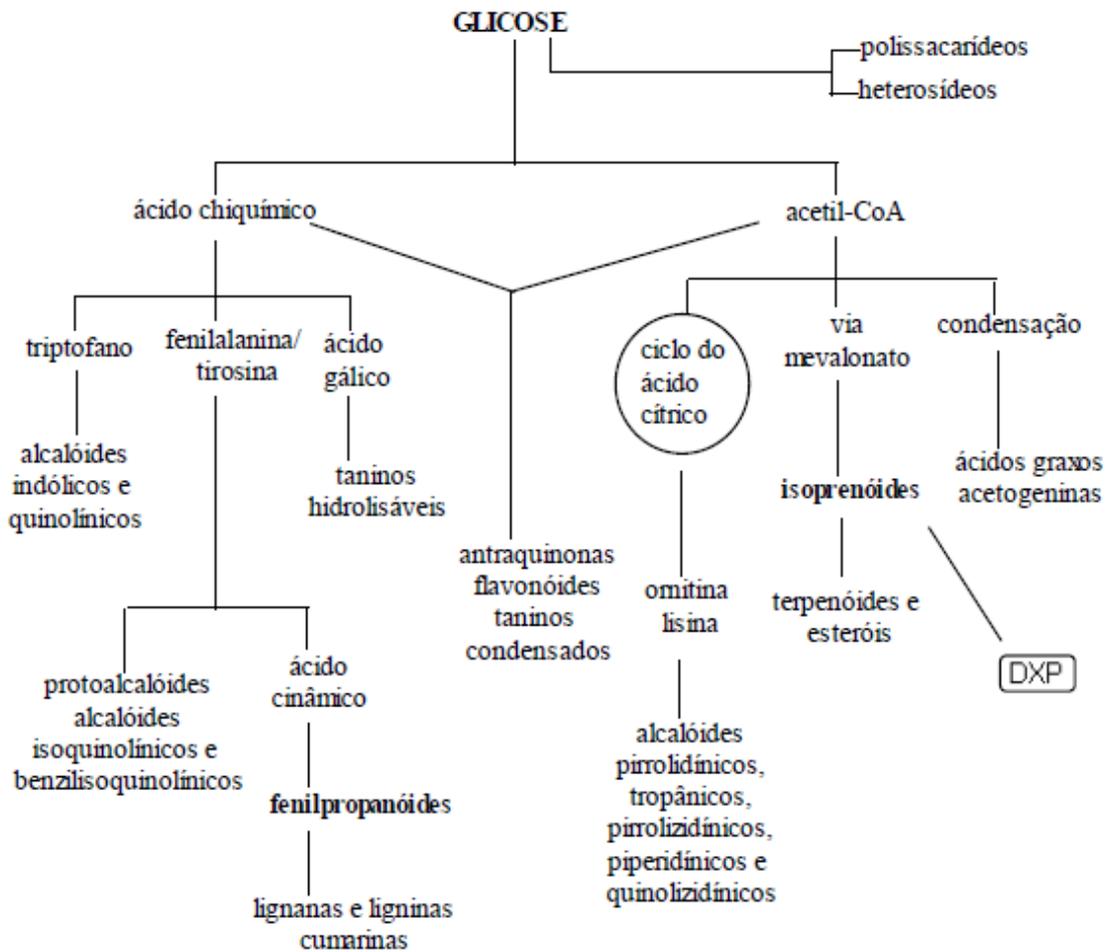
plantas também apresentam o chamado metabolismo secundário (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2008). Os metabólitos secundários, geralmente de estrutura complexa, baixo peso molecular, possuem atividades biológicas marcantes e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Sua produção é influenciada por fatores ambientais como sazonalidade, índice pluviométrico, radiação UV, composição atmosférica, disponibilidade de nutrientes, altitude, temperatura, idade da planta, herbivoria e ataque de patógenos (GOBBONETO; LOPES, 2007). Dentre os metabólitos secundários, os óleos essenciais se destacam, pois, devido suas propriedades bactericidas e fungicidas, seu uso nas indústrias farmacêutica e alimentícia são cada vez mais difundidos como alternativa aos produtos químicos sintéticos (BAKKALI *et al.*, 2008).

Segundo a *International Organization for Standardization* (ISO), os óleos essenciais são produtos obtidos de uma planta ou suas partes, por destilação (hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor d'água), ou por expressão, no caso do pericarpo dos frutos cítricos. Geralmente, a maioria se apresenta incolor ou ligeiramente amarelado, podendo apresentar coloração azul, como o óleo essencial de camomila. São misturas complexas, compostas por substâncias voláteis e odoríferas, solúveis em solventes orgânicos apolares e com densidade inferior à da água (BAKKALI *et al.*, 2008; SIMÕES *et al.*, 2007).

São metabólitos secundários obtidos exclusivamente de plantas e podem estar presentes em diversos órgãos, incluindo brotos, flores, folhas, sementes, galhos, caules, frutas, raízes, madeira ou casca, mas geralmente são armazenados pela planta em células secretoras, cavidades, canais, tricomas glandulares ou células epidérmicas (BAKKALI *et al.*, 2008; NAZZARO *et al.*, 2013; SIMÕES *et al.*, 2007).

Segundo Simões *et al.* (2007), a origem dos metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, sendo eles o ácido chiquímico e o acetato (FIGURA 2). O ácido chiquímico é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcaloides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanoides, compostos que têm em comum a presença de um anel aromático na sua constituição. Os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcaloides derivados deles; terpenoides, esteroides, ácidos graxos e triglicerídeos. Outra rota de biossíntese de terpenos é a 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS).

Figura 2 - Biossíntese de formação dos metabólitos secundários.



Fonte: Simões *et al.* (2007).

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

Os óleos essenciais podem conter cerca de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações e são caracterizados por terem 2 ou 3 componentes principais em concentrações mais altas (20-70%) quando comparados aos outros componentes presentes em traço (BAKKALI *et al.*, 2008).

2.6.1 Atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais

A segurança alimentar é um grande problema de saúde pública global, pois a contaminação de alimentos causada por patógenos alimentares ainda ocorre em vários países ao redor do mundo. Portanto, uma forma de controle é pelo uso de conservantes, que é um aditivo alimentar capaz de eliminar os microrganismos ou inibir sua proliferação, além de reduzir o processo de deterioração durante as etapas de produção, transporte e comercialização (JU *et al.*, 2019). Os conservantes podem ser classificados como sintéticos ou naturais e, atualmente, os sintéticos ainda são os mais utilizados pela indústria de alimentos. No entanto, devido à carcinogenicidade, teratogenicidade e intoxicação alimentar relacionadas ao uso de conservantes químicos, tem-se aumentado as buscas por alternativas naturais eficientes (JU *et al.*, 2017).

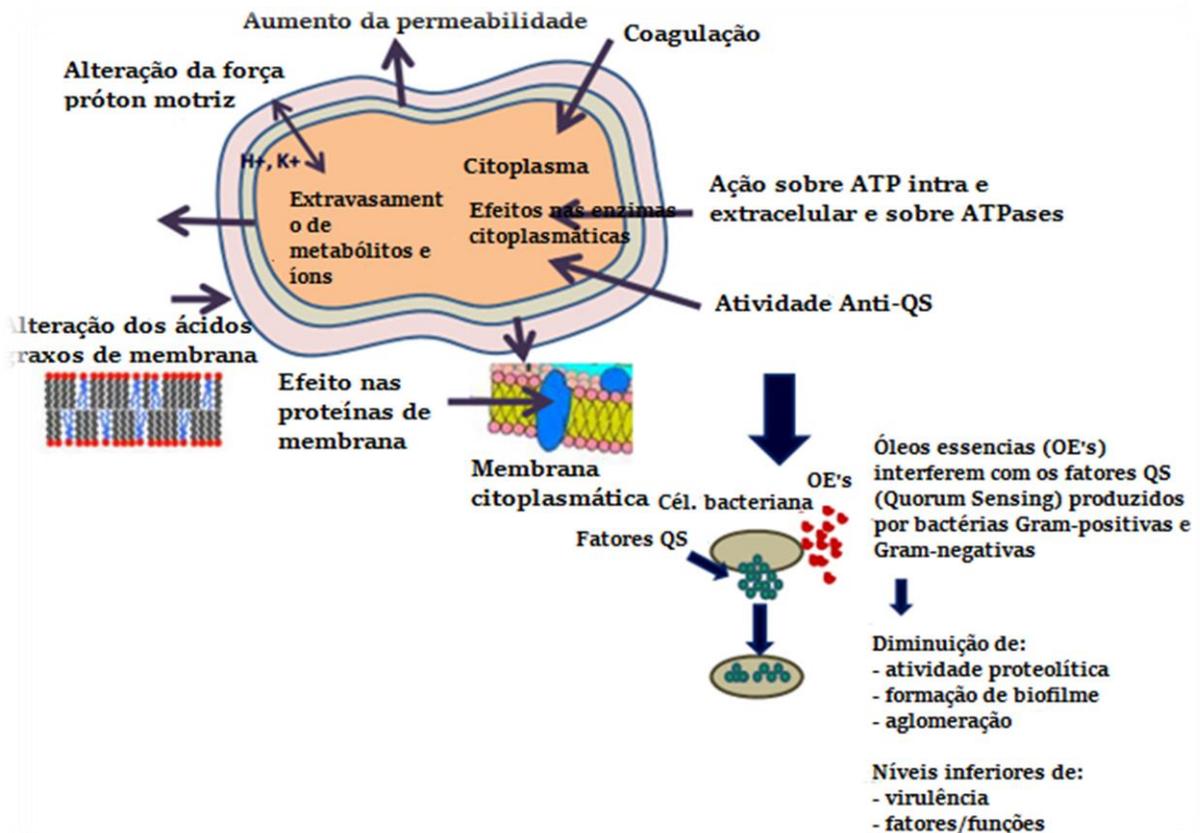
Desse modo, uma alternativa é a utilização de óleos essenciais, que embora sejam muito utilizados pela indústria como aromatizantes, são agentes antimicrobianos naturais que possuem potencial para combater patógenos alimentares e microrganismos deteriorantes. No entanto, sua aplicação como conservante alimentar necessita de conhecimentos sobre suas propriedades, como a concentração mínima inibitória (CMI), a gama de microrganismos-alvo, o modo de ação e o efeito dos componentes da matriz alimentar em suas propriedades antimicrobianas (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais depende de sua concentração e composição química, desse modo, o mecanismo de ação varia de óleo para óleo, sendo que alguns óleos possuem baixa ou nenhuma eficiência contra microrganismos enquanto outros são potentes antimicrobianos (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). Os terpenos, terpenóides e fenóis são os principais constituintes da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (BURT, 2004).

Os mecanismos de ação dos óleos essenciais não estão totalmente elucidados, no entanto, diversos mecanismos têm sido propostos (FIGURA 3). Os óleos essenciais desestabilizam principalmente a arquitetura celular, levando à quebra da integridade da membrana e ao aumento da permeabilidade, o que interrompe muitas atividades celulares, incluindo produção de energia (acoplada à membrana), transporte pela membrana e outras funções metabólicas regulatórias. Podem afetar tanto o envelope externo da célula quanto o citoplasma. Devido à sua natureza lipofílica, os óleos essenciais permeiam facilmente as membranas celulares bacterianas e o aumento da permeabilidade da membrana celular bacteriana leva ao extravasamento de componentes celulares e à perda de íons. O efeito

antibacteriano dos óleos essenciais também está relacionado à redução dos potenciais de membrana, a interrupção das bombas de prótons e consequente síntese de ATP. Essa alteração na organização celular pode causar um efeito cascata, afetando outras organelas celulares (SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016).

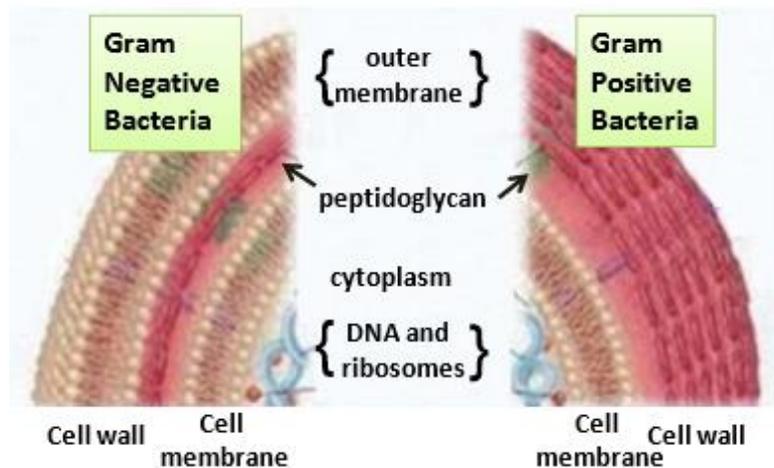
Figura 3 - Mecanismo de ação dos óleos essenciais em células bacterianas.



Fonte: Adaptado de Nazzaro *et al.* (2013).

Geralmente as bactérias Gram-negativas são mais resistentes aos óleos essenciais do que as bactérias Gram-positivas. Isso se deve às diferentes estruturas da parede celular dessas bactérias (FIGURA 4). A parede celular de bactérias Gram-positivas é composta principalmente por peptidoglicano, o que permite com que moléculas hidrofóbicas possam penetrar facilmente na célula e agir na parede celular e citoplasma. Já as bactérias Gram-negativas, além de uma fina camada de peptidoglicano, possuem uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos hidrofílicos (LPS), o que as tornam mais resistentes à passagem de compostos hidrofóbicos como os óleos essenciais (NAZZARO *et al.*, 2013).

Figura 4 - Estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



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

Trabalhos têm mostrado que os óleos essenciais são promissores no controle de microrganismos em produtos cárneos. Em seu trabalho, Menezes *et al.* (2018) objetivaram modelar a vida útil de presunto fatiado embalado a vácuo, em condições isotérmicas e não isotérmicas, além de avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano como agente antimicrobiano, demonstrando que o mesmo quando aplicado sobre a superfície dos presuntos em concentração de 0,4% apresentou efeito antibacteriano contra a microbiota natural de bactérias lácticas, principalmente em temperaturas de refrigeração, além de estender a vida útil do presunto armazenado a 6°C em 30 dias.

De Oliveira *et al.* (2011) avaliaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Satureja montana* L. contra *Clostridium perfringens* tipo A (ATCC 3624) inoculado em embutidos do tipo mortadela, formulados com diferentes níveis de nitrito de sódio (NaNO₂: 0 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg), além de OE nas concentrações de 0,0%, 0,78%, 1,56% e 3,125% e armazenados a 25°C por 30 dias. Os resultados mostraram que o óleo essencial quando testado *in vitro* contra *C. perfringens* apresentou a concentração mínima inibitória (CMI) de 1,56% e causou dano estrutural e lise celular na bactéria, que foi observado por microscopia eletrônica de transmissão. Este estudo também demonstrou efeito sinérgico entre NaNO₂ e o OE, sendo que os embutidos tipo mortadela formulados com 100 mg/kg de NaNO₂ e OE em todas as concentrações testadas, apresentaram redução da população de microrganismos quando comparados com a amostra controle.

Dias *et al.* (2015) avaliaram o efeito antimicrobiano de óleos essenciais e suas combinações sobre *Clostridium perfringens in vitro* e inoculados em mortadelas formuladas com 75 mg/kg e 150 mg/kg de nitrito. Os tratamentos com nitrito não foram capazes de inibir

o crescimento de *C. perfringens* em mortadela, no entanto, a aplicação dos óleos essenciais mostrou efeito inibitório significativo, sendo o óleo de orégano (*Origanum vulgare*) o que apresentou maior atividade antimicrobiana.

Pinelli *et al.* (2021) avaliaram a atividade antimicrobiana de combinações dos óleos essenciais de orégano, canela, limão Taiti, cardamomo e pimenta chinesa, bem como a atividade antimicrobiana das nanoemulsões, baseadas nessas combinações, para o controle de *Clostridium sporogenes* em mortadela. Nesse estudo, tanto as combinações dos óleos essenciais testadas tanto *in vitro* quanto no produto cárneo apresentaram efeitos antimicrobianos satisfatórios, nos quais os tratamentos adicionados de óleos essenciais foram mais efetivos na redução de células vegetativas de *Clostridium sporogenes* em mortadela do que o controle (com apenas 75 mg/kg de nitrito de sódio), sendo os tratamentos que continham as nanoemulsões os que apresentaram atividades antimicrobianas mais satisfatórias.

