

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

MONYQUE KAIS ARAÚJO

**ÓLEO ESSENCIAL DE ALHO, ISOTIOCIANATO DE ALILA E NISINA Z COMO
CONSERVANTES NATURAIS EM LINGUIÇA MISTA FRESCAL**
(Garlic essential oil, allyl isothiocyanate and nisin Z as natural preservatives in fresh
sausage)

**CURITIBA
2016**

MONYQUE KAIS ARAÚJO

**ÓLEO ESSENCIAL DE ALHO, ISOTIOCIANATO DE ALILA E NISINA Z COMO
CONSERVANTES NATURAIS EM LINGUIÇA MISTA FRESCAL**

(Garlic essential oil, allyl isothiocyanate and nisin Z as natural preservatives in fresh
sausage)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Renata Ernlund
Freitas de Macedo

Co-orientador(a): Prof Dr Fernando
Bittencourt Luciano

CURITIBA

2016

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	viii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO	ix
RESUMO GERAL	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO	1
2. LINGUIÇA FRESCAL X DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR	2
2.1 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	3
2.2 Óleos Essenciais.....	5
2.2.1 Isotiocianato de Alila.....	6
2.2.2 Óleo Essencial de Alho.....	7
2.3 Nisina.....	8
CAPÍTULO 2	
2. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alho, isotiocianato de alila e nisina Z contra <i>E. coli</i> O157:H7 e seu efeito sobre a estabilidade de linguiça mista frescal	11
2.1 Introdução.....	13
2.2 Material e métodos.....	15
2.2.1 Compostos orgânicos e cepas bacterianas.....	15
2.3 Atividade Antimicrobiana <i>in vitro</i>	16
2.3.1 Preparo dos inóculos bacterianos.....	16
2.3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) de combinações dos compostos antimicrobianos.....	16
2.3.3 Fabricação de linguiça mista frescal.....	17
2.3.4 Análise microbiológica.....	19

2.3.5 Determinação de pH.....	20
2.3.6 Determinação de cor instrumental.....	20
2.3.7 Análise sensorial.....	20
2.3.8 Análise estatística.....	21
2.4. Resultados e Discussão.....	21
2.4.1 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos compostos naturais.....	21
2.4.2 Efeito dos compostos naturais sobre a estabilidade de linguiça mista frescal.....	24
2.4.3 Análises microbiológicas.....	24
2.4.4 Análises físico-químicas.....	30
2.4.5 Análise sensorial.....	35
2.5 Conclusão.....	37
CAPÍTULO 3.....	
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
Referências.....	39

“Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos. A consciência de fazer tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável. Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

À Deus e aos amigos espirituais por terem me guiado com muita sabedoria nesta etapa de minha vida profissional.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Renata E. F. de Macedo por toda paciência comigo, por me ensinar, me orientar e me tornar uma profissional melhor e mais capacitada e ao meu co-orientador, Prof. Dr. Fernando B. Luciano pelos ensinamentos compartilhados.

Aos meus pais e amigos pelo apoio e, em especial, ao amigo Gustavo Saliba por toda paciência e gentileza em me ajudar com os cálculos mesmo durante as madrugadas e a amiga Vanessa Siunti de Oliveira pelo auxílio com os gráficos.

Ao Sr. Carlos Garret e ao Frigorífico Garret pelo apoio, carinho e disponibilização de matéria-prima.

A técnica de laboratório Hanna Wolupeck por todo ensinamento e ajuda.

As graduandas que me auxiliaram durante todo esse período: Paloma Orso, Aline Gumiela, Michele Razoto e Caroline de Oliveira Mendes.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos. O capítulo 1 apresenta uma introdução geral, a contextualização do tema, o estado da arte e os objetivos de estudo desta dissertação. O capítulo 2 trata-se de artigo científico completo, contendo referências, e formatado nas normas da revista para o qual será submetido. O capítulo 3 finaliza esta dissertação com conclusões gerais e considerações finais deste trabalho e sugestões para estudos futuros.

RESUMO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana sobre bactérias patogênicas e deteriorantes da associação de compostos naturais (óleo essencial de alho - OA, isotiocianato de alila - ITA e nisina Z pura - NI) *in vitro* e sua aplicação na estabilidade de linguiça mista frescal. Na avaliação *in vitro* foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos compostos em combinação sobre *E. coli* O157:H7 e *Lactobacillus plantarum*. Para avaliação do efeito dos compostos naturais em linguiça foram produzidos 5 lotes divididos nos seguintes tratamentos: T1 = 20 mg/kg NI, T2 = 125 µL/kg OA + 62,5 µL/kg ITA + 20 mg/kg NI e T3 = 62,5 µL/kg OA + 125 µL/kg ITA + 20 mg/kg NI. Nesses tratamentos, as massas de linguiça foram inoculadas com *E. coli* O157:H7. Além desses, foram produzidos dois lotes controle, sendo um controle positivo (CP), inoculado apenas com *E. coli* O157:H7 e um controle negativo (CN), sem inoculação bacteriana. As linguiças foram armazenadas a 6°C durante 20 dias e a cada 5 dias, amostras foram avaliadas quanto a parâmetros microbiológicos (contagem de *E. coli* O157:H7, *E. coli* autóctones, aeróbios psicrotróficos e bactérias lácticas) e físico-químicos (pH e cor). Posteriormente, o lote controle negativo e os tratamentos T2 e T3, sem a inoculação de *E. coli* O 157:H7 foram submetidos à avaliação sensorial de aceitabilidade. Os resultados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey (P>0,05). Na associação *in vitro* de NI com AO e ITA verificou-se redução significativa de *E. coli* O157:H7 nas concentrações de 0,0125 µL/mL AO + 0,00625 µL/mL ITA + 0,24 mg/mL NI e de *L. plantarum* nas concentrações de 0,00625 µL/mL AO + 0,0125 µL/mL ITA + 0,24 mg/mL NI. Em linguiça, as reduções na contagem de *E. coli* O 157:H7, ao final da estocagem, nos T2 e T3 foram de 2,06 e 2,12 log UFC/g, respectivamente, em comparação ao CP. Para a contagem de *E. coli* autóctone verificou-se que os tratamentos T2 e T3 apresentaram reduções do patógeno a níveis indetectáveis a partir do 10º dia de armazenamento. Em relação à contagem de bactérias lácticas, todos os tratamentos (T1, T2 e T3) apresentaram redução significativa em comparação aos lotes controle (CP e CN), a partir do 5º dia de estocagem (P<0,05). Para os microrganismos psicrotróficos, nenhum dos tratamentos apresentou efeito inibitório significativo. Com relação à cor instrumental, verificaram-se menores valores de chroma (C*) para as linguiças dos T2 e T3 (P<0,05) ao final da estocagem. Contudo, as linguiças adicionadas de antimicrobianos (T1, T2 e T3) apresentaram menor descoloração (hue) e maior valor para cor vermelha (a*) em comparação aos lotes controle. As linguiças tratadas com a combinação dos antimicrobianos (T2 e T3) apresentaram menor pH em comparação aos controles. Quanto à análise sensorial, as linguiças adicionadas dos antimicrobianos naturais apresentaram diferença significativa para o controle para os atributos avaliados. Contudo, apresentaram índice de aceitabilidade acima de 70% para a maioria dos atributos. As combinações de óleos essenciais e nisina Z testadas foram eficientes para a redução significativa da população de *E. coli* O 157:H7 em linguiça mista frescal em comparação aos grupos controles. As combinações desses antimicrobianos também se mostraram efetivas em manter a estabilidade da linguiça mista frescal pelo controle do crescimento de bactérias lácticas deteriorantes e pela manutenção da cor vermelha e do pH das linguiças, apresentando-se sensorialmente aceitas pelos provadores.

Palavras-chave: linguiça mista frescal, *E. coli* O157:H7, isotiocianato de alila, nisina Z, óleo essencial de alho