Os óleos essenciais, além de sua atividade antibacteriana, também apresentam atividade antioxidante. Antioxidantes são compostos sintéticos ou naturais que têm a capacidade de retardar alteração oxidativa no alimento. Sua aplicação em alimentos se tornou indispensável para prolongar a vida útil dos produtos sem alterar suas qualidades nutricionais ou sensoriais (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

A oxidação lipídica tem efeitos prejudiciais aos alimentos por ser responsável por alterações na textura, descoloração, além da formação de peróxidos e hidroperóxidos que geram compostos indesejáveis como cetonas, ácidos, álcoois e aldeídos, responsáveis pelo desenvolvimento de sabores e odores rançosos e redução do valor nutricional. Todos esses fatores contribuem para a redução da vida útil do produto, além de sua rejeição pelos consumidores (ALAMED *et al.*, 2009; EMBUSCADO, 2015). Devido a sua composição complexa (proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e pigmentos saturados e insaturados) a carne e os produtos cárneos são alvos das reações de oxidação que interferem em fatores como a deterioração e qualidade do produto (PATEIRO *et al.*, 2018).

Antioxidantes sintéticos ainda são muito utilizados pela indústria de alimentos para evitar reações de oxidação (KARRE; LOPEZ; GETTY, 2013). No entanto, há preocupação em relação aos efeitos tóxicos que eles podem causar a saúde humana (HASHEMI *et al.*, 2015). Desse modo, devido às limitações relacionadas ao uso de antioxidantes sintéticos, há o interesse por fontes alternativas como antioxidantes obtidos de produtos e sub produtos comestíveis (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Dentre essas fontes alternativas destacam-se os óleos essenciais.

A atividade antioxidante de óleos essenciais está relacionada a seus compostos fenólicos, que agem no processo de oxidação como terminadores de radicais livres ou quelantes de metais. Eles também são responsáveis por causar vários benefícios à saúde humana como a redução do risco de câncer, diabetes e doença cardíaca, inibição da agregação plaquetária, da atividade da ciclo-oxigenase (COX) e liberação de histamina, além de suas propriedades antibacterianas, antialérgicas, antivirais e anti-inflamatórias (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

De Oliveira *et al.* (2012) avaliaram o efeito da adição de óleo essencial (OE) de *Satureja montana* L. nas concentrações de 7,80, 15,60 e 31,25 $\mu\text{L/g}$ na oxidação lipídica (TBARS) em embutidos do tipo mortadela formulados com diferentes quantidades de nitrito de sódio (NaNO_2) (0, 100 e 200 mg/kg) e armazenados a 25°C por 30 dias. Nesse estudo, a atividade antioxidante do OE foi confirmada pelo método de branqueamento de β -caroteno e ensaio de DPPH. Valores reduzidos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ($p \leq 0,05$) foram observados em mortadelas formuladas com as menores concentrações de OE sem adição de nitrito. Este efeito significativo na oxidação lipídica também foi observado em amostras contendo OE e quantidades reduzidas de nitrito de sódio, o que sugeriu possíveis benefícios do uso combinado de OE e quantidades mínimas de nitrito de sódio em produtos de carne curada.

Šojić *et al.* (2019) determinaram que a combinação de óleo essencial de coentro na concentração de 0,12 $\mu\text{L/g}$ com 60 mg/kg de nitrito de sódio foi capaz de retardar o crescimento microbiano e a oxidação lipídica, além de proporcionar melhor tom avermelhado em salsichas suínas cozidas, armazenadas sob refrigeração por 52 dias. O que comprova a atividade antimicrobiana e antioxidante desse óleo essencial e demonstra seu potencial para ser utilizado como substituto parcial do nitrito em produtos cárneos processados.

2.6.2 Aplicação de óleos essenciais em matrizes alimentares

Como visto, devido à demanda dos consumidores por produtos naturais, com grande tendência a produtos *clean label* com maior segurança microbiana, aumentou-se o interesse pelo uso de óleos essenciais como conservantes e antioxidantes naturais na indústria de alimentos (DONSÌ; FERRARI, 2016). No entanto, para se obter a mesma ação antimicrobiana dos sistemas *in vitro* em sistemas alimentares, necessita-se de uma maior concentração de óleos essenciais (BURT, 2004). Desse modo, seu uso em alimentos é limitado devido sua baixa solubilidade em água, alta volatilidade e fortes características sensoriais (PRAKASH *et al.*, 2018).

Além disso, a ação antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser afetada por nutrientes abundantes nos alimentos como lipídios, carboidratos, proteínas e sais, já que estes contribuem para que as bactérias reparem suas células danificadas mais rápido do que em meios de cultura. Fatores como pH, atividade de água, força iônica e temperatura dos produtos também podem interferir em sua eficácia, sendo que, pode ocorrer a degradação química de alguns constituintes dos óleos essenciais durante o processamento ou armazenamento dos alimentos, o que também afeta sua atividade antimicrobiana (RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019).

Uma forma de minimizar a interferência sensorial dos óleos essenciais em produtos alimentícios sem que se perca sua ação antimicrobiana pode ser pelo uso de combinações entre diferentes óleos e também pela aplicação de nanoemulsões, que são utilizadas para encapsular compostos ativos e melhorar sua estabilidade físico-química e bioatividade (LIU *et al.*, 2019).

A aplicação de óleos essenciais em produtos cárneos como conservantes naturais tem sido relatada em diversos trabalhos, sendo alguns destes realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, como parte da linha de pesquisa que estuda a influência de compostos naturais sobre o desenvolvimento e controle de microrganismos em alimentos (TABELA 1).

Tabela 1 - Exemplos de trabalhos desenvolvidos nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e de Tecnologia de Carnes e Derivados da UFLA, buscando estudar a utilização de óleos essenciais como conservantes naturais em produtos cárneos (Continua).

Trabalhos desenvolvidos	Autores
Ação de emulsões de óleos essenciais sobre endósporos de <i>Clostridium botulinum</i> e <i>Clostridium sporogenes</i> em mortadela sem adição de nitrito (Dissertação).	Isidoro (2021)
Essential oil nanoemulsions for the control of <i>Clostridium sporogenes</i> in cooked meat product: An alternative?	Pinelli <i>et al.</i> (2021)
Sinergismo antimicrobiano de óleos essenciais e nitrito sobre <i>Clostridium sporogenes</i> inoculado em fiambre de peito de frango (Dissertação).	Abreu Martins (2016)
Misturas de óleos essenciais e seus compostos majoritários na conservação de apresetados inoculados com <i>Clostridium sporogenes</i> (Dissertação).	Simões (2016)
Atividade bactericida de antimicrobianos naturais sobre <i>Listeria monocytogenes</i> inoculada em mortadela (Tese).	Martins (2016)
Phenolic carvacrol as a natural additive to improve the preservative effects of high pressure processing of low-sodium sliced vacuum-packed turkey breast ham.	De Oliveira <i>et al.</i> (2015)
Antimicrobial activity of essential oils on <i>Clostridium perfringens</i> type A inoculated in mortadella.	Dias <i>et al.</i> (2015)

Tabela 1 - Exemplos de trabalhos desenvolvidos nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e de Tecnologia de Carnes e Derivados da UFLA, buscando estudar a utilização de óleos essenciais como conservantes naturais em produtos cárneos (Conclusão).

Viabilidade de <i>Clostridium difficile</i> em mortadela adicionada de óleos essenciais e teor reduzido de nitrito de sódio (Tese).	Dias (2015)
Análise química e potencial antimicrobiano de óleos essenciais sobre <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica na conservação de carne moída (Dissertação).	Souza (2015)
Efeito de óleos essenciais e compostos majoritários sobre endósporos de <i>Clostridium botulinum</i> inoculados em mortadela (Dissertação).	Aleixo (2014)
A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against <i>Salmonella</i> Enteritidis in ground beef during refrigerated storage.	De Oliveira, Soares e Piccoli (2013)
Óleos essenciais de plantas condimentares com potencial anti- <i>Shigella flexneri</i> na conservação de carne moída (Dissertação).	Bittencourt (2014)
Atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre <i>Clostridium botulinum</i> inoculado em mortadelas (Dissertação).	Rodrigues (2014)
Atividade de antimicrobianos naturais sobre endósporos de <i>Clostridium perfringens</i> em mortadelas (Dissertação).	Martins (2013)
Sensitivity to organic acids <i>in vitro</i> and <i>in situ</i> of <i>Salmonella</i> spp. and <i>Escherichia coli</i> isolated from fresh pork sausages.	De Ávila <i>et al.</i> (2013)
Inhibitory activity of <i>Syzygium aromaticum</i> and <i>Cymbopogon citratus</i> (D.C) Staph. Essential oils against <i>Listeria monocytogenes</i> inoculated in bovine ground meat.	De Oliveira <i>et al.</i> (2013)
Antioxidant effects of <i>Satureja montana</i> L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite.	De Oliveira <i>et al.</i> (2012)
Avaliações microbiológica e físico-química de mortadelas elaboradas com óleos essenciais e inoculados com <i>Clostridium perfringens</i> tipo A (Dissertação).	Dias (2011)
Antimicrobial activity of <i>Satureja montana</i> L. essential oil against <i>Clostridium perfringens</i> type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite.	De Oliveira <i>et al.</i> (2011)
Atividade do óleo essencial de segurelha (<i>Satureja montana</i> L.) sobre <i>Clostridium perfringens</i> em sistemas de emulsão cárneas elaborados com diferentes níveis de nitrito (Dissertação).	De Oliveira (2010)
Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente à <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis inoculada em carne moída bovina (Dissertação).	Soares (2010)

Fonte: Adaptado de Pinelli (2018).

2.7 Plantas condimentares aromáticas

2.7.1 Orégano (*Origanum vulgare*)

O orégano (*Origanum vulgare*) é uma planta aromática da família *Lamiaceae* utilizada há muitos anos devido a suas diversas propriedades e aplicações como especiaria culinária e propriedades medicinais. É muito comum em todo o Mediterrâneo, oeste e sudeste da Eurásia e nas regiões Irano-Turanianas (ALEKSEEVA *et al.*, 2021). Seu óleo essencial é muito conhecido por suas atividades antibacteriana, antiviral, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória e supressora de câncer, sendo de grande interesse para as indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias (LEYVA-LOPEZ *et al.*, 2017).

A capacidade antioxidante e antimicrobiana do orégano contra microrganismos patogênicos como *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, entre outros, faz com que ele seja de grande interesse para a indústria alimentícia, já que podem contribuir para o aumento da segurança e estabilidade dos alimentos (ARCILA-LOZANO *et al.*, 2004).

O óleo essencial de orégano é uma mistura complexa de compostos, sendo constituída principalmente por terpenos (mono e sesquiterpenos). Os principais compostos identificados em diferentes espécies de orégano são carvacrol, timol, γ -terpineno e *p*-cimeno, podendo estar presentes também terpinen-4-ol, linalol, β -mirceno, hidrato de *trans*-sabineno e β -cariofileno (LEYVA-LOPEZ *et al.*, 2017). No entanto, seu conteúdo pode variar de acordo com a espécie, época da colheita, características climáticas e geográficas (RODRIGUEZ-GARCIA *et al.*, 2016).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano pode ser atribuída a seus componentes isoméricos bioativos, carvacrol e timol. Ambos são considerados seguros para consumo e possuem aplicações odontológicas e alimentícias, como aromatizantes e aditivos antibacterianos (KACHUR; SUNTRES, 2020).

O timol (2-isopropil-5-metilfenol) é um monoterpene fenólico que possui atividade antioxidante, anti-inflamatória, cicatrizante, anti-séptica, antibacteriana, antifúngica e anestésica (MARCHESE *et al.*, 2016; NAJAFLOO *et al.*, 2020). Desse modo, possui uma ampla variedade de aplicações, sendo uma delas na área agrícola, como um agroquímico natural ou um conservante de alimentos, para proteção contra microrganismos patogênicos. No entanto, é necessário ter um maior conhecimento sobre suas concentrações de toxicidade aguda, crônica e teratogenicidade, visando sua aplicação como conservante alimentar. Pois, embora seja

classificado pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2006) como GRAS em produtos alimentícios, é preciso conhecer com clareza em qual concentração é considerado seguro (ESCOBAR *et al.*, 2020).

Bhargava *et al.* (2015) avaliaram a eficácia de nanoemulsões de óleo essencial de orégano na inativação do crescimento de bactérias de origem alimentar em alface fresca. Para tanto, alface inoculada artificialmente com os patógenos passaram por uma imersão durante um minuto em nanoemulsões de óleo de orégano (0,5% e 1%) e as amostras foram avaliadas durante o armazenamento (0 h, 3 h, 24 h e 72 h) a 4°C. Os resultados demonstraram que as nanoemulsões com 0,05% do óleo essencial reduziram 3,44 log UFC/g de *Listeria monocytogenes* e 3,57 log UFC/g quando utilizado 0,1% do óleo essencial. Também foi observado por meio de uma análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) que o tratamento com o óleo essencial causou um rompimento das membranas bacterianas.

2.7.2 Cravo (*Eugenia caryophyllus*)

O cravo é uma especiaria de relevância para a alimentação, medicina tradicional, farmacêutica e cosmética, sendo muito utilizada nas indústrias alimentícias como aromatizante e conservante natural (GONZALEZ-RIVERA *et al.*, 2021; IDOWU *et al.*, 2021). Seu óleo essencial é muito conhecido por suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antiviral, antifúngica, anestésicas, repelentes de mosquitos, anti-inflamatórias e citotóxicas (CHAIIEB *et al.*, 2007).

O óleo essencial de cravo pode ser obtido do botão, da folha ou do caule. Sendo o óleo essencial derivado dos botões, constituído principalmente por compostos fenólicos como o eugenol e acetato de eugenol (UDDIN *et al.*, 2017).

O eugenol é um hidroxifenilpropeno muito utilizado como aromatizante em alimentos e cosméticos, além de possuir atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, sendo eficaz contra fungos e uma gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MARCHESE *et al.*, 2017).

Estudos têm demonstrado a ação antimicrobiana do óleo essencial de cravo. Zhang *et al.* (2020) utilizaram o óleo essencial de cravo para controlar biofilmes de *Listeria monocytogenes* e observaram que ele é capaz de destruir a densa estrutura da membrana do biofilme e agir sobre as bactérias liberadas, além de reduzir a atividade metabólica da bactéria e inibir significativamente a secreção de polissacarídeos extracelulares e proteínas, apresentando uma remoção significativa de biofilmes em diferentes materiais e superfícies

vegetais. Somrani, Debbabi e Palop (2021) avaliaram a atividade antibacteriana e antibiofilme do óleo essencial de cravo da Índia contra *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis e encontraram uma concentração mínima inibitória de 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL, respectivamente. Também foi observada uma inibição da adesão celular inicial em 61,8% para *L. monocytogenes* e 49,8% para *S. Enteritidis* e, após 1 hora de incubação com o óleo essencial, uma redução dos biofilmes pré-formados em 30,2% para *L. monocytogenes* e 20,3% para *S. Enteritidis*. O que sugere que sanitizantes a base de óleo essencial de cravo da Índia podem ser uma estratégia para o controle de biofilmes em ambientes de produção de alimentos.

2.7.3 Alho (*Allium sativum*)

O gênero *Allium* pertence à família Liliaceae, que é composta por mais de 600 espécies, dentre as quais o alho (*Allium sativum*) e a cebola (*Allium cepa*) se destacam por sua popularidade e por serem amplamente utilizados em todo o mundo como ingredientes alimentares (BISEN; EMERALD, 2016). O alho é considerado uma das 20 hortaliças mais importantes, com várias aplicações, seja para fins culinários ou medicinais, além de ser considerado como uma fonte rica em compostos fenólicos totais. Há registros do seu uso a mais de 4000 anos na medicina tradicional contra infecções, doenças cardiovasculares e câncer (MARTINS; PETROPOULOS; FERREIRA, 2016; SRIVASTAVA; BORDIA; VERMA, 1995).

Estudos científicos têm demonstrado os efeitos benéficos do alho no sistema cardiovascular, diabetes, osteoporose, estresse, doença de Alzheimer, cicatrização de feridas, envelhecimento, neuro/nefroproteção e como antifúngicos, antibacterianos, antivirais e antiprotozoários. Como um antibiótico natural, ele tem sido efetivo contra diversos microrganismos (SINGH *et al.*, 2020; SRIVASTAVA; BORDIA; VERMA, 1995).

A alicina (S-alil-L-propenotiosulfonato) é o principal composto antimicrobiano do alho obtido a partir da alicina (S-alil-L-cisteína sulfóxido) por meio da ação da enzima aliinase (L-cisteína sulfóxido liase). Ela pertence ao grupo químico dos tiosulfonatos e é um potente antimicrobiano que existe exclusivamente no gênero *Allium* como um dos principais aminoácidos não proteicos contendo enxofre (CHOI *et al.*, 2007).

Esmaili *et al.* (2020) avaliaram a eficácia de filmes de quitosana e proteína de soro de leite incorporados com óleo essencial de alho e óleo essencial de alho nanoencapsulado para aumentar a vida útil de salsichas resfriadas, embaladas a vácuo e observaram que os filmes ativos retardaram a oxidação lipídica e o crescimento dos principais grupos bacterianos de

deterioração em comparação com o controle. Somrani *et al.* (2020) testaram a atividade antibacteriana e anti-biofilme dos óleos essenciais de canela, cebola e alho contra *Listeria monocytogenes* e obtiveram uma concentração mínima inibitória (CMI) de 0,1 mg/mL para o óleo essencial de alho, que também foi capaz de inibir completamente a fixação celular inicial da bactéria e inibir 68% dos biofilmes pré-formados após 1 hora de incubação com a CMI. O que demonstrou que o óleo essencial de alho possui uma atividade antibiofilme eficaz contra *L. monocytogenes*, sendo uma alternativa promissora como antimicrobiano natural em instalações de processamento de alimentos.

2.7.4 Coentro (*Coriandrum sativum*)

O coentro (*Coriandrum sativum*) é uma planta anual ou bienal pertencente à família Umbelliferae/Apiaceae, originária da região europeia mediterrânea e que atualmente é cultivada em todo o mundo (WEI *et al.*, 2019). É uma especiaria muito utilizada na culinária mundial que possui fitoquímicos bioativos que lhe proporciona uma série de atividades biológicas como atividade anticâncer, neuroprotetora, ansiolítica, anticoncussivante, analgésica, hipoglicêmica, hipotensora, hipolipidêmica, antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (PRACHAYASITTIKUL; PRACHAYASITTIKUL; RUCHIRAWAT, 2018).

Seu óleo essencial é caracterizado por um líquido incolor ou amarelo claro com odor característico e sabor suave, doce, quente e aromático; sendo o linalol seu principal constituinte (~70%) (BURDOCK; CARABIN, 2009). Estudos demonstram que o óleo essencial de coentro possui atividades antioxidantes, antifúngicas e antibacterianas, além de vários componentes químicos nas diversas partes da planta que contribuem para manutenção da vida útil dos alimentos, evitando o processo de deterioração. Portanto, como a planta não apresenta efeito tóxico aos seres humanos, seu óleo essencial pode ser utilizado em alimentos como conservantes e aromatizantes (MANDAL; MANDAL, 2015), sendo uma alternativa aos conservantes sintéticos.

O linalol (C₁₀H₁₈O) é um álcool monoterpênico muito conhecido por ser um dos componentes principais de óleos essenciais de plantas aromáticas, como a lavanda e o coentro. Por não apresentar toxicidade e, de acordo com recentes estudos científicos *in vitro* e *in vivo*, que demonstraram uma ampla gama de propriedades bioativas, possuem aplicações farmacêuticas, cosméticas e medicinais, podendo ser utilizado como fixador de fragâncias e para efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, hipotensores, vasorrelaxantes, antinociceptivos e antimicrobiano (CAMARGO; VASCONCELOS, 2014; PEREIRA *et al.*, 2018).

Ao avaliarem o efeito antibacteriano do óleo essencial de coentro contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e seu modo de ação por citometria de fluxo, Silva *et al.* (2011) sugeriram que o seu principal mecanismo de ação seria o dano à membrana celular, devido à perda concomitante de todas as funções celulares, como atividade respiratória, atividade de efluxo e potencial de membrana, que levaram à morte celular. Delaquis e Stanich (2011) avaliaram as propriedades antilisteriais do óleo essencial de coentro e demonstraram sua potente ação antilisterial e potencial aplicação como um conservante de alimentos ou na formulação de desinfetantes para o controle de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento de alimentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As análises microbiológicas, físico-químicas e elaboração da salsicha foram realizadas no Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) nos laboratórios de Microbiologia de Alimentos e de Tecnologia de Carnes e Derivados (LabCarnes) e na Planta Piloto de Processamento de Pescado.

3.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), cravo botão (*Eugenia caryophyllus*), coentro (*Coriandrum sativum*), alho (*Allium sativum*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) foram adquiridos da empresa FERQUIMA®.

3.2 Microrganismo, padronização e obtenção do inóculo

A cepa bacteriana utilizada nesse estudo foi *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e mantida no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA.

A cepa de *L. monocytogenes* foi ativada em caldo triptona de soja acrescido de 0,6% (m/v) de extrato de levedura (TSB-YE), seguida de incubação a 37°C por 24 horas. A cultura estoque foi então obtida pelas transferências de alíquotas de 1 mL da cultura ativa para microtubos e centrifugação a 7700 *xg* por 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado e a massa celular obtida foi ressuspensa com a adição e homogeneização de 1 mL de meio de congelamento (glicerol: 15 mL; peptona bacteriológica: 0,5 g; extrato de levedura: 0,3 g; NaCl: 0,5 g; água destilada: 100 mL). As culturas estoque foram mantidas a -18°C durante o período de execução do experimento.

A padronização do inóculo a 10⁸ UFC/mL foi realizada mediante curva de crescimento, na qual o crescimento do microrganismo foi monitorado por leituras periódicas da absorbância (D.O. 600 nm) em espectrofotômetro (BEL SP-2000) e plaqueamento de alíquotas da cultura em ágar triptona de soja acrescido de 0,6% (m/v) de extrato de levedura (TSA-YE). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para posterior quantificação das colônias e padronização da cultura.

Os inóculos foram obtidos pela transferência de alíquotas de 1 mL das culturas estoque para tubos de ensaio contendo 10 mL de TSB-YE e incubação a 37°C por 24 horas. Após esse período, alíquotas de 1 mL das culturas foram transferidas para frascos contendo 100 mL de TSB-YE e incubados a 37°C pelo tempo necessário para se atingir 10⁸ UFC/mL.

3.3 Determinação da Concentração Mínima Bactericida

A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2019) com adaptações, em microplacas de poliestireno com 96 cavidades. As emulsões dos óleos essenciais foram realizadas em TSB+YE adicionado de 0,5% (v/v) de Tween 80. As concentrações avaliadas dos diferentes óleos essenciais foram de 2; 1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03; e 0,015% (v/v).

Alíquotas de 10 µL da cultura padronizada foram inoculadas nas cavidades da microplaca contendo 150 µL de TSB-YE acrescidos de Tween 80 e das concentrações dos óleos essenciais. As microplacas foram então incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, alíquotas de 10 µL das culturas de cada cavidade foram plaqueadas em TSA-YE empregando-se a técnica de plaqueamento em microgotas e incubadas a 37°C por 24 horas. A menor concentração do óleo onde não houve crescimento do microrganismo na placa foi denominada CMB. O experimento foi realizado com três repetições em triplicata. Utilizaram-se dois controles no experimento, sendo um negativo, contendo TSB-YE acrescido de 0,5% de Tween 80 e das concentrações dos óleos essenciais, e um controle positivo, contendo TSB-YE acrescido de 0,5% de Tween 80 e 10 µL da cultura padronizada.

3.4 Combinações entre os óleos essenciais

Os óleos essenciais de orégano, cravo, coentro e alho foram selecionados para continuação do experimento, baseando-se no possível impacto sensorial ao serem aplicados na salsicha. Portanto, a partir de pré-testes, foi elaborada uma combinação com base em 33% das CMB dos óleos selecionados.

A partir da concentração mínima bactericida dos óleos essenciais testados *in vitro*, foram gerados vinte e sete ensaios utilizando-se o delineamento DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) no programa Chemoface versão 1.5, utilizando “Experimental design”, sendo as variáveis codificadas “+2” e “-2” calculadas de acordo com a CMB encontrada para cada óleo.

Na Tabela 2 é possível observar as variáveis codificadas e as diferentes proporções dos óleos essenciais utilizados para os vinte e sete ensaios gerados.

Tabela 2 - Proporções em porcentagem utilizadas nos ensaios das combinações dos óleos essenciais de orégano, coentro, alho e cravo

Ensaio	Variáveis codificadas				% de óleos essenciais			
	Orégano	Coentro	Alho	Cravo	Orégano	Coentro	Alho	Cravo
1	-1	-1	-1	-1	0,05	0,05	0,14	0,01
2	-1	-1	-1	1	0,05	0,05	0,14	0,03
3	-1	-1	1	-1	0,05	0,05	0,41	0,01
4	-1	-1	1	1	0,05	0,05	0,41	0,03
5	-1	1	-1	-1	0,05	0,16	0,14	0,01
6	-1	1	-1	1	0,05	0,16	0,14	0,03
7	-1	1	1	-1	0,05	0,16	0,41	0,01
8	-1	1	1	1	0,05	0,16	0,41	0,03
9	1	-1	-1	-1	0,16	0,05	0,14	0,01
10	1	-1	-1	1	0,16	0,05	0,14	0,03
11	1	-1	1	-1	0,16	0,05	0,41	0,01
12	1	-1	1	1	0,16	0,05	0,41	0,03
13	1	1	-1	-1	0,16	0,16	0,14	0,01
14	1	1	-1	1	0,16	0,16	0,14	0,03
15	1	1	1	-1	0,16	0,16	0,41	0,01
16	1	1	1	1	0,16	0,16	0,41	0,03
17	-2	0	0	0	0	0,105	0,275	0,02
18	2	0	0	0	0,215	0,105	0,275	0,02
19	0	-2	0	0	0,105	0	0,275	0,02
20	0	2	0	0	0,105	0,215	0,275	0,02
21	0	0	-2	0	0,105	0,105	0	0,02
22	0	0	2	0	0,105	0,105	0,545	0,02
23	0	0	0	-2	0,105	0,105	0,275	0
24	0	0	0	2	0,105	0,105	0,275	0,04
25	0	0	0	0	0,105	0,105	0,275	0,02
26	0	0	0	0	0,105	0,105	0,275	0,02
27	0	0	0	0	0,105	0,105	0,275	0,02

Fonte: Da autora (2021).

A avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos vinte e sete ensaios foi realizada em tubos de ensaio. Para tanto, alíquotas de 50 µL de cultura de *L. monocytogenes* padronizada em 10⁸ UFC/mL foram transferidas para tubos contendo 5mL de caldo TSB-YE acrescido de 0,5% de Tween 80 e das diferentes concentrações dos óleos essenciais apresentadas na Tabela 2, seguido de homogeneização dos tubos em agitador tipo Vortex e incubação a 37°C por 24 horas. Após incubação, alíquotas de 10 µL foram transferidas para placas de Petri contendo TSA-YE, para realização do plaqueamento pela técnica de microgotas. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e, após esse período, foi observado quais ensaios foram capazes

de inibir o crescimento da bactéria. O experimento foi realizado com três repetições em triplicata.

3.5 Fabricação da salsicha

3.5.1 Obtenção da Carne Mecanicamente Separada (CMS)

Para elaboração das salsichas, inicialmente foi necessário obter a carne mecanicamente separada (CMS) de frango. Para tanto, dorsos de frango foram obtidos de açougue situado no município de Lavras-MG e estes foram, imediatamente, transportados para o laboratório de Tecnologia de Carnes e Derivados, onde foi realizada a retirada da pele e o corte dos dorsos. Após este processo, os dorsos cortados foram processados em desossadeira mecânica (PV Máquinas, Chapecó, SC, Brasil), sendo a temperatura da matéria prima controlada entre -1°C e -2°C e a temperatura de saída da polpa inferior a 8°C . Após extração, a CMS obtida foi homogeneizada e imediatamente armazenada em sacos plásticos que foram selados à vácuo e mantida congelada a -18°C até o preparo das salsichas (FIGURA 5).

Figura 5 - Matéria-prima e carne mecanicamente separada de frango.



Fonte: Da autora (2021).

3.5.2 Formulação e processo tecnológico

Após avaliação da atividade antimicrobiana das combinações entre os óleos essenciais foi escolhido um ensaio para ser utilizado como conservante em modelo emulsionado tipo salsicha.

Na Tabela 3 encontra-se a formulação utilizada para fabricação das salsichas. Foi realizado um tratamento isento de nitrito, contendo a emulsão de óleos essenciais selecionada (ensaio 10 presente na Tabela 2) e um controle, sem adição de óleos essenciais, porém, com adição de 150 mg/kg de nitrito de sódio.

Tabela 3 - Formulação utilizada para elaboração das salsichas.

Ingredientes	Controle (%)	Tratamento 1 (%)
Carne suína	31,05	31,05
CMS de frango	46,58	46,58
Água/Gelo	13,83	9,83
Emulsão de OE	-	4,00
Fécula de mandioca	2,02	2,02
Proteína isolada de soja	3,88	3,88
Sal	1,79	1,79
Glutamato monossódico	0,31	0,31
Nitrito de sódio	0,015	-
Eritorbato	0,055	0,055
Tripolifosfato	0,47	0,47

Fonte: Da autora (2021).

O processo tecnológico foi realizado seguindo o padrão técnico de duas fases para “massa fina”, utilizado para obtenção de produtos emulsionados em sistemas não-contínuos. Inicialmente, adicionou-se a CMS de frango e a carne suína (moída no disco de 6 mm) resfriadas ao mini-cutter (*cutter Robot Coupe*, modelo R5 Plus), no qual foram processadas em velocidade máxima juntamente com metade do gelo, sal (Cisne®, Cabo Frio, RJ, Brasil), nitrito de sódio (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e o tripolifosfato de sódio (Adicel Ind.e Com. Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil), até atingir temperatura entre 2°C e 4°C. Em seguida, a velocidade do cutter foi reduzida e o restante do gelo e da proteína isolada de soja (New Max Industrial, Americana, SP, Brasil) foram adicionados. Após homogeneização, foi adicionada a emulsão de óleos essenciais (0,16% de orégano, 0,05% de coentro, 0,14% de alho e 0,03% de cravo) previamente elaborada em água destilada estéril acrescida de 0,5% de Tween 80, seguido do aumento da velocidade do cutter, e adição do glutamato monossódico e eritorbato (New Max

Industrial, Americana, SP, Brasil). Por último, foi adicionada a fécula de mandioca (Pachá Alimentos®, Contagem, MG, Brasil), sendo a temperatura final do processo de emulsificação controlada ($< 12^{\circ}\text{C}$). A massa obtida foi embutida manualmente em tripa sintética de poliamida (calibre 38-40 mm) e submetida ao processamento térmico de cocção por imersão em banho-maria, escalonado em 55°C por 40 minutos, 65°C por 40 minutos, 75°C por 40 minutos e 80°C até a temperatura interna atingir 72°C (medida com termopar). Todo o processo de cozimento foi monitorado com auxílio de termômetro, com mensuração da temperatura do banho-maria. Após cozimento, as salsichas foram imediatamente resfriadas por imersão em banho de gelo até a temperatura interna ser inferior a 8°C . Posteriormente, foi realizada a retirada das tripas e fracionamento das salsichas.

Listeria monocytogenes foi inoculada nas salsichas, em porções de aproximadamente 35 g, por imersão dessas em suspensão bacteriana padronizada em 10^6 UFC/mL durante 3 minutos. A suspensão foi elaborada em solução salina 0,85% (m/v). Após imersão, as salsichas foram mantidas em placas de Petri estéreis, semiabertas, em câmara de fluxo laminar, para secagem de suas superfícies e subsequente embalagem a vácuo em sacos plásticos e armazenamento a $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$. As amostras foram analisadas durante 0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias para enumeração de *Listeria monocytogenes* e contagem total de bactérias lácticas.

Para realização das análises tecnológicas, as salsichas foram separadas em porções de 50 g, embaladas em sacos plásticos, seladas a vácuo e armazenadas a $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$. As amostras foram analisadas após 0, 5, 10 e 15 dias de armazenamento quanto a atividade de água, pH, oxidação lipídica e análise de cor objetiva (FIGURA 6).

O experimento foi realizado em duas repetições e as análises em triplicata.