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the antimicrobial activity of pathogenic and spoilage bacteria using the association of natural compounds (garlic essential oil - OA, allyl isothiocyanate - ITA and pure nisin Z - NI) *in vitro* and its application in stability of fresh sausage. In the evaluation *in vitro* were determined the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the compounds in combination against *E. coli* O157: H7 and *L. plantarum*. To evaluate the effect of natural compounds in sausage, five lots were produced and divided into the following treatments: T1 = 20 mg/kg NI, T2 = 125 µL/kg OA + 62.5 µL/kg ITA + 20 mg/kg NI and T3 = 62.5 µL/kg OA + 125 µL/kg ITA + 20 mg/kg NI. In these treatments, sausage mixtures were inoculated with *E. coli* O157: H7. In addition, two control sausages were produced - a positive control (CP) inoculated only with *E. coli* O157: H7 and a negative control (CN) without bacterial inoculation. Sausages were stored at 6 °C for 20 days and samples were evaluated for microbiological (*E. coli* O157:H7, native *E. coli*, aerobic psychrotrophic and lactic acid bacteria) and physico-chemical parameters (pH and color) every 5 days. Subsequently, the negative control, T2 and T3 without inoculation of *E. coli* O157:H7 were subjected to sensory evaluation acceptability. Results were analyzed by ANOVA and Tukey's test ($P > 0.05$). In association of NI with AO and ITA, *E. coli* O157: H7 *in vitro* was significantly reduced at concentrations of 0.0125 µL/mL AO + 0.00625 µL/mL ITA + 0.24 mg/mL NI and *L. plantarum* at concentrations of 0.00625 µL / ml AO + 0.0125 µL / mL ITA + 0.24 mg/mL NI. *E. coli* O157:H7 reduction in sausage, at the end of storage was 2.06 and 2.12 log CFU/g on T2 and T3 when compared to CP. Native *E. coli* count on T2 and T3 showed undetectable reduction levels from the 10th day of storage. All treatments (T1, T2 and T3) showed significant reduction on lactic acid bacteria levels when compared to the control groups (CP and CN), from the 5th day of storage ($P < 0.05$). None of the treatments had an effect on psychrotrophic bacteria. Smaller C * values for instrumental color were detected on sausages of T2 and T3 ($P < 0.05$) at end of storage. However, the treatments (T1, T2 and T3) showed less discoloration (hue) and larger value for red color (a *) in comparison to the control groups. Sausages treated with combination of antimicrobials (T2 and T3) showed lower pH when compared to controls. On the sensory analysis, the natural antimicrobial added sausages showed a significant difference to the control for the evaluated attributes. However, they showed acceptability index above 70% for most of the attributes. The combinations of essential oils and nisin Z were efficient to reduce significantly the population of *E. coli* O157:H7 in fresh sausage compared to control groups. The combinations of these antimicrobials were also proven effective in maintaining the stability of the fresh sausage for controlling the growth of spoilage lactic acid bacteria and for maintaining the red color and the pH of the sausages, being wellaccepted by the panelists.

Keywords: fresh sausage, *E. coli* O157: H7, allyl isothiocyanate, nisin Z, garlic essential oil

LISTA DE TABELAS

	Página
Capítulo 2	
Tabela 1. Formulação de linguiça mista frescal.....	19
Tabela 2. Contagem de <i>E. coli</i> O157:H7 (log UFC/g) <i>in vitro</i> , em função da associação de diferentes doses dos antimicrobianos.....	21
Tabela 3. Contagem de <i>L. plantarum</i> (log UFC/g) <i>in vitro</i> em função da associação de diferentes doses dos antimicrobianos.....	21
Tabela 4. Escores médios das características sensoriais de linguiça mista frescal com e sem a adição de óleo essencial de alho, isotiocianato de alila e nisina Z.....	35

LISTA DE FIGURAS

	Página
Capítulo 1	
Figura 1. Estrutura química do Isotiocianato de Alila.....	6
Figura 2. Biossíntese da alicina.....	8
Figura 3. Estrutura química da nisina Z.....	9
Capítulo 2	
Figura 1. Médias das contagens de <i>E. coli</i> O157:H7 em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração.....	25
Figura 2. Médias dos valores das contagens de bactérias <i>E. coli</i> autóctones em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração.....	27
Figura 3. Médias dos valores das contagens de bactérias lácticas em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração.....	28
Figura 4. Médias dos valores das contagens de bactérias psicrotróficas em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração.....	30
Figura 5. Médias dos valores de pH em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração.....	31
Figura 6. Médias dos valores da coordenada de cor C* em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração.....	32
Figura 7. Médias dos valores da coordenada hue em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração.....	32
Figura 8. Médias dos valores de luminosidade em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração.....	33
Figura 9. Médias dos valores da coordenada de cor a* em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração.....	34
Figura 10. Médias dos valores da coordenada de cor b* em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração.....	35

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

As mudanças nos hábitos alimentares associadas as práticas de processamento de alimentos e ao aumento no consumo de produtos industrializados prontos têm proporcionado o surgimento de uma nova tendência na conservação de alimentos baseada na utilização de conservantes naturais (Selim, 2011). O uso de aditivos sintéticos bem como de outros meios de conservação dos alimentos que visam diminuir a contaminação bacteriana e a deterioração, às vezes podem acarretar fatores negativos para os consumidores como efeitos alergênicos ou alguma toxicidade. Atualmente, existe uma demanda por produtos naturais, frescos e que apresentem níveis microbiológicos aceitáveis (Dillon & Board, 1994; Gould, 1996; Periago, 2001).

Os produtos cárneos são apontados como as principais fontes causadoras de doenças alimentares devido as suas características como alta atividade de água e pH próximo a neutralidade (Labadie, 1999; Liserre et al., 2002; Samelis et al., 2005), levando à preocupação e exigindo cuidado por parte dos serviços de saúde pública e dos estabelecimentos manipuladores em razão dos riscos que oferecem pela possibilidade de veicular bactérias patogênicas. Dentre essas bactérias, a *Escherichia coli* destaca-se entre os principais microrganismos envolvidos em surtos alimentares no Brasil. Essa espécie pode abrigar cepas patogênicas como o sorotipo *E. coli* O157:H7, o qual tem sido associado a casos envolvendo derivados cárneos relatados mundialmente nos últimos anos (Dontorou et al., 2003; Normanno et al., 2004; Sallam et al., 2004; Dourou et al., 2009). Visando diminuir o risco de proliferação bacteriana nos alimentos, bem como a redução do uso de aditivos sintéticos, os antimicrobianos naturais apresentam-se como possíveis alternativas para os conservantes utilizados atualmente nas indústrias de produtos cárneos (Djenane et al., 2011).

Os conservantes naturais têm apresentado uma boa aceitabilidade por parte dos consumidores por possuírem baixos níveis de toxicidade (Tajkarimi & Ibrahim, 2011) e terem se mostrado eficientes na redução ou eliminação de

microrganismos, podendo aumentar a qualidade, a inocuidade e a vida-de-prateleira dos alimentos (Belletti et al., 2008; Nannapaneri et al., 2009; Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de alho, isotiocianato de alila e o composto nisina Z contra *E. coli* O157:H7, *E. coli* autóctone, bactérias psicrotróficas e bactérias lácticas, bem como avaliar seus efeitos sobre a estabilidade de linguiça mista frescal, prospectando seu uso potencial como conservante natural.

2 LINGUIÇA FRESCAL X DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR

O consumo de carne tem aumentado consideravelmente, sendo esse alimento uma das principais fontes de proteína na alimentação humana (Dave & Ghaly, 2011). No Brasil, nota-se uma demanda maior na ingestão de embutidos e derivados em relação ao consumo da carne *in natura* e isso se deve, provavelmente ao fato de haver uma considerável variedade desse tipo de produto, a possibilidade de fracionamento em porções menores e o preço acessível (Terra, 1998; Pardi et al., 2007).

Dentre os produtos cárneos consumidos e passíveis de causar doenças transmitidas por alimentos, pode-se citar a linguiça frescal que, segundo a Instrução Normativa nº 4 de 31 de março de 2000, caracteriza-se como produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionados ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, e submetido ao processo tecnológico adequado (Martinis & Franco, 1998). O Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978, considera que, normalmente, as linguiças são elaboradas a partir de carne bovina, suína ou a mistura das duas, sendo a linguiça frescal aquela que não sofre nenhum processo térmico.

O Brasil possui uma vasta produção de linguiça a qual pode ser justificada devido ao fato dessa produção não exigir alto investimento e nem tecnologias sofisticadas (Milani et al., 2003). Entretanto, a linguiça pode ser considerada um substrato ideal para a proliferação bacteriana visto que a sua produção demanda intenso manuseio durante o processamento (Martinis & Franco, 1998;

Lisserre et al., 2002; Samelis et al., 2005). A matéria-prima, os temperos e demais ingredientes que são adicionados durante a fabricação da linguiça devem ter sua qualidade verificada a fim de diminuir uma possível contaminação cruzada (Knobloch et al., 1989; Samelis et al., 2005). Também se deve ter atenção quanto aos envoltórios naturais utilizados para envolver as linguiças, pois eles são provenientes dos intestinos de animais havendo alta contaminação inicial, tornando-se necessário a utilização de produtos específicos e cuidados quanto à higienização adequada desses envoltórios (Pardi et al., 2007). Após a fabricação, deve-se ter cautela com as etapas de embalagem e forma de armazenamento (local e temperatura), pois esses fatores podem influenciar na proliferação de microrganismos (Andrade, 2005).