Figura 6 - Salsichas elaboradas e fracionadas para análises microbiológicas e tecnológicas.

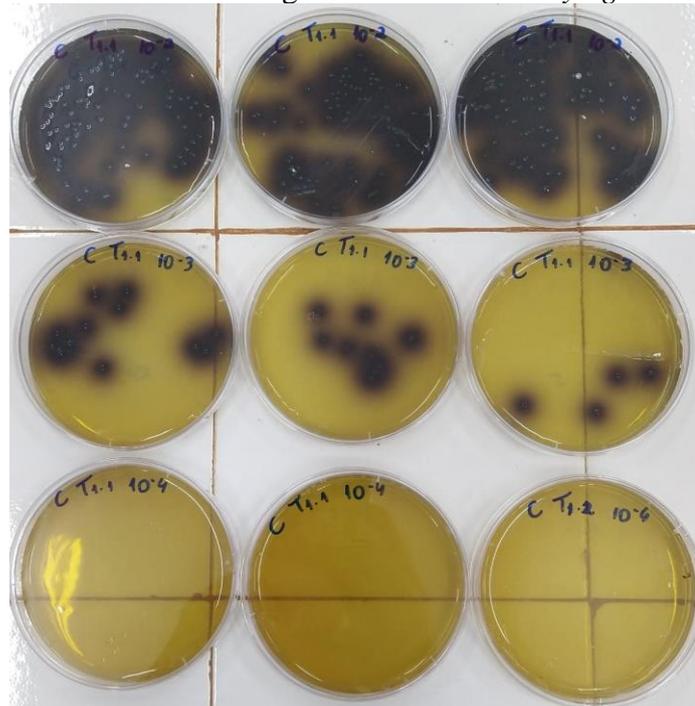


Fonte: Da autora (2021).

3.6 Enumeração de *Listeria monocytogenes* e bactérias ácido lácticas

As embalagens contendo as salsichas foram higienizadas com álcool 70% (v/v) e abertas de forma asséptica para retirada de unidades analíticas de 25 g de cada amostra, que foram transferidas para um saco plástico estéril, no qual foi adicionado 225 mL de água peptonada 0,1% (m/v), seguido de homogeneização (490 golpes/min) em Stomacher Metroterm® por 3 minutos. Imediatamente após a homogeneização, diluições seriadas em tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (m/v) foram realizadas. Alíquotas de 0,1 mL das diluições adequadas foram transferidas para placas de Petri contendo o meio Ágar Listeria Oxford acrescido de suplemento, para realização do plaqueamento em superfície e subsequente incubação das placas a 37°C por 48 horas. Após esse período, foi realizada a quantificação de colônias típicas de *L. monocytogenes* (FIGURA 7), sendo o resultado expresso em unidades formadoras de colônia por grama de produto (UFC/g).

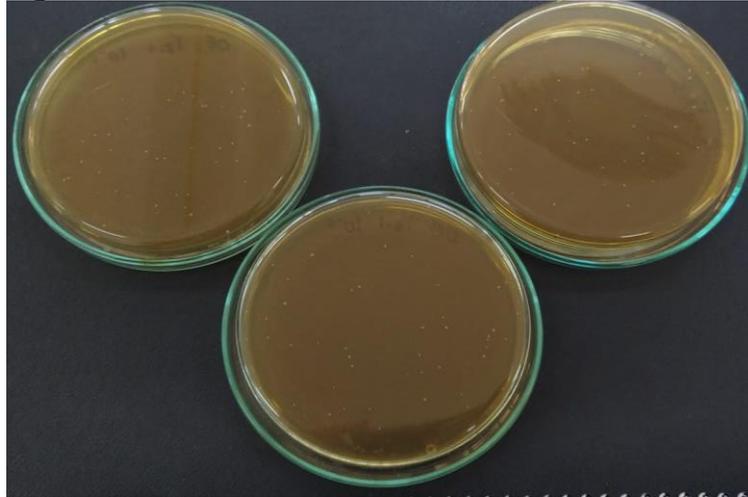
Figura 7 - Crescimento de células vegetativas de *L. monocytogenes* em meio Oxford.



Fonte: Da autora (2021).

Para contagem de bactérias lácticas, que não foram inoculadas nas salsichas, mas são provenientes de contaminações durante o processamento, realizou-se o plaqueamento em profundidade, no qual alíquotas de 1 mL das diluições adequadas foram transferidas para placas de Petri estéreis com subsequente adição do ágar MRS (Man Rogosa and Sharpe), seguida de homogeneização das placas e, após completa solidificação do meio, adição de uma sobrecamada. As placas foram então incubadas a 30°C por 72 horas. Após esse período, realizou-se a contagem de colônias típicas (FIGURA 8), sendo o resultado expresso em UFC/g.

Figura 8 - Crescimento de bactérias lácticas em meio MRS.



Fonte: Da autora (2021).

O experimento foi realizado em duas repetições com análises em triplicata.

3.7 Análises tecnológicas

3.7.1 Composição centesimal da CMS

As análises de umidade (método nº 967.08), lipídios (método nº 2003.06) e proteína (método nº 988.05) foram realizadas de acordo com as metodologias descritas pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2012).

O conteúdo de umidade foi determinado pelo método gravimétrico de secagem em estufa a 105°C. O teor de lipídios foi determinado por extração com éter etílico em aparelho Soxhlet. O conteúdo de proteína foi estimado por meio do método Kjeldahl, usando um fator de conversão de nitrogênio de 6,25.

3.7.2 Atividade de água

A determinação da atividade de água das salsichas foi realizada utilizando-se 10 g de amostra com temperatura padronizada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e analisadas no aparelho Aqualab® (modelo 4 TE, Barueri, SP, Brasil). As leituras foram realizadas em triplicata.

3.7.3 Determinação do pH

Os valores de pH dos produtos foram determinados pela inserção de um eletrodo de penetração nas amostras, acoplado a um pHmetro digital (modelo HI 99163, Hanna Instruments, Barueri, SP, Brasil).

3.7.4 Cor instrumental

As amostras foram avaliadas externamente, com colorímetro Nix Color Sensor Pro (NPRO; Nix Sensor, Ltd, Burlington, Ontário, Canadá), por meio do sistema de cores CIELab, definindo o espaço cromático em coordenadas retangulares (L^* , a^* e b^*), em que: L^* mede a luminosidade e varia de 100 para superfícies perfeitamente brancas até 0 para o preto; a^* mede a intensidade de vermelho (+) e verde (-); e b^* mede a intensidade de amarelo (+) e azul (-). Foram realizadas três leituras em diferentes pontos da superfície das salsichas. A partir dos índices de cor, também foram calculadas as coordenadas polares índice de saturação (C^*) e ângulo de tonalidade (h , em graus) pelas seguintes fórmulas (RAMOS; GOMIDE, 2007):

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

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

3.7.5 Oxidação lipídica

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

3.8 Cálculo da velocidade de crescimento

A velocidade específica de crescimento de *Listeria monocytogenes* e bactérias lácticas ao longo de 15 dias de armazenamento foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$\begin{aligned}\mu &= \frac{dN}{dt} \\ \ln N - \ln N_0 &= \mu (t - t_0) \\ \log N - \log N_0 &= \frac{\mu}{2,303} (t - t_0) \\ \mu &= \frac{\log N - \log N_0}{t - t_0} 2,303\end{aligned}\quad (1)$$

3.9 Análises estatísticas

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

O experimento foi realizado com base em delineamento em blocos casualizados (DBC). Para as análises microbiológicas foi utilizado o esquema fatorial (2x6), sendo dois tratamentos em seis tempos de armazenamento e para as análises tecnológicas um fatorial (2x4), sendo dois tratamentos em quatro tempos de armazenamento. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e uma posterior aplicação do teste t de Student (LSD) para comparação dos parâmetros qualitativos e uma análise de regressão para comparação dos parâmetros quantitativos utilizando-se o software Sisvar 5.6.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Concentração mínima bactericida (CMB) sobre *L. monocytogenes*

As concentrações mínimas bactericidas (CMB) encontradas para os óleos essenciais testados *in vitro* sobre *L. monocytogenes* ATCC 19117 podem ser observadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Concentrações mínimas bactericidas (CMB) de diferentes óleos essenciais sobre *Listeria monocytogenes*.

Óleos Essenciais	CMB (%)
Orégano	1,0
Tomilho	1,0
Cravo	0,5
Coentro	1,0
Alho	2,0

Fonte: Da autora (2021).

Todos os cinco óleos essenciais testados foram capazes de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 19117 *in vitro*, sendo o óleo de cravo o que apresentou menor CMB (0,5%) e, portanto, a melhor atividade antibacteriana, seguido dos óleos essenciais de orégano, tomilho e coentro que apresentaram uma mesma CMB (1,0%). O óleo essencial de alho foi o que apresentou a maior CMB (2,0%) e, portanto, menor ação antimicrobiana.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está relacionada a seus compostos bioativos como ácidos fenólicos, terpenos, aldeídos e flavonoides. Alguns compostos como o timol, carvacrol, eugenol, carvona, cinamaldeído, limoneno, α - e β -pineno e *p*-cimeno exercem atividade antilisterial por meio de diferentes mecanismos de ação, como alteração dos perfis de ácidos graxos e da estrutura da membrana celular, aumento da permeabilidade celular, ação sobre as proteínas de membrana e inibição das propriedades funcionais da parede celular (YOUSEFI; KHORSHIDIAN; HOSSEINI, 2020).

O óleo essencial de cravo destrói a parede celular e membrana, levando a perda de compostos intracelulares vitais, causando a morte bacteriana. Além de permear a membrana citoplasmática ou entrar no interior das células inibindo a síntese de DNA e proteínas necessárias para o crescimento da bactéria (XU *et al.*, 2016). Filgueiras e Vanetti (2006) demonstraram uma efetividade do eugenol, principal componente do óleo essencial de cravo, na produção de listeriolisina O (LLO) por *L. monocytogenes*, já que em seus estudos o crescimento da bactéria na presença de eugenol resultou na inibição de 80 a 100% da produção de LLO. Martins (2016) avaliou a atividade antibacteriana do óleo essencial de cravo-da-índia

sobre *L. monocytogenes* ATCC 19117 e encontrou uma CMB de 0,3%, valor próximo ao encontrado neste trabalho.

Pereira *et al.* (2019) avaliaram a ação antimicrobiana dos óleos essenciais de alho e tomilho sobre *L. monocytogenes* ATCC 19117 e encontraram CMB igual a 3,0% e 0,5%, respectivamente, valores que corroboram com os encontrados neste trabalho. O principal composto do óleo essencial de alho, relacionado a sua atividade antimicrobiana é a alicina, que é altamente instável, reativa e sensível ao oxigênio, temperatura, compostos orgânicos e pH, o que causa sua rápida degradação e a produção de outros compostos organossulfurados estáveis (ROUF *et al.*, 2020). Já a atividade antimicrobiana do tomilho está relacionada a presença de compostos fenólicos como o timol e carvacrol (PEREIRA *et al.*, 2019).

Reis *et al.* (2020) avaliaram a ação antibacteriana dos óleos essenciais de orégano e tomilho sobre *L. monocytogenes* pelo teste de microdiluição e encontraram uma CMB de 2,7% para o óleo essencial de orégano e 2,5% para o óleo essencial de tomilho. A atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano pode ser atribuída a seus componentes isoméricos bioativos, carvacrol e timol (KACHUR; SUNTRES, 2020).

Dentre os componentes majoritários dos óleos essenciais o carvacrol, eugenol e timol se destacam por suas propriedades antimicrobianas. Seu caráter lipofílico faz com que eles interajam com a estrutura da membrana celular causando danos, aumentando sua permeabilidade e fluidez, perturbando as proteínas, inibindo a respiração e alterando os processos de transporte de íons. O carvacrol também é capaz de interromper processos essenciais na célula devido à queda do pH intracelular, levando a perda de ATP (PATEIRO *et al.*, 2021).

4.2 Ação bactericida das combinações de óleos essenciais

Os óleos essenciais de orégano, cravo, coentro e alho foram escolhidos para avaliação de suas ações antibacterianas de forma combinada, baseando-se no valor da CMB e nos possíveis impactos sensoriais ao ser adicionado no produto cárneo. Portanto, embora o óleo essencial de tomilho tenha apresentado CMB inferior à do óleo essencial do alho, outros estudos realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos demonstraram seu forte sabor residual quando aplicado em produto cárneo, levando a descaracterização sensorial do produto.

A partir do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foram gerados vinte e sete ensaios com diferentes concentrações dos óleos essenciais selecionados (TABELA 5) que foram testadas *in vitro* sobre *L. monocytogenes*.

Tabela 5 - Atividade antimicrobiana de diferentes combinações entre óleos essenciais sobre *L. monocytogenes*.

Ensaio	Óleos essenciais (%)				Crescimento
	Orégano	Coentro	Alho	Cravo	
1	0,05	0,05	0,14	0,01	-
2	0,05	0,05	0,14	0,03	-
3	0,05	0,05	0,41	0,01	-
4	0,05	0,05	0,41	0,03	-
5	0,05	0,16	0,14	0,01	-
6	0,05	0,16	0,14	0,03	-
7	0,05	0,16	0,41	0,01	-
8	0,05	0,16	0,41	0,03	-
9	0,16	0,05	0,14	0,01	-
10	0,16	0,05	0,14	0,03	-
11	0,16	0,05	0,41	0,01	-
12	0,16	0,05	0,41	0,03	-
13	0,16	0,16	0,14	0,01	-
14	0,16	0,16	0,14	0,03	-
15	0,16	0,16	0,41	0,01	-
16	0,16	0,16	0,41	0,03	-
17	0	0,105	0,275	0,02	-
18	0,215	0,105	0,275	0,02	-
19	0,105	0	0,275	0,02	-
20	0,105	0,215	0,275	0,02	-
21	0,105	0,105	0	0,02	-
22	0,105	0,105	0,545	0,02	-
23	0,105	0,105	0,275	0	-
24	0,105	0,105	0,275	0,04	-
25	0,105	0,105	0,275	0,02	-
26	0,105	0,105	0,275	0,02	-
27	0,105	0,105	0,275	0,02	-

Legenda: (-) ausência de crescimento visível em placas.

Fonte: Da autora (2021).

Todas as combinações testadas foram capazes de inibir o crescimento de *L. monocytogenes in vitro*, o que demonstra que a ação combinada entre diferentes concentrações dos óleos essenciais, inferiores a CMB, foi eficaz para inibir o crescimento microbiano, comprovando que houve boa interação entre os óleos.

A combinação entre dois óleos pode proporcionar aumento considerável da atividade antimicrobiana em comparação com os óleos separados (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Quando o efeito entre as combinações dos compostos é significativamente maior do que a soma entre os efeitos individuais, considera-se que houve sinergismo, se o efeito for igual denomina-se efeito aditivo. Já o antagonismo, ocorre quando o valor de um ou ambos compostos é significativamente maior do que o de suas misturas (BASSOLÉ; JULIANI, 2012; BURT, 2004;

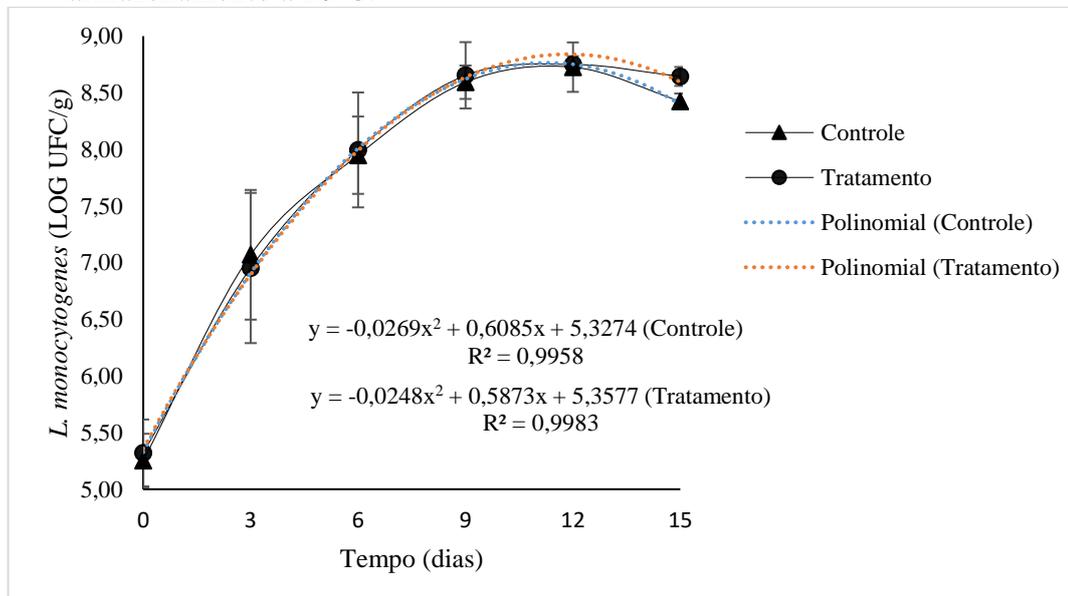
SEMENIUC *et al.*, 2017). Portanto, neste estudo pode-se considerar que ocorreu ação sinérgica ou aditiva entre os óleos essenciais testados.