2.1 *Escherichia coli* O157:H7

Muitos microrganismos são responsáveis pela deterioração e contaminação dos produtos cárneos. Alguns autores relatam que as bactérias da família Enterobacteriaceae são frequentemente verificadas na matéria-prima cárnea (Cervený et al., 2009), podendo haver presença de cepas patogênicas como *Salmonella*, *Campylobacter* e a *Escherichia coli* (Sofos & Geonaras, 2010). Dentre as cepas patogênicas de *E. coli*, o sorotipo O157:H7 é muito preocupante, pois uma baixa população desse microrganismo pode causar diarreia e colite hemorrágica em humanos, podendo evoluir para a chamada síndrome hemolítica urêmica (Otero et al., 2014). A presença de *E. coli* O157:H7 já foi relatada em surtos alimentares que envolviam leite cru, carne bovina mal cozida e outros produtos à base de carne, frutas e vegetais (Erickson et al., 1995; Beuchat, 1996; Tauxe et al., 1997). A *E. coli* O157:H7 é uma das cepas produtoras de toxinas apresentando um número baixo de casos se comparada com as contaminações de *Salmonella*, porém elevados índices de hospitalização e mortalidade (Mead et al., 1990).

A *E. coli* O157:H7 apresenta três fatores de virulência distintos como a produção de citotoxinas semelhantes a shiga toxina (I e II) ou verotoxina (Pennington, 2010), a síntese de hemolisina e a de aderir e colonizar as superfícies intestinais (Karmali, 1989), sendo que a verotoxina pode causar

colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (Meng et al., 1994). A transmissão pode ocorrer através de alimentos como carnes, leite, iogurte, frutas, legumes e água contaminados (Buchanan et al., 1997; Mead & Griffin, 1998) e também através de solo contaminado (O'brien et al., 2001) e contato direto com os animais (Crump et al., 2002).

A *E. coli* O157:H7 foi identificada pela primeira vez em 1982 em surtos de colite hemorrágica nos Estados Unidos, nos estados de Oregon (26 casos) e Michigan (21 casos), associada ao consumo de hambúrguer mal cozido em restaurantes *fast food* (Riley et al., 1983). Também nos EUA, em 1994, o consumo de salame contaminado com *E. coli* O157:H7 ocasionou 18 casos de contaminação (Palanichany et al., 2008). No Canadá, entre os anos de 1998 e 1999 foram relatados 182 casos de contaminação por *E. coli* O157:H7 a partir do consumo de salame (Williams et al., 2000; Macdonald et al., 2004).

No estudo de Ulukanli e Çavli (2006), os autores analisaram 80 amostras de *döner kebab* de diferentes restaurantes em Kars (Turquia) e encontraram 9 amostras positivas para *E. coli* O157:H7. Sartz et al (2008) relataram em seu estudo um surto de *E. coli* O157:H7 na Suécia em 2002, com 30 casos, cuja transmissão ocorreu através do consumo de embutido fermentado. Em 2005, no sudoeste da França, foi identificado um surto com 46 casos confirmados de *E. coli* O157:H7 o qual ocorreu a partir do consumo de hambúrguer bovino (King et al., 2009).

Nos Estados Unidos, devido ao enorme consumo de carne bovina verifica-se um custo médio anual de cerca de 635 milhões de dólares para o tratamento e controle da *E. coli* O157:H7 (Schardd et al., 2012). A partir desses relatos, pode-se concluir que existe uma considerável prevalência de *E. coli* O157 em diferentes tipos de alimentos, tornando-se necessário o desenvolvimento de métodos que inibam ou diminuam o crescimento desse microrganismo, pois essa bactéria patogênica pode causar significativa mortalidade e perdas econômicas para a indústria de alimentos (Nadarajah et al., 2005).

No Brasil não há dados referentes a surtos ocasionados por *E. coli* O157:H7.

2.2 Óleos Essenciais

Visando diminuir o risco de proliferação bacteriana nos alimentos, bem como a redução do uso de aditivos sintéticos, os compostos naturais apresentam-se como possíveis alternativas para serem adicionados em produtos cárneos (Djenane et al., 2011). As plantas aromáticas têm sido muito estudadas e utilizadas, pois apresentam potencial como conservantes naturais (Djenane et al., 2012). Nos anos 1990, houve um aumento relativo no uso de especiarias e óleos essenciais como conservantes naturais visando aumentar o prazo de validade e a redução dos microrganismos patogênicos em alimentos (Burt, 2004; Moreira et al., 2007; Simitzis et al., 2008).

Muitas plantas contêm compostos químicos apresentando diferentes propriedades e atividades biológicas (Djenane et al., 2011), possuindo compostos como os glicosídeos, saponinas, taninos, alcalóides, óleos essenciais, ácidos orgânicos e outros (Ceylan & Fung, 2004; Bajpai et al., 2008), sendo que os óleos essenciais podem constituir até 85% desses compostos e os outros componentes apresentam-se geralmente em níveis residuais (Burt, 2004; Grosso et al., 2008). Cerca de 3 mil óleos essenciais são conhecidos e mais de 300 apresentam um potencial comercial (Bakkali et al., 2008).

Os componentes presentes nos óleos essenciais apresentam diferentes graus de atividade sobre as bactérias Gram positivas e Gram negativas (Dorman & Deans, 2000) sendo que a eficácia antimicrobiana do óleo essencial depende de fatores como o método de extração do óleo, as características dos alimentos como pH, gordura, proteína, teor de água, presença de antioxidantes e conservantes, entre outros (Lis-Balchin et al., 2003; Burt, 2004; Brandi et al., 2006). Acredita-se que altos níveis de gordura e proteínas preservam as bactérias da ação dos óleos essenciais (Aureli et al., 1992; Pandit & Shelef, 1994; Tassou et al., 1995;), porém os carboidratos não aparentam ter esse mesmo poder de proteção (Shelef et al., 1984).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais não apresenta um alvo celular específico (Carson et al., 2002). A propriedade de hidrofobicidade dos óleos essenciais permite a permeabilização pela membrana através da perda

de íons e redução do potencial de membrana, havendo um colapso das bombas de prótons e esgotamento do *pool* de ATP (Knobloch et al., 1989; Sikkema et al., 1994; Ultee et al., 2000; Ultee et al., 2002; Turina et al., 2006; Di Pasqua et al., 2007). Os óleos essenciais podem coagular o citoplasma (Gustafson et al., 1998) e causar danos às proteínas e lipídios (Ultee et al., 2000; Burt, 2004) sendo que os danos causados nas paredes e membranas celulares levam a extensa perda de componentes celulares e a saída de íons que irão determinar à morte celular (Helander et al., 1998; Carson et al., 2002; Burt, 2004).

Dentre os óleos essenciais que podem ser utilizados como conservantes naturais em alimentos cárneos, pode-se citar o óleo essencial de alho e o óleo essencial de mostarda.

2.2.1 Isotiocianato de Alila

A mostarda faz parte da família *Brassicaceae* junto com o wasabi e a raiz-forte tendo como principal componente o isotiocianato de alila ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{N}=\text{C}=\text{S}$) (Figura 1). Há vários estudos que demonstraram a atividade antimicrobiana deste composto mesmo quando utilizado em baixas dosagens (Kanemaru & Miyamoto, 1990; Isshiki et al. 1992; Ohta et al., 1995; Delaquis et al., 1999; Lin et al., 2000; Turgis et al., 2008) sendo considerado como seguro (GRAS – *Generally Regarded As Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) (Isshiki et al, 1992; Mari et al, 2003; Dhingra et al, 2004). Nas sementes de mostarda, o isotiocianato de alila (ITA) aparece na porcentagem de 0,5 a 1,0% (Clark, 1992).

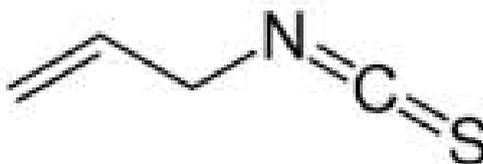


Figura 1. Estrutura química do Isotiocianato de Alila.

Fonte: Hyltdgaard et al., 2012

Em função da sua propriedade antimicrobiana, o ITA pode agir contra diversas bactérias presentes em carnes, queijos, pães entre outros (Nielsen & Rios, 2000; Nadarajah et al., 2005; Li et al., 2007; Lee et al., 2009) sendo que o ITA é considerado o principal produto da ação hidrolítica da enzima mirosinase endógena no sinergismo dos glucosinolatos em plantas crucíferas como a mostarda (Delaquis & Mazza, 1995). Quanto ao mecanismo de ação, os isotiocianatos podem afetar a síntese de ácido nucléico principalmente a produção de RNA, causar perturbação da síntese de proteínas e inibição da síntese de DNA (Nowicki et al, 2016).

2.2.2 Óleo Essencial de Alho

O alho pertence à família *Lileaceae*. e tem sido usado há séculos para tratar vários tipos de infecções (Onyeagba et al., 2006) como otite média, infecções respiratórias, doenças do trato intestinal entre outras (Ankri & Mirelman, 1999; Jaber & Al-Mossawi, 2007). As primeiras atividades antimicrobianas do alho foram relatadas em 1858 por Pasteur e desde então vários estudos têm comprovado a ação do alho contra bactérias, protozoários, fungos e alguns vírus (Jaber & Al-Mossawi, 2007). Segundo Aloirainy (2011). O uso do alho pode aumentar a vida-de-prateleira dos alimentos e diminuir a possibilidade de deterioração e contaminação dos alimentos, pois o alho possui a propriedade de inibir o crescimento microbiano tanto de bactérias Gram positivas quanto Gram negativas (Abubakar, 2009). O uso do óleo de alho é considerado como seguro (GRAS) para utilização em alimentos segundo a FDA (Helou & Harris, 2007).