Como todas as combinações testadas se mostraram efetivas na inibição de *L. monocytogenes in vitro*, o ensaio 10 (0,16% de OE de orégano + 0,05% de OE de coentro + 0,14% de OE de alho + 0,03% de óleo essencial de cravo) foi escolhido para ser aplicado nas salsichas. Já que concentrações muito baixas dos óleos essenciais podem ser ineficientes, devido interferências da matriz alimentar sobre a ação dos óleos e concentrações muito altas podem causar alterações sensoriais indesejáveis no produto cárneo.

4.3 Atividade antimicrobiana da emulsão de óleos essenciais em salsichas

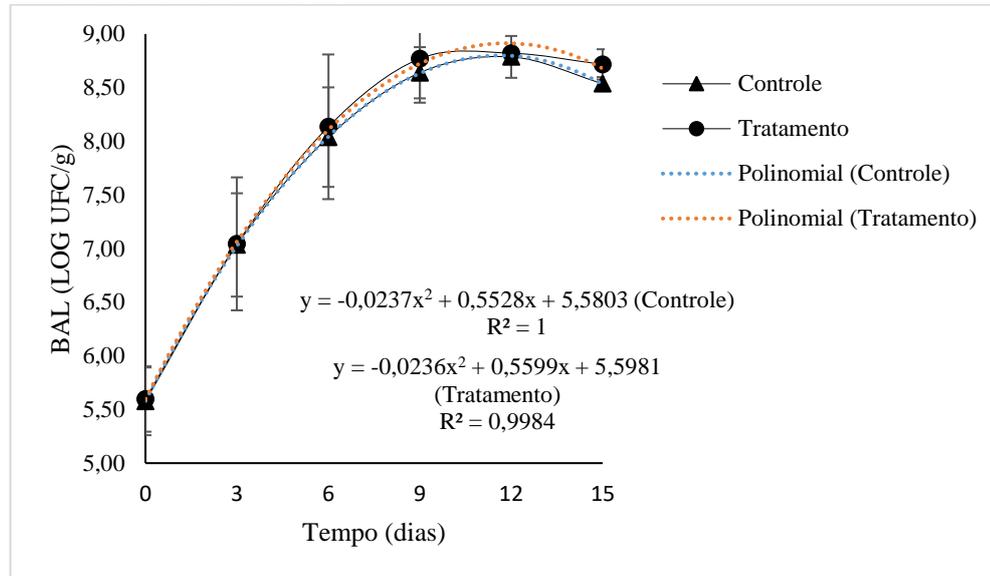
O tempo de armazenamento afetou significativamente ($P < 0,05$) o número de células vegetativas de *L. monocytogenes* e bactérias lácticas. No entanto, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos, nem ocorreu interação significativa ($P > 0,05$) entre os dois parâmetros (tratamento x tempo). Portanto, a partir dos dados obtidos, realizou-se uma análise de regressão representada nas Figuras 9 e 10.

Figura 9 - Crescimento de *L. monocytogenes* inoculada em salsicha ao longo de 15 dias de armazenamento a 10°C.



Fonte: Da autora (2021).

Figura 10 - Crescimento de bactérias ácido láticas (BAL) em salsicha ao longo de 15 dias de armazenamento a 10°C.



Fonte: Da autora (2021).

É possível perceber que tanto o controle (150 mg/kg de nitrito) quanto o tratamento com emulsão de óleos essenciais não inibiram completamente o crescimento de ambas as bactérias, que cresceram durante o armazenamento.

A velocidade específica de crescimento de *L. monocytogenes* e bactérias láticas ao longo dos 15 dias de armazenamento são descritas na Tabela 6.

Tabela 6 - Taxa de crescimento de *L. monocytogenes* e bactérias láticas em salsicha durante 15 dias de armazenamento.

Amostras	Velocidade específica de crescimento (μd^{-1})	
	<i>L. monocytogenes</i>	Bactérias láticas
Controle (150 mg/kg nitrito)	0,49	0,45
Tratamento (óleos essenciais)	0,52	0,48

Fonte: Da autora (2021).

Embora a combinação de óleos essenciais utilizada tenha se mostrado eficiente no controle de *L. monocytogenes in vitro* inibindo completamente seu crescimento, a mesma apresentou efeito reduzido quando adicionada à formulação das salsichas, devido a possível interferência da composição da matriz alimentar sobre a ação dos óleos essenciais. Além disso, a emulsão de óleos essenciais foi adicionada à massa do produto, e o microrganismo foi inoculado na superfície, sendo esse outro fator que pode ter dificultado sua ação antimicrobiana. No entanto, é possível perceber crescimento semelhante de *L. monocytogenes* para ambos tratamentos, mostrando que a emulsão de óleos essenciais utilizada apresentou ação

antimicrobiana semelhante a do nitrito para o controle do microrganismo em salsichas, podendo ser um possível substituinte desse conservante.

O crescimento de bactérias lácticas no controle já era esperado, pois o nitrito não tem ação sobre esse grupo de bactérias, que se desenvolve bem em sua presença. No entanto, a emulsão de óleos essenciais também não foi capaz de inibir seu desenvolvimento, sendo observado crescimento acentuado durante os primeiros nove dias de armazenamento. Bactérias lácticas são bem resistentes a fatores estressantes, isso explica seu difícil controle (TAKAHASHI *et al.*, 2021).

Alguns trabalhos também têm demonstrado essa interferência da matriz alimentar na ação dos óleos essenciais. Gill *et al.* (2002) observaram bom efeito antimicrobiano do óleo essencial de coentro testado *in vitro* sobre *L. monocytogenes*. No entanto, ao ser aplicado em presunto embalado à vácuo, houve redução significativa na eficácia do óleo essencial. Shekarforoush *et al.* (2015) relataram que o óleo essencial de orégano não apresentou efeito inibitório quando aplicado em carne de frango armazenada a 8°C, apesar de ter sido eficiente quando testado *in vitro*.

A aplicação de óleo essencial de plantas em sistemas alimentares para controle de patógenos e microrganismos deteriorantes, depende de diversos aspectos como a interferência nas propriedades sensoriais, avaliação de suas atividades contra os microrganismos de interesse para determinado produto e dos efeitos da composição dos alimentos na atividade dos óleos (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008).

A ação dos óleos essenciais em sistemas alimentares como carnes e seus derivados podem ser significativamente reduzidas devido à presença de sais, proteínas, gorduras e carboidratos. A interação dos compostos fenólicos dos óleos essenciais com as proteínas do alimento e de seus constituintes hidrofóbicos com a gordura limitam sua disponibilidade de interação com o microrganismo alvo, reduzindo sua atividade antimicrobiana. A absorção do agente microbiano, pela fração lipídica do alimento, reduz sua concentração na fase aquosa, interferindo em sua ação antimicrobiana (BURT, 2004). Além disso, a maior disponibilidade de nutrientes nos alimentos quando comparados aos meios de cultura laboratoriais, também pode contribuir para a reparação mais rápida das células bacterianas danificadas, que sofreram algum tipo de injúria ou estresse pela ação dos óleos essenciais (GILL *et al.*, 2002).

No entanto, apesar da interferência causada pela composição da matriz alimentar, diversos estudos têm demonstrado a eficácia da utilização de óleos essenciais para o controle de microrganismos patogênicos e deterioradores em produtos cárneos. Badia *et al.* (2020) avaliaram a influência de diferentes concentrações dos óleos essenciais de orégano e alecrim

no crescimento de bactérias lácticas em linguiça Toscana refrigerada e embalada a vácuo e demonstraram que todos os tratamentos foram capazes de retardar o crescimento da bactéria e aumentar a vida útil das linguiças. Ghabraie *et al.* (2016) testaram a mistura dos óleos essenciais de canela chinesa e canela em duas concentrações (0,025% e 0,05%) em combinação com nitrito (100 mg/kg), sais de ácidos orgânicos (1,55%) e nisina (12,5%) para controle de *L. monocytogenes* em um modelo de salsicha e observaram a redução de 1,5 ou 2,6 log UFC/g do microrganismo no sétimo dia de armazenamento em comparação ao controle. Também foi realizada análise sensorial que demonstrou que as formulações antimicrobianas utilizadas foram sensorialmente aceitas.

Portanto, estudos demonstram que os óleos essenciais são uma possível alternativa para a substituição de conservantes atualmente utilizados em alimentos. Mesmo que nesse estudo a combinação escolhida não tenha apresentado efeito antimicrobiano tão eficiente quando adicionada em salsichas. Entretanto, deve-se ressaltar que sua ação sobre *L. monocytogenes* foi semelhante a do nitrito no controle. No entanto, é necessário a realização de outros experimentos para testar a aplicação das demais combinações que foram eficientes nos ensaios *in vitro* e que possam ser mais eficientes na redução dos microrganismos quando adicionadas ao produto cárneo.

4.4 Análises tecnológicas

4.4.1 Composição centesimal da CMS de frango

A composição centesimal da CMS de frango utilizada para elaboração das salsichas pode ser observada na Tabela 7.

Tabela 7 - Porcentagem média e desvio padrão da composição centesimal da CMS de frango.

Composição centesimal (%)	CMS de frango
Proteína	13,09 ± 0,51
Extrato etéreo	12,63 ± 0,11
Umidade	69,22 ± 0,62

Fonte: Da autora (2021).

A Instrução Normativa (IN) n° 22, de 28 de abril de 2020, que aprova os “Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha” determina o teor máximo de 30% de lipídeos e o mínimo de 12% de

proteína em carnes mecanicamente separadas (BRASIL, 2020). Desse modo, a CMS de frango obtida neste trabalho está em concordância com a legislação.

4.4.2 Atividade de água e pH

Os valores médios de atividade de água (A_w) do tratamento controle e tratamento com óleos essenciais emulsionados no período de armazenamento (15 dias) sob refrigeração encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores médios de atividade de água (A_w) do tratamento controle e com adição de misturas de óleos essenciais das salsichas, mantidas refrigeradas (10°C) por 15 dias.

Tratamentos	(A_w)
Controle	0,923 a
Tratamento	0,922 a

Controle: adição 150 mg/kg de nitrito de sódio; Tratamento: emulsão de óleos essenciais. Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste (t) student ao nível de 5% de significância. Fonte: Da autora (2021).

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre valores de atividade de água das salsichas controle e tratadas com óleos essenciais, que se mantiveram constantes durante os 15 dias de armazenamento, não havendo alteração significativa dos valores ($p > 0,05$). Portanto, a adição de óleos essenciais no produto não teve nenhuma interferência com relação a esse parâmetro.

A atividade de água é um dos fatores intrínsecos dos alimentos e medida qualitativa que permite avaliar a disponibilidade de água susceptível a diversas reações químicas, físicas ou biológicas, se tornando responsável pela deterioração dos alimentos. O limite máximo de água disponível para o desenvolvimento microbiano é condicionado pela atividade de água do alimento. Alta atividade de água é responsável pelo crescimento de microrganismos indesejáveis, produtores de toxinas ou outras substâncias nocivas, sendo o limite mais baixo de atividade de água para o crescimento de microrganismos nos alimentos em torno de 0,60 (GARCIA, 2004; SANDULACHI, 2012).

Ao avaliar a o efeito sinérgico do óleo essencial de cravo da índia e quitosana sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 inoculada em mortadela com redução de nitrito, Martins (2016) observou que a A_w variou ao longo do tempo de 0,931 a 0,955, sendo esses valores favoráveis ao crescimento de diversos microrganismos, como a *L. monocytogenes* que cresce em A_w superior a 0,90.

A alta atividade de água em salsichas está relacionada a sua composição, pois a adição de alto teor de carne mecanicamente separada e polifosfatos resulta num produto com maior suculência, maciez e maior conteúdo de água (MARTINS *et al.*, 2011).

A média de atividade de água encontrada neste trabalho foi de 0,92, valor considerado baixo para salsichas, mas ainda assim dentro da faixa ideal de crescimento de *L. monocytogenes*, não sendo este fator limitante para o seu desenvolvimento e o de bactérias ácido lácticas no produto.

O pH, assim como a atividade de água é um fator intrínseco do produto que tem interferência no crescimento e reprodução de microrganismos. Portanto, seu controle é importante para evitar o crescimento de patógenos e a deterioração microbiana dos alimentos (ZHOU *et al.*, 2021).

Houve uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos aplicados nas salsichas, sendo que a adição de óleos essenciais contribuiu para um aumento no valor de pH dos produtos (TABELA 9).

Tabela 9 - Valores médios de pH para as salsichas adicionadas de nitrito e das emulsões de óleos essenciais armazenadas por 15 dias a 10°C.

Tratamentos	pH*
Tratamento	6,43 a
Controle	6,40 b

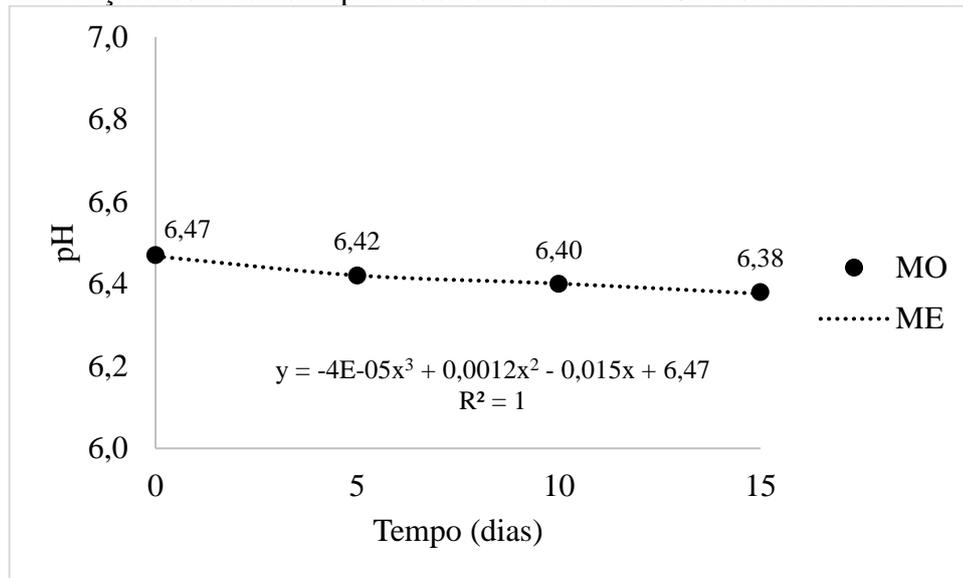
Controle: adição 150 mg/kg de nitrito de sódio; Tratamento: emulsão de óleos essenciais.

*Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si a 5% de significância pelo teste t de Student.

Fonte: Da autora (2021).

Também foi observada uma influência significativa ($P < 0,05$) do tempo de armazenamento nos valores de pH, que causou a redução desse parâmetro durante os 15 dias de armazenamento (FIGURA 11).

Figura 11 - Variação dos valores de pH das salsichas durante 15 dias de armazenamento a 10°C.



Legenda: MO - médias observadas e ME - médias estimadas.

Fonte: Da autora (2021)

Assim como neste trabalho, Pinelli *et al.* (2021) adicionaram combinações de óleos essenciais emulsionadas e nanoemulsionadas em mortadelas com redução de nitrito (75 ppm) para o controle de *Clostridium sporogenes* e observaram a redução do pH durante o armazenamento. Sharma *et al.* (2017) avaliaram salsichas de frango adicionadas de diferentes concentrações dos óleos essenciais de cravo, manjericão e canela e também perceberam que houve redução do pH de todos os tratamentos durante os 45 dias de armazenamento.