Um dos principais compostos ativos do óleo essencial de alho é o dialil tiosulfato (alicina) que é o principal responsável pela ação antimicrobiana bem como pelo aroma e o sabor (Ankri & Mirelman, 1999; Amagase et al., 2001; Harris et al., 2001). A alicina é produzida a partir da enzima alinase que irá converter a aliina, um aminoácido não protéico presente em todo o bulbo, em ácido sulfênico que irá se dimerizar em alicina (Figura 2) (Stoll & Seebeck, 1951; Mirunalini et al., 2010). O mecanismo de ação da alicina se dá através da inibição de enzimas contendo sulfidrila (Wills, 1956), da inibição da síntese de

RNA (Feldberg et al., 1988) ou da alteração do potencial eletroquímico celular (Gruhlke et al., 2010). No estudo *in vitro* realizado por Feldeber et al. (1988), verificou-se que a alicina retardou ou inibiu parcialmente a síntese de DNA e de proteína da célula bacteriana bem como inibiu a síntese de RNA imediata e completamente, sugerindo assim, que este seja o alvo principal da alicina.

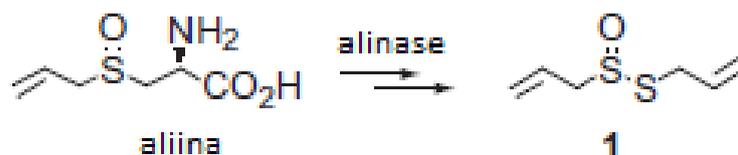


Figura 2. Biossíntese da alicina.

Fonte: Stoll et al., 1951

2.3 Nisina

Concomitante aos óleos essenciais pode-se adicionar outras substâncias, as quais visam potencializar a ação antimicrobiana dos mesmos, auxiliando na redução das doses dos óleos e conseqüente redução do odor e aroma que podem alterar as características sensoriais dos alimentos. Dentre os compostos naturais que podem ser associados aos óleos essenciais, podem-se citar as bacteriocinas como a nisina. As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente por uma bactéria a qual é ativa contra outras bactérias (Richard et al., 2004). Esses peptídeos antimicrobianos têm sido isolados a partir de diferentes bactérias, principalmente as bactérias ácido lácticas (Jack et al., 1995; Riley & Wertz, 2002; Gálvez et al., 2007).

A nisina é uma bacteriocina pertencente à classe dos lantibióticos – classe I (Cotter et al., 2005) havendo relatos de que desde os anos 1960, a nisina tem sido utilizada como antimicrobiano em alimentos (Delves-Broughton et al., 1996). A nisina é a única bacteriocina autorizada pela FDA para uso em alimentos (GRAS) (Jay, 2000) e apresenta estabilidade em condições de refrigeração e ao calor, porém é degradada por enzimas intestinais (Cutter & Siragusa, 1995; Murdock et al., 2006).

O mecanismo de ação da nisina ocorre a partir da interação da sua carga positiva com a carga negativa da membrana citoplasmática, especificamente o lipídio II (Hasper et al., 2006), impedindo a incorporação do monômero de peptidoglicano ao crescimento da rede de peptidoglicanos (Punyauppa-Path et al., 2015). A formação de vários complexos de nisina-lipídio II resultam na formação de poros na membrana celular das células-alvo (Weidermann et al., 2004) o que pode levar a uma alteração da permeabilidade da membrana celular (Liu & Hansen, 1990; Brotz & Sahl, 2000; Bonev et al., 2004). O aumento da permeabilidade da membrana celular pode causar o extravasamento de metabólitos intracelulares (Samelis et al., 2005; Martin-Visscher, 2011) como aminoácidos e íons e a dissipação do potencial de membrana (Sahl et al., 1987; Schuller et al., 1989). Os danos causados as células-alvo as impedem de produzir energia e macromoléculas vitais, causando a lise celular (Ruhr & Sahl, 1985; Sahl et al., 1987).

Em 1928, foi descoberta a nisina A, a partir da fermentação de cultura do leite (Rogers & Whittier, 1928), sendo que algumas variantes já foram descritas como a Nisina Z, L e Q (Piper et al., 2011; Perin et al., 2012). A nisina Z (Figura 3) é produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* apresentando como diferença da nisina A apenas o aminoácido 27, em que a histidina é substituída pela asparagina (Mulders et al., 1991).