Essa redução de pH pode estar relacionada à presença de bactérias lácticas, já que esses microrganismos se desenvolvem bem em produtos cárneos embalados a vácuo e mantidos sobre refrigeração e, como resultado de seu metabolismo, podem causar a acidificação do produto (TAKAHASHI *et al.*, 2021), sendo este um fator limitante para o crescimento de patógenos.

Cada microrganismo possui uma faixa de pH dentro da qual seu crescimento é possível e um valor de pH ótimo, no qual ocorre seu melhor crescimento. A maioria das bactérias se desenvolvem melhor em uma faixa de pH próxima a neutralidade (6,5-7,5). No entanto, existem bactérias capazes de crescer em valores de pH mais baixos e sobreviver em ambientes ácidos (MADIGAN *et al.*, 2016). *L. monocytogenes* é capaz de se desenvolver em condições adversas como amplas faixas de pH (4,1-9,6) (JAY, 2005). Neste trabalho, a variação de pH (6,47-6,38) observada durante os 15 dias de armazenamento (10°C) das salsichas foi pequena e se encaixa na faixa ótima de crescimento de *L. monocytogenes*, não sendo, portanto, fator limitante, contribuindo assim para o seu desenvolvimento e multiplicação no produto.

4.4.3 Oxidação lipídica

Houve uma interação significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos e os dias de armazenamento. Os valores de TBARS das salsichas, ao longo de 15 dias de armazenamento, em mg de malonaldeído/kg de produto, estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores médios do índice TBARS (mg de malonaldeído/kg de produto) encontrados para os tratamentos avaliados durante 15 dias de armazenamento a 10°C.

Tratamentos	Tempos de estocagem (dias)			
	0	5*	10*	15*
Controle	0,69 a	0,77b	0,82 b	0,87 b
Tratamento	0,70 a	0,79 a	0,85 a	1,06 a

Controle: adição 150 mg/kg de nitrito de sódio; Tratamento: emulsão de óleos essenciais.

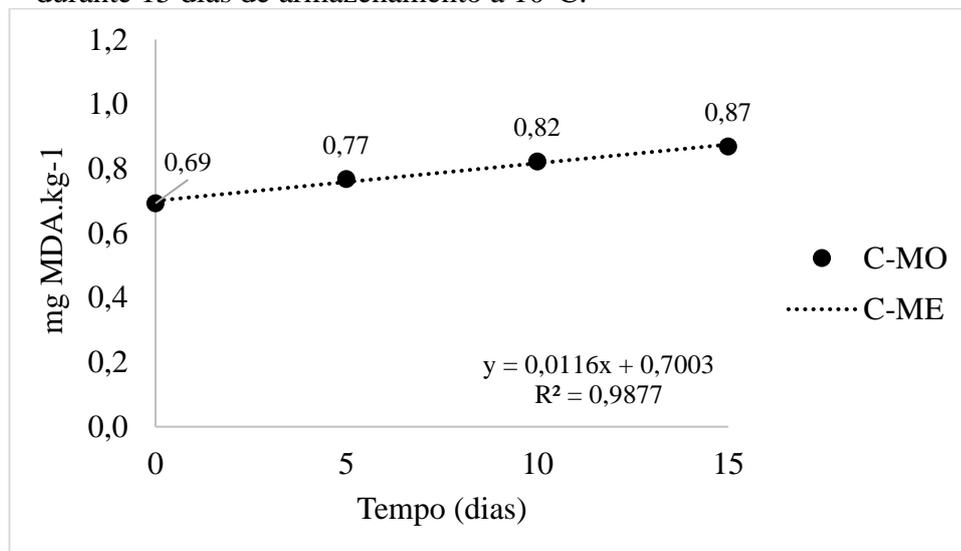
*Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si a 5% de significância pelo teste t de Student.

Fonte: Da autora (2021).

Dentre os tratamentos avaliados durante o período de análise (15 dias), observa-se que o tratamento controle apresentou os menores índices de oxidação lipídica (valores de TBARS) para todos os tempos analisados, diferenciando-se estatisticamente ($P < 0,05$) do tratamento contendo os óleos essenciais emulsionados, a partir do 5º dia de análise.

A variação da concentração de malonaldeído (mg MDA/Kg de produto) ao longo do tempo da estocagem das salsichas pode ser observada na Figuras 12 e 13.

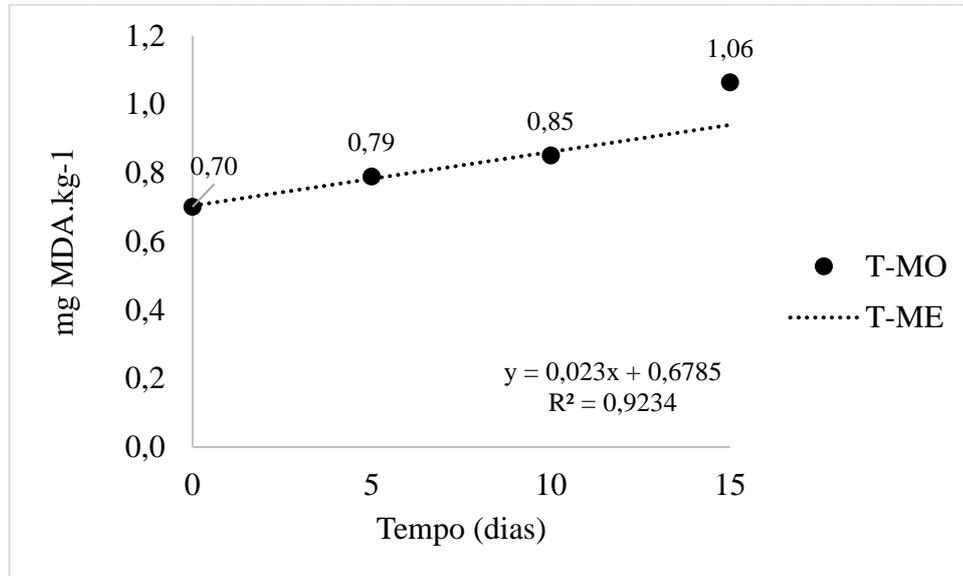
Figura 12 - Variação da concentração de malonaldeído para as amostras controle de salsicha durante 15 dias de armazenamento a 10°C.



Legenda: Tratamento controle (C-MO médias observadas) e (C-ME médias estimadas).

Fonte: Da autora (2021).

Figura 13 - Variação da concentração de malonaldeído para as amostras de salsicha adicionadas de óleos essenciais emulsionados durante 15 dias de armazenamento a 10°C.



Legenda: Tratamento com óleos essenciais - (T-MO médias observadas) e (T-ME médias estimadas).
Fonte: Da autora (2021).

Para ambos os tratamentos avaliados, observa-se o aumento dos valores de TBARS ao longo do período de análise. No entanto, não houve variação muito grande entre esses valores, que podem ser considerados baixos, no tratamento com nitrito. Enquanto no tratamento com óleos essenciais, houve aumento mais expressivo nos valores de TBARS no 15º dia de armazenamento, indicado que o nitrito foi mais efetivo em retardar e controlar a oxidação lipídica das salsichas do que a emulsão de óleos essenciais.

Além dos tratamentos utilizados, a embalagem a vácuo (ausência de oxigênio) e o uso de eritorbato de sódio (ação antioxidante) na formulação, associadas ao armazenamento refrigerado, são fatores que também podem contribuir para o controle da oxidação lipídica nesses produtos.

A oxidação lipídica em produtos cárneos representa uma das maiores preocupações para a indústria alimentícia, uma vez que é considerada uma das principais causas de deterioração nesse tipo de produto, afetando suas propriedades sensoriais, como cor, textura, sabor e aroma, além de seu valor nutricional e, conseqüentemente, reduzindo sua vida útil (AMARAL; DA SILVA; LANNES, 2018). Logo, a oxidação lipídica é de suma importância para se avaliar a qualidade do produto cárneo elaborado.

A análise do Índice de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) é o método espectrofotométrico mais comumente utilizado para quantificar a oxidação lipídica em produtos cárneos, principalmente devido a sua simplicidade e baixo custo. Nesse teste, quantifica-se o malonaldeído, um produto secundário da oxidação lipídica, oriundo da

decomposição de hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados formados durante o processo oxidativo (PAPASTERGIADIS *et al.*, 2012).

Tanto os óleos essenciais quanto o nitrito de sódio apresentam efeitos antioxidantes comprovados. O nitrito de sódio atua contra a oxidação lipídica por diversos mecanismos: está associado à ligação do grupo heme e à prevenção da liberação do ferro catalítico; tem a capacidade de se ligar ao ferro heme e não-heme, inibindo a catálise, além de auxiliar na estabilização dos lipídios contra a oxidação (KARWOWSKA; KONONIUK; WÓJCIAK, 2019).

A ação antioxidante de óleos essenciais pode ser atribuída a seus componentes majoritários, bem como sua interação com componentes em menores quantidades. Portanto, eles podem agir na prevenção da iniciação da cadeia e da abstração contínua de hidrogênio, ligação de catalizadores de íons de metal de transição, ser eliminadores e terminadores de radicais livres e inibidores na formação de oxigênio singlete. Sendo essa atividade antioxidante relacionada principalmente ao seu conteúdo fenólico, como eugenol, timol e carvacrol que atuam como captadores de radicais livres e doadores de hidrogênio (JAYASENA; JO, 2013; TONGNUANCHAN; BEJAKUL, 2014). No entanto, alguns trabalhos têm relatado que os óleos essenciais quando adicionados em altas concentrações em matriz alimentar apresentam atividade pró-oxidante ou seja, podem contribuir para o aumento da oxidação lipídica (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2015; MARTINS, 2013).

4.4.4 Análise de cor objetiva

Os valores médios encontrados de luminosidade (L*), índice de tonalidade (h) e índice de saturação (C*) para o tratamento controle e com emulsão de óleos essenciais estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11 - Valores médios do índice de luminosidade (L*), índice de tonalidade (h) e índice de saturação (C*) do tratamento controle e com óleos essenciais das salsichas ao longo de 15 dias de armazenamento a 10°C.

Tratamentos	Índice de luminosidade (L*)	Índice de tonalidade (h, graus)	Índice de saturação (C*)
Controle	58,812 a	52,788 b	13,525 b
Tratamento	59,483 a	81,675 a	16,646 a

Controle: adição 150 mg/kg de nitrito de sódio; Tratamento: emulsão de óleos essenciais.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo teste (t) student ao nível de 5% de significância.

Fonte: Da autora (2021).

A luminosidade (L^*) é o parâmetro que caracteriza o grau de claridade da cor, podendo variar de preto ao branco, indo de 0 (escuro) a 100 (claro) (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos para os valores de L^* (TABELA 11), o que indica que a retirada do nitrito e adição dos óleos essenciais emulsionados não interferiu na luminosidade do produto. Também não foi possível perceber uma interferência significativa ($P>0,05$) dos dias de armazenamento sobre a luminosidade da amostra.

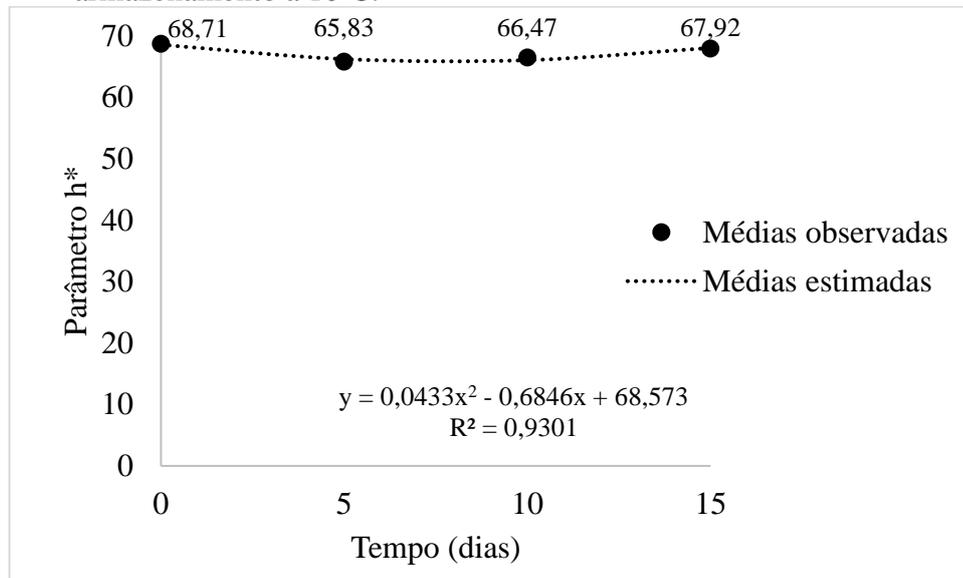
Khorsandi *et al.* (2019) observaram em seu trabalho, que não houve alteração significativa nos valores de L^* de salsichas sem nitrito, tratadas com diferentes concentrações de óleo essencial de canela, nisina e EDTA, durante o armazenamento por 42 dias a 10°C. Pinelli *et al.* (2021) verificaram que os tratamentos com combinações de óleos essenciais e o controle influenciaram de maneira semelhante nos valores de L^* das mortadelas com redução de nitrito de sódio, que permaneceram com a mesma claridade durante os 30 dias de armazenamento. Dias (2015) também não observou diferença significativa do controle e dos tratamentos com combinações de óleos essenciais nos valores de L^* de mortadelas com redução de nitrito de sódio durante 15 dias de armazenamento.

Um outro índice utilizado para a caracterização da cor é o ângulo *hue* (h) ou ângulo de tonalidade, que é representado pela grandeza utilizada para caracterizar a qualidade da cor (vermelho, verde, amarelo, azul), permitindo sua diferenciação (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Houve uma diferença ($P<0,05$) entre os tratamentos, sendo que o tratamento isento de nitrito e com adição dos óleos essenciais emulsionados contribuiu para o aumento de h quando comparado ao controle. Os maiores valores encontrados para as salsichas tratadas com óleos essenciais indicam uma maior tendência para uma cor de tonalidade amarronzada ou amarelada.

As análises estatísticas também demonstraram que os dias de armazenamento influenciaram significativamente ($P<0,05$) no índice de tonalidade. A variação do índice de tonalidade (h) das salsichas com relação ao tempo de armazenamento pode ser observada na Figura 14.

Figura 14 - Variação do índice tonalidade (h) das salsichas ao longo de 15 dias de armazenamento a 10°C.



Fonte: Da autora (2021).

A partir do 5º dia, percebe-se um pequeno aumento de h ao longo do tempo de armazenamento, o que indica um processo de descoloração, ou seja, uma redução da cor vermelha dos produtos e uma maior participação da tonalidade amarela.

Abreu Martins (2016) também observou um aumento significativo nos valores de h das amostras de fiambre de peito de frango com redução de nitrito e adicionado de diferentes concentrações de óleos essenciais, durante 30 dias de armazenamento a 14°C.

O índice de saturação (C*) é utilizado para determinar a intensidade da cor, sendo obtido a partir dos parâmetros a* (índice de vermelho) e b* (índice de amarelo). Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos para os valores de C*, sendo que o tratamento isento de nitrito e com adição dos óleos essenciais emulsionados apresentou maiores valores quando comparado ao controle. Altos valores de C* indicam cores saturadas e baixos valores indicam cores pálidas ou acinzentadas (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Neste trabalho foi observada uma diferença significativa com relação a cor do produto, que foi influenciada principalmente pelo fato de não ter sido adicionado nitrito de sódio na formulação das salsichas tratadas com emulsão de óleos essenciais. Portanto, estas não apresentaram a coloração rósea característica de produtos curados e sim uma coloração marrom (FIGURA 15). No entanto, essa diferença em relação a cor já era esperada e caso seja necessário pode ser corrigida pela adição de corantes na formulação do produto.

Figura 15 - Diferença de cor observada entre as salsichas elaboradas com 150 mg/kg de nitrito e com emulsão de óleos essenciais.



Fonte: Da autora (2021)

5 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de orégano, coentro, alho e cravo apresentaram ação antimicrobiana de forma isolada e combinada, quando testados *in vitro* sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 19117. No entanto, quando aplicada em salsicha, a emulsão de óleos essenciais não foi tão eficiente na inibição do crescimento de *L. monocytogenes* e bactérias lácticas.

A emulsão de óleos essenciais não alterou a atividade de água dos produtos, mas contribuiu para um pequeno aumento do pH. Já o tratamento com nitrito foi mais efetivo no controle da oxidação lipídica, mantendo valores de oxidação mais baixos. Por fim, houve uma diferença significativa na cor das salsichas, que já era esperada, devido à ausência de nitrito em um dos tratamentos.

Apesar da emulsão de óleos essenciais utilizada não ter inibido completamente o crescimento de *L. monocytogenes* e bactérias lácticas em salsicha, sua ação antimicrobiana foi similar à do nitrito, indicando que os óleos essenciais são uma possível alternativa de substituição ao nitrito de sódio para o controle de *L. monocytogenes* em produtos cárneos.

No entanto, com intuito de encontrar uma combinação que seja mais eficiente, sugere-se a realização de mais testes para aplicação das demais combinações de óleos essenciais, de forma emulsionada e nanoemulsionada, pois sabe-se que as nanoemulsões são capazes de potencializar o efeito dos óleos essenciais e reduzir sua interferência sensorial em alimentos, além da aplicação dos óleos essenciais na superfície do produto como uma forma de potencializar sua ação.

REFERÊNCIAS

- ABREU MARTINS, H. H. de A. **Sinergismo antimicrobiano de óleos essenciais e nitrito sobre *Clostridium sporogenes* inoculado em fiambre de peito de frango**. 2016. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- ALAMED, J. *et al.* Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [Washington], v. 57, n. 7, p. 2969-2976, Mar. 2009. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf803436c>. Acesso em: 15 fev. 2020.
- ALEIXO, G. C. **Efeito de óleos essenciais e compostos majoritários sobre endósporos de *Clostridium botulinum* inoculados em mortadela**. 2014. 58 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- ALEKSEEVA, M. *et al.* *Origanum vulgare* L. - a review on genetic diversity, cultivation, biological activities and perspectives for molecular breeding. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, [Bulgaria], v. 26, n. 6, p. 1183-1197, Fev. 2021. Disponível em: https://journal.agrojournal.org/page/en/details.php?article_id=3207. Acesso em: 12 jun. 2021.
- AMARAL, A. B.; DA SILVA, M. V. D.; LANNES, S. C. da S. Lipid oxidation in meat: mechanisms and protective factors—a review. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 38, n. 1, p. 1-15, Dec. 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/3ZDMTNLBZ63pGz3DgsbyS7h/?lang=en>. Acesso em: 26 jul. 2021.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. 18 th. Washington: Association of Analytical Communities, 2012. 570 p.
- ARCILA-LOZANO, C. C. *et al.* Oregano: Properties, composition and biological activity. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, [Caracas], v. 54, n. 1, p. 100-111, Mar. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15332363/>. Acesso em: 19 abr. 2020.
- BADIA, V. *et al.* Effect of the addition of antimicrobial oregano (*Origanum vulgare*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on lactic acid bacteria growth in refrigerated vacuum-packed Tuscan sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, [São Paulo], v. 51, n. 1, p. 289-301, Mar. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31463868/>. Acesso em: 19 jul. 2021.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, [Oxford], v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691507004541>. Acesso em: 19 jan. 2021.
- BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, [Basel], v. 17, n. 4, p. 3989-4006, Apr. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22469594/>. Acesso em: 23 jul. 2021.

BHARGAVA, K. *et al.* Application of oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. **Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 47, p. 69-73, May 2015. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002014002676>. Acesso em: 19 jan. 2021.

BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis**. 1st ed. New York: Springer Science Business, 2008. 276 p.

BISEN, P. S.; EMERALD, M. Nutritional and therapeutic potential of garlic and onion (*Allium* sp.). **Current Nutrition & Food Science**, [United Arab Emirates], v. 12, n. 3, p. 190-199, June 2016. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/143128/article>. Acesso em: 19 jul. 2021.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 4, 31 de março de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade de salsicha. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2000. Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **RTIQ - Cárneos e seus derivados**. Instrução Normativa SDA nº 22, de 28 de abril de 2020 - Alteração do anexo I da Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000 - Carne Mecanicamente Separada (CMS). Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2020.

BUCHANAN, R. L. *et al.* A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, [Oxford], v. 75, p. 1-13, May 2017. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516306892>. Acesso em: 19 mar. 2020.

BUCHANAN, R. L.; PHILLIPS, J. G. Response surface model for predicting the effects of temperature pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 53, n. 5, p. 370-376, May 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31018296/>. Acesso em: 25 ago. 2021.

BUCUR, F. I. *et al.* Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments. **Frontiers in Microbiology**, [Switzerland], v. 9, Nov. 2018. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02700/full>. Acesso em: 21 abr. 2020.

BURDOCK, G. A.; CARABIN, I. G. Safety assessment of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil as a food ingredient. **Food and Chemical Toxicology**, [Oxford], v. 47, n. 1, p. 22-34, Jan. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19032971/>. Acesso em: 22 maio 2020.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15246235/>. Acesso em: 12 jun. 2020.

CAMARGO, S. B.; VASCONCELOS, D. F. S. Biological activities of Linalool: current concepts and future possibilities of this monoterpene. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 13, p. 381-387, set./dez. 2014. Disponível em: <https://cienciasmedicasbiologicas.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/12949>. Acesso em: 15 jul. 2020.

CHAIIEB, K. *et al.* The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. myrtaceae): A short review. **Phytotherapy Research**, [Chichester], v. 21, n. 6, p. 501-506, June 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17380552/>. Acesso em: 19 ago. 2020.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 533 p.

CHOI, M.-K. *et al.* Antimicrobial activity of chemical substances derived from S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide (alliin) in garlic, *Allium sativum* L. **Food Science and Biotechnology**, [New York], v. 16, n. 1, p. 1-7, Feb. 2007. Disponível em: <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200735822364418.page>. Acesso em: 22 set. 2020.

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

DE ÁVILA, A. R. A. *et al.* Sensitivity to organic acids in vitro and in situ of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from fresh pork sausages. **Journal of Food Quality**, [Malden], v. 36, n. 3, 155-163, Apr. 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jfq.12026>. Acesso em: 17 ago. 2021.

DELAQUIS, P. J.; STANICH, K. Antilisterial properties of cilantro essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, [United States], v. 16, n. 5, p. 409-414, Sept./Oct. 2004. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2004.9698757>. Acesso em: 19 jul. 2021.

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

DE OLIVEIRA, T. L. C. *et al.* Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 144, n. 3, p. 546-555, Jan. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510006525>. Acesso em: 12 out. 2020.

DE OLIVEIRA, T. L. C. *et al.* Antioxidant effects of *Satureja montana* L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **LWT-Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 45, n. 2, p. 204-212, Mar. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643811002933>. Acesso em: 11 nov. 2020.

DE OLIVEIRA, T. L. C. *et al.* Inhibitory activity of *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Essential oils against *Listeria monocytogenes* inoculated in bovine ground meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, [São Paulo], v. 44, n. 2, p. 357-365, Aug. 2013. Disponível em: <https://www.readcube.com/articles/10.1590%2Fs1517-83822013005000040>. Acesso em: 18 ago. 2021.

DE OLIVEIRA, T. L. C. *et al.* Phenolic carvacrol as a natural additive to improve the preservative effects of high pressure processing of low-sodium sliced vacuum-packed turkey breast ham. **LWT-Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 64, n. 2, p. 1297-1308, Dec. 2015. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201600252372>. Acesso em: 19 ago. 2021.

DE OLIVEIRA, T. L. C.; SOARES, R. A.; PICCOLI, R. H. A *Weibull* model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. **Meat Science**, [Oxford], v. 93, n. 3, p. 645-651, Mar. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174012003658>. Acesso em: 18 ago. 2021.

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

DIAS, N. A. A. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils on *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella. **International Journal of Food Safety**, [Malden], v. 35, n. 4, p. 466-472, Nov. 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfs.12196>. Acesso em: 19 dez. 2020.

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

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, [Amsterdam], v. 233, p. 106-120, Sept. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168165616313955>. Acesso em: 24 jul. 2021.

DOULGERAKI, A. I. *et al.* Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 157, n. 2, p. 130-141, July 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22682877/>. Acesso em: 21 jan. 2021.

- DUFFY, L. L.; VANDERLINDE, P. B.; GRAU, F. H. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, aw, nitrite and ascorbate. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 23, n. 3-4, p. 377-390, Nov. 1994. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0168160594901643>. Acesso em: 25 ago. 2021.
- DUSSAULT, D.; VU, K. D.; LACROIX, M. Development of a model describing the inhibitory effect of selected preservatives on the growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. **Food Microbiology**, [London], v. 53, p. 115-121, Feb. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26678138/>. Acesso em: 22 ago. 2021.
- DUZE, S. T.; MARIMANI, M.; PATEL, M. Tolerance of *Listeria monocytogenes* to biocides used in food processing environments. **Food Microbiology**, [London], v. 97, Aug. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S074000202100023X>. Acesso em: 14 jul. 2021.
- EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants - a mini review. **Journal of Functional Foods**, [Netherlands], v. 18, p. 811-819, Oct. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615001127>. Acesso em: 19 mar. 2021.
- ESCOBAR, A. *et al.* Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. **Arabian Journal of Chemistry**, [Saudi Arabia], v. 13, n. 12, p. 9243-9269, Dec. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535220304561>. Acesso em: 22 abr. 2021.
- ESMAEILI, H. *et al.* Incorporation of nanoencapsulated garlic essential oil into edible films: A novel approach for extending shelf life of vacuum-packed sausages. **Meat Science**, [Oxford], v. 166, Aug. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0309174019309751>. Acesso em: 12 maio 2021.
- FDA - Food and Drug Administration. **Food status list**. Silver Spring: FDA, 2006.
- FILGUEIRAS, C. T.; VANETTI, M. C. D. Effect of eugenol on growth and listeriolysin o production by *Listeria monocytogenes*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 3, p. 405-409, May 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/babt/a/fFWDsdtJLgkmKG6xjntxtyQ/?lang=en>. Acesso em: 25 jul. 2021.
- GARCIA, D. M. **Análise de atividade de água em alimentos armazenados no interior de granjas de integração avícola**. 2004. 50 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- GHABRAIE, M. *et al.* Antilisterial effects of antibacterial formulations containing essential oils, nisin, nitrite and organic acid salts in a sausage model. **Journal of Food Science and Technology-Mysore**, [New Delhi], v. 53, n. 6, p. 2625-2633, June 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27478218/>. Acesso em: 23 jul. 2021.

GILL, A. O. *et al.* 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. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160501007127>. Acesso em: 24 jul. 2021.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374, abr. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/gn5mhqcFHSbXXgTKNLJTS9t/?lang=pt>. Acesso em: 14 jun. 2021.

GOMIDE, L. A. de M.; RAMOS, E. M.; FONTES, P. R. **Ciência e qualidade da carne: fundamentos**. Viçosa: Editora UFV, 2013. 197 p.

GONZALEZ-RIVERA, J. *et al.* In situ microwave assisted extraction of clove buds to isolate essential oil, polyphenols, and lignocellulosic compounds. **Industrial Crops and Products**, [Amsterdam], v. 161, Mar. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669020311201>. Acesso em: 13 abr. 2021.

GUERRA, F. Q. S. *et al.* Atividade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre cepas de *Acinetobacter* spp. multidrogas-resistentes. **Revista de Biologia e Farmácia**, São Carlos, v. 7, n. 1, p. 110, Dec. 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/337843890_ATIVIDADE_ANTIBACTERIANA_D_E_OLEOS_ESSENCIAIS_DE_ESPECIARIAS_SOBRE_CEPAS_DE_ACINETOBACTER_SPP_MULTIDROGAS-RESISTENTES. Acesso em: 11 fev. 2020.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, R. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 124, n. 1, p. 91-97, May 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18378032/>. Acesso em: 25 jul. 2021.

HASHEMI, S. M. B. *et al.* Effects of ultrasound treatment, UV irradiation and avishan-e-denaai essential oil on oxidative stability of sunflower oil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, [Dehradun], v. 18, n. 5, p. 1083-1092, Sept. 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2015.1039218>. Acesso em: 19 maio 2020.

HOLZAPFEL, W. H.; WOOD, B. J. **Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2014.

HORITA, C. N. *et al.* Combining reformulation, active packaging and non-thermal post-packaging decontamination technologies to increase the microbiological quality and safety of cooked ready-to-eat meat products. **Trends in Food Science & Technology**, [London], v. 72, p. 45-61, Feb. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224417305988>. Acesso em: 19 jul. 2021.

HÚNGARO, H. M. *et al.* Blown pack spoilage in vacuum-packaged meat: A review on clostridia as causative agents, sources, detection methods, contributing factors and mitigation strategies. **Trends in Food Science & Technology**, [London], v. 52, p. 123-138, June 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092422441530203X>. Acesso em: 15 abr. 2020.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, [Switzerland], v. 3, n. 12, Jan. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22291693/>. Acesso em: 19 maio 2020.

IAMARINO, L. Z. *et al.* Nitritos e nitratos em produtos cárneos enlatados e/ou embutidos. **Gestão em Foco**, [Curitiba], n. 7, p. 246-251, 2015. Disponível em: <https://docplayer.com.br/32629357-Nitritos-e-nitratos-em-produtos-carneos-enlatados-e-ou-embutidos.html>. Acesso em: 29 jun. 2020.

IDOWU, S. *et al.* Clove (*Syzygium aromaticum*) spices: a review on their bioactivities, current use, and potential application in dairy products. **Journal of Food Measurement and Characterization**, [United States], v. 15, p. 3419–3435, Apr. 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11694-021-00915-9>. Acesso em: 12 maio 2021.

INMANEE, P.; KAMONPATANA, P.; PIRAK, T. Ohmic heating effects on *Listeria monocytogenes* inactivation, and chemical, physical, and sensory characteristic alterations for vacuum packaged sausage during post pasteurization. **LWT-Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 108, p. 183-189, July 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643819302087>. Acesso em: 19 jul. 2021.

ISIDORO, S. R. **Ação de emulsões de óleos essenciais sobre endósporos de *Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes* em mortadela sem adição de nitrito**. 2021. 46 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2021.

JAYASENA, D. D.; JO, C. Potential application of essential oils as natural antioxidants in meat and meat products: a review. **Food Reviews International**, [Philadelphia], v. 30, n. 1, p. 71-90, Jan. 2014. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559129.2013.853776>. Acesso em: 27 jul. 2021.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JO, K. *et al.* Nitrite sources for cured meat products. **LWT-Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 129, July 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643820305727>. Acesso em: 22 dez. 2020.

JU, J. *et al.* Effects of tea polyphenol combined with nisin on the quality of weever (*Lateolabrax japonicus*) in the Initial stage of fresh-frozen or chilled storage state. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, [Binghamton], v. 26, n. 5, p. 543-552, Apr. 2017.

Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10498850.2016.1233472?journalCode=wafp20>

Acesso em: 29 nov. 2020.

JU, J. *et al.* The inhibitory effect of plant essential oils on foodborne pathogenic bacteria in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [Philadelphia], v. 59, n. 20, p. 3281-3292, Nov. 2019. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2018.1488159?journalCode=bfsn20>.

Acesso em: 15 fev. 2020.

KACHUR, K.; SUNTRES, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [Philadelphia], v. 60, n. 18, p. 3042-3053, Oct. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31617738/>. Acesso em: 19 dez. 2020.

KALAYCIOGLU, Z.; ERIM, F. B. Nitrate and nitrites in foods: worldwide regional distribution in view of their risks and benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [Washington], v. 67, n. 26, p. 7205-7222, July 2019. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31244197/>. Acesso em: 23 maio 2020.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, [United Arab Emirates], v. 10, n. 10, p. 813-829, May 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12678685/>. Acesso em: 19 jun. 2020.

KALLIPOLITIS, B.; GAHAN, C. G. M.; PIVETEAU, P. Factors contributing to *Listeria monocytogenes* transmission and impact on food safety. **Current Opinion in Food Science**, [Netherlands], v. 36, p. 9-17, Dec. 2020. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S221479932030076X>. Acesso em: 19 jan. 2021.

KARRE, L.; LOPEZ, K.; GETTY, K. J. K. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Science**, [Oxford], v. 94, n. 2, p. 220-227, June 2013. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23501254/>. Acesso em: 15 fev. 2021.

KARWOWSKA, M.; KONONIUK, A.; WÓJCIAK, K. M. Impact of sodium nitrite reduction on lipid oxidation and antioxidant properties of cooked meat products. **Antioxidants**, [Switzerland], v. 9, n. 1, p. 1-9, Dec. 2019. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31877777/>. Acesso em: 26 jul. 2021.

KAWACKA, I. *et al.* Natural plant-derived chemical compounds as *Listeria monocytogenes* inhibitors in vitro and in food model systems. **Pathogens**, [Switzerland], v. 10, n. 1, p. 12, Jan. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33375619/>. Acesso em: 15 fev. 2021.

- KHORSANDI, A. *et al.* Shelf-life extension of vacuum packed emulsion-type sausage using combination of natural antimicrobials. **Food Control**, [Oxford], v. 104, p. 139-146, Oct. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713519302014>. Acesso em: 27 jul. 2021.
- KING, A. M. *et al.* Modeling the impact of ingoing sodium nitrite, sodium ascorbate, and residual nitrite concentrations on growth parameters of *Listeria monocytogenes* in cooked, cured pork sausage. **Journal of Food Protection**, [Des Moines], v. 79, n. 2, p. 184-193, Feb. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26818978/>. Acesso em: 25 ago. 2021.
- LEYVA-LOPEZ, N. *et al.* Essential oils of oregano: biological activity beyond their antimicrobial properties. **Molecules**, [Basel], v. 22, n. 6, p. 989, June 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6152729/>. Acesso em: 19 fev. 2020.
- LIU, Q. Q. *et al.* Food-grade nanoemulsions: preparation, stability and application in encapsulation of bioactive compounds. **Molecules**, [Basel], v. 24, n. 23, p. 1-37, Dec 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6930561/>. Acesso em: 16 abr. 2020.
- MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1032 p.
- MANDAL, S.; MANDAL, M. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: Chemistry and biological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [Netherlands], v. 5, n. 6, p. 421-428, June 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169115000647>. Acesso em: 22 mar. 2020.
- MARCHESE, A. *et al.* Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical Reviews in Microbiology**, [New York], v. 43, n. 6, p. 668-689, Nov. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28346030/>. Acesso em: 16 maio 2020.
- MARCHESE, A. *et al.* Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 210, p. 402-414, Nov. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27211664/>. Acesso em: 15 abr. 2020.
- MARTINS, A. P. **Atividade antimicrobianos naturais sobre endósporos de *Clostridium perfringens* em mortadelas**. 2013. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- MARTINS, A. P. **Atividade bactericida de antimicrobianos naturais sobre *Listeria monocytogenes* inoculada em mortadela**. 2016. 163 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

- MARTINS, L. L. *et al.* Determinação de pH e atividade de água (Aa) e sua inter-relação com o perfil bacteriológico de salsichas tipo “hot dog” comercializadas nos municípios do Rio de Janeiro e Niterói–RJ. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, [Niterói], v. 18, n. 2-3, p. 92-96, maio/dez. 2011. Disponível em: <https://periodicos.uff.br/rbcv/article/view/6966/pdf>. Acesso em: 26 jul. 2021.
- MARTINS, N.; PETROPOULOS, S.; FERREIRA, I. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 211, p. 41-50, Nov. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27283605/>. Acesso em: 13 set. 2020.
- MATEREKE, L. T.; OKOH, A. I. *Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence: A review. **Pathogens**, [Switzerland], v. 9, n. 7, p. 528, June 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7400505/>. Acesso em: 15 out. 2020.
- MATLE, I.; MBATHA, K. R.; MADOROBA, E. A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, [South Africa], v. 87, n. 1, Oct. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7565150/>. Acesso em: 26 nov. 2020.
- MENEZES, N. M. C. *et al.* Modeling the effect of oregano essential oil on shelf-life extension of vacuum-packed cooked sliced ham. **Meat Science**, [Oxford], v. 139, p. 113-119, May 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0309174017308677>. Acesso em: 19 jul. 2021.
- MYERS, K. *et al.* Effects of high hydrostatic pressure and varying concentrations of sodium nitrite from traditional and vegetable-based sources on the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) sliced ham. **Meat Science**, [Oxford], v. 94, n. 1, p. 69-76, May 2013a. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0309174013000090>. Acesso em: 25 ago. 2021.
- MYERS, K. *et al.* The effect of high hydrostatic pressure, sodium nitrite and salt concentration on the growth of *Listeria monocytogenes* on RTE ham and turkey. **Meat Science**, [Oxford], v. 93, n. 2, p. 263-268, Feb. 2013b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23046896/>. Acesso em: 22 ago. 2021.
- NAJAFLOO, R. *et al.* A mini-review of Thymol incorporated materials: Applications in antibacterial wound dressing. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [Paris], v. 60, Dec. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S177322472031193X>. Acesso em: 15 fev. 2021.
- NAZZARO, F. *et al.* Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, [New York], v. 6, n. 12, p. 1451-1474, Dec. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3873673/>. Acesso em: 19 mar. 2021.

- ODEYEMI, O. A. *et al.* Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [Malden], v. 19, n. 2, p. 311-331, Mar. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12526>. Acesso em: 25 abr. 2021.
- OLIVEIRA, J. F. *et al.* Determinação espectrofotométrica de nitrito em produtos cárneos embutidos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, [Fortaleza], v. 11, n. 1, p. 19-31, jan./mar. 2017. Disponível em: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/377>. Acesso em: 14 ago. 2020.
- ORSI, R. H.; WIEDMANN, M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [New York], v. 100, n. 12, p. 5273-5287, June 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27129530/>. Acesso em: 19 set. 2020.
- PAPASTERGIADIS, A. *et al.* Malondialdehyde measurement in oxidized foods: evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [Washington], v. 60, n. 38, p. 9589-9594, Sept. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22950760/>. Acesso em: 26 jul. 2021.
- PATEIRO, M. *et al.* Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 337, p. 108966, Jan. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160520304608>. Acesso em: 26 jul. 2021.
- PATEIRO, M. *et al.* Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 113, p. 156-166, Nov. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996918305428>. Acesso em: 22 out. 2020.
- PEREIRA, I. *et al.* Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, [Amsterdam], v. 171, p. 566-578, Nov. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30098535/>. Acesso em: 18 dez. 2020.
- PEREIRA, L. A. S. *et al.* Antimicrobial zein coatings plasticized with garlic and thyme essential oils. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 1-14, Jan. 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjft/a/H4Prk3gHxcbnLcZk5LmKdsC/?lang=en>. Acesso em: 23 jul. 2021.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, [Tocantins], v. 3, n. 4, p. 146-152, nov. 2012. Disponível em: <https://www.todafruta.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Metab%C3%B3litos-secund%C3%A1rios-ARTIGO.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2020.

- PIKUL, J.; LESZCZYNSKI, D. E.; KUMMEROW, F. A. Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [Washington], v. 37, n. 5, p. 1309-1313, Sept. 1989. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00089a022>. Acesso em: 26 jul. 2021.
- PINELLI, J. J. *et al.* Essential oil nanoemulsions for the control of *Clostridium sporogenes* in cooked meat product: An alternative? **LWT-Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 143, May 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643821002760>. Acesso em: 19 jul. 2021.
- PINELLI, J. J. **Uso de nanoemulsões de óleos essenciais no controle de *Clostridium sporogenes* em mortadela**. 2018. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.
- POTHAKOS, V. *et al.* Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. **Meat Science**, [Oxford], v. 109, p. 66-74, Nov. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0309174015001114>. Acesso em: 22 jan. 2021.
- PRACHAYASITTIKUL, V.; PRACHAYASITTIKUL, S.; RUCHIRAWAT, S. Coriander (*Coriandrum sativum*): A promising functional food toward the well-being. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 105, p. 305-323, Mar. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29433220/>. Acesso em: 22 mar. 2020.
- PRAKASH, A. *et al.* Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 111, p. 509-523, Sept. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996918304356>. Acesso em: 24 jul. 2021.
- RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 599 p.
- RAO, J. J.; CHEN, B. C.; MCCLEMENTS, D. J. Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: mechanisms of action. **Annual Review of Food Science and Technology**, [United States], v. 10, n. 10, p. 365-387, Jan. 2019. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-food-032818-121727>. Acesso em: 15 abr. 2020.
- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, [Amsterdam], v. 62, p. 250-264, Dec. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669014005196>. Acesso em: 22 fev. 2020.
- REIS, J. B. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 342-363, Jan. 2020. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/6223>. Acesso em: 26 jul. 2021.

RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Art. 283, seção II, Produtos cárneos.** 2020a. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2020/10/RIISPOA-ALTERADO-E-ATUALIZADO-2020.pdf>. Acesso em: 19 jul. 2021.

RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Art. 300, seção II, Produtos cárneos.** 2020b. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2020/10/RIISPOA-ALTERADO-E-ATUALIZADO-2020.pdf>. Acesso em: 19 jul. 2021.

RISTORI, C. A. *et al.* Prevalence and populations of *Listeria monocytogenes* in meat products retailed in Sao Paulo, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, [New Rochelle], v. 11, n. 12, p. 969-973, Dec. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25407460/>. Acesso em 19 jul. 2021.

ROBERTS, B. N. *et al.* *Listeria monocytogenes* response to anaerobic environments. **Pathogens**, [Switzerland], v. 9, n. 3, p. 210, Mar. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32178387/>. Acesso em: 22 jun. 2020.

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

RODRIGUEZ, C. *et al.* *Listeria monocytogenes* dissemination in farming and primary production: Sources, shedding and control measures. **Food Control**, [Oxford], v. 120, Feb. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713520304564>. Acesso em: 22 maio 2021.

RODRIGUEZ-GARCIA, I. *et al.* Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [Philadelphia], v. 56, n. 10, p. 1717-1727, July 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25763467/>. Acesso em: 23 ago. 2020.

ROUF, R. *et al.* Antiviral potential of garlic (*Allium sativum*) and its organosulfur compounds: A systematic update of pre-clinical and clinical data. **Trends in Food Science & Technology**, [London], v. 104, p. 219-234, Oct. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32836826/>. Acesso em: 23 jul. 2021.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4 degrees C. **Food Microbiology**, [London], v. 17, n. 3, p. 329-340, June 2000. Disponível em: <https://europepmc.org/article/AGR/IND22301918>. Acesso em: 23 fev. 2021.

SANDULACHI, E. **Water activity concept and its role in food preservation.** 2012. p. 40-48. Disponível em: http://repository.utm.md/bitstream/handle/5014/780/MI_2012_4_pg_40_48.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 26 jul. 2021.

SEMENIUC, C. A.; POP, C. R.; ROTAR, A. M. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Journal of Food and Drug Analysis**, [Taipei], v. 25, n. 2, p. 403-408, Apr. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949816300801>. Acesso em: 24 jul. 2021.

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

SHAMLOO, E. *et al.* Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. **Iranian Journal of Veterinary Research**, [Iran], v. 20, n. 4, p. 241-254, Fev. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6983307/>. Acesso em: 12 maio 2020.

SHARMA, H. *et al.* Use of various essential oils as bio preservatives and their effect on the quality of vacuum packaged fresh chicken sausages under frozen conditions. **LWT-Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 81, p. 118-127, Aug. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643817302013>. Acesso em: 27 jul. 2021.

SHEKARFOROUSH, S. S. *et al.* Effect of chitosan on spoilage bacteria, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in cured chicken meat. **International Journal of Biological Macromolecules**, [Amsterdam], v. 76, p. 303-309, May 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813015001191>. Acesso em: 25 jul. 2021.

SILVA, F. *et al.* Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. **Journal of Medical Microbiology**, [England], v. 60, n. 10, p. 1479-1486, Oct. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21862758/>. Acesso em: 22 maio 2020.

SIMÕES, C. M. D. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6th ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.

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

SINGH, R. N. *et al.* Garlic (*Allium sativum*): pharmaceutical uses for human health. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, [New York], v. 11, n. 9, p. 4214-4228, Sept. 2020. Disponível em: <https://ijpsr.com/bft-article/garlic-allium-sativum-pharmaceutical-uses-for-human-health/>. Acesso em: 12 maio 2021.

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

ŠOJIC, B. *et al.* Coriander essential oil as natural food additive improves quality and safety of cooked pork sausages with different nitrite levels. **Meat Science**, [Oxford], v. 157, Nov. 2019. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0309174018312129>. Acesso em: 22 abr. 2020.

SOMRANI, M.; DEBBABI, H.; PALOP, A. Antibacterial and antibiofilm activity of essential oil of clove against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. **Food Science and Technology International**, [London], May 2017. Disponível em:

<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/10820132211013273>. Acesso em: 19 maio 2020.

SOMRANI, M. *et al.* Garlic, onion, and cinnamon essential oil anti-biofilms' effect against *Listeria monocytogenes*. **Foods**, [Switzerland], v. 9, n. 5, p. 567, May 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/341154503_Garlic_Onion_and_Cinnamon_Essential_Oil_Anti-Biofilms'_Effect_against_Listeria_monocytogenes. Acesso em: 17 dez. 2020.

SRIVASTAVA, K. C.; BORDIA, A.; VERMA, S. K. Garlic (*Allium-sativum*) for disease prevention. **South African Journal of Science**, [South Africa], v. 91, n. 2, p. 68-77, Feb. 1995. Disponível em: https://journals.co.za/doi/abs/10.10520/AJA00382353_5167. Acesso em: 15 maio 2020.

STASOFT. **Data Analysis Software System**. Statistica 8.0, 2008. Disponível em: www.stasoft.com. Acesso em: 15 maio 2021.

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

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [Oxford], v. 2016, Dec. 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2016/3012462/>. Acesso em: 15 maio 2020.

TAKAHASHI, H. *et al.* Evaluation of the antibacterial activity of allyl isothiocyanate, clove oil, eugenol and carvacrol against spoilage lactic acid bacteria. **LWT-Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 145, June 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643821004163>. Acesso em: 23 jul. 2021.

TILNEY, L. G.; PORTNOY, D. A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. **Journal of Cell Biology**, [New York], v. 109, n. 10, p. 1597-1608, Oct. 1989. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2115783/>. Acesso em: 22 nov. 2020.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. **Journal of Food Science**, [Malden], v. 79, n. 7, p. R1231-R1249, July 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24888440/>. Acesso em: 27 jul. 2021.

UDDIN, M. A. *et al.* Study of chemical composition and medicinal properties of volatile oil from clove buds (*Eugenia caryophyllus*). **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, [New York], v. 8, n. 2, p. 895-899, Feb. 2017. Disponível em: <https://ijpsr.com/bft-article/study-of-chemical-composition-and-medicinal-properties-of-volatile-oil-from-clove-buds-eugenia-caryophyllus/>. Acesso em: 15 maio 2020.

VASCONCELOS, R. M.; MARIN, V. *Listeria monocytogenes* em queijo minas frescal e critérios para a avaliação de risco. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 32-45, jan. 2008. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/1815>. Acesso em: 12 abr. 2020.

VITAS, A. I. *et al.* Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 90, n. 3, p. 349-356, Feb. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14751690/>. Acesso em: 25 ago. 2021.

VIVEK, N. *et al.* Genomics of lactic acid bacteria for glycerol dissimilation. **Molecular Biotechnology**, [Totowa], v. 61, n. 8, p. 562-578, Aug. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31161300/>. Acesso em: 12 maio 2020.

XU, J.-G. *et al.* Chemical composition, antibacterial properties and mechanism of action of essential oil from clove buds against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, [Basel], v. 21, n. 9, Sept. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27617990/>. Acesso em: 24 jul. 2021.

WEI, J. N. *et al.* Phytochemical and bioactive profile of *Coriandrum sativum* L. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 286, p. 260-267, July 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30827604/>. Acesso em: 15 dez. 2020.

YOUSEFI, M.; KHORSHIDIAN, N.; HOSSEINI, H. Potential application of essential oils for mitigation of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry products. **Frontiers in Nutrition**, [Switzerland], v. 7, Nov. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7732451/>. Acesso em: 25 jul. 2021.

ZAMUZ, S. *et al.* The role of phenolic compounds against *Listeria monocytogenes* in food. A review. **Trends in Food Science & Technology**, [London], v. 110, p. 385-392, Apr. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224421000765>. Acesso em: 12 jun. 2021.

ZHANG, C. *et al.* Unraveling the inhibitory mechanism of clove essential oil against *Listeria monocytogenes* biofilm and applying it to vegetable surfaces. **LWT-Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 134, Dec. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643820311993>. Acesso em: 13 jan. 2021.

ZHANG, H.; CAI, Y. **Lactic acid bacteria**. United States: Springer, 2014.

ZHOU, Y. *et al.* Effects of rosemary and ginger on storage quality of western-style smoked sausage. **Journal of Food Processing and Preservation**, [Malden], v. 45, n. 7, p. e15634, May 2021. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.15634>. Acesso em: 27 jul. 2021.