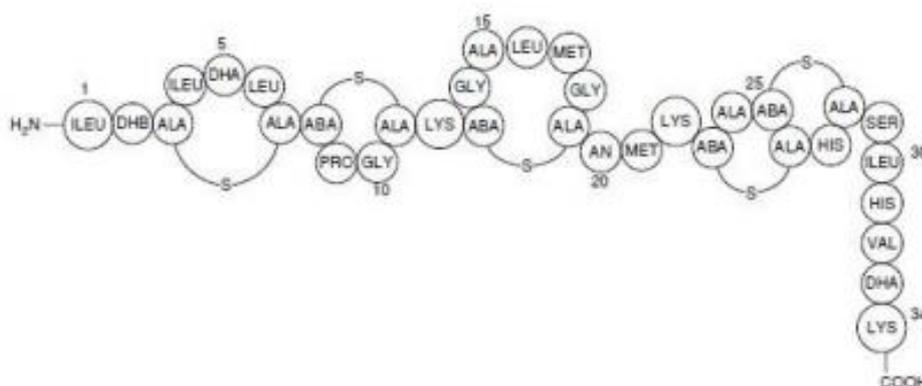


Figura 3. Estrutura química da nisina Z.

Fonte: <http://www.nature.com/nsmb/journal/v11/n10/images/nsmb830-F1.gif>

A adição de nisina em alguns alimentos a fim de inibir ou diminuir o crescimento de microrganismos tem como vantagem não alterar negativamente

as características sensoriais dos mesmos (Samelis et al., 2005). Alguns autores relatam a existência de uma ação sinérgica entre os compostos dos óleos essenciais associados à nisina (Pol & Smid, 1999; Ettayebi et al., 2000; Periago & Moezelaar, 2001; Pol et al., 2002). Segundo Pol e Smid (1999), o mecanismo sinérgico entre os óleos essenciais e a nisina resulta no aumento do número de poros nas membranas celulares criadas pela nisina ou no aumento do tamanho dos poros formados, levando a uma maior redução de células viáveis.

Diante do exposto, torna-se interessante o uso combinado de óleos essenciais e nisina para o controle de micro-organismos deteriorantes e patogênicos em alimentos, possibilitando um maior espectro de ação antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas e a redução da dose de cada composto individualmente.

CAPÍTULO 2

(Artigo científico a ser submetido para publicação no periódico Food Science and Technology)

Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alho, isotiocianato de alila e nisina Z contra *E. coli* O157:H7 e seu efeito sobre a estabilidade de linguiça mista frescal

(Antimicrobial activity of garlic essential oil, allyl isothiocyanate and nisin Z against E. coli O157:H7 in vitro and in fresh sausage)

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana sobre bactérias patogênicas e deteriorantes da associação de compostos naturais (óleo essencial de alho - OA, isotiocianato de alila - ITA e nisina Z pura - NI) *in vitro* e sua aplicação na estabilidade de linguiça mista frescal. Na avaliação *in vitro* foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos compostos em combinação sobre *E. coli* O157:H7 e *Lactobacillus plantarum*.

Para avaliação do efeito dos compostos naturais em linguiça foram produzidos 5 lotes divididos nos seguintes tratamentos: T1 = 20 mg/kg NI, T2 = 125 µL/kg OA + 62,5 µL/kg ITA + 20 mg/kg NI e T3 = 62,5 µL/kg OA + 125 µL/kg ITA + 20 mg/kg NI. Nesses tratamentos, as massas de linguiça foram inoculadas com *E. coli* O157:H7. Além desses, foram produzidos dois lotes controle, sendo um controle positivo (CP), inoculado apenas com *E. coli* O157:H7 e um controle negativo (CN), sem inoculação bacteriana. As linguiças foram armazenadas a 6°C durante 20 dias e a cada 5 dias, amostras foram avaliadas quanto a parâmetros microbiológicos (contagem de *E. coli* O157:H7, *E. coli* autóctones, aeróbios psicrotróficos e bactérias lácticas) e físico-químicos (pH e cor). Posteriormente, o lote controle negativo e os tratamentos T2 e T3, sem a inoculação de *E. coli* O 157:H7 foram submetidos à avaliação sensorial

de aceitabilidade. Os resultados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey ($P > 0,05$).

Na associação *in vitro* de NI com AO e ITA verificou-se redução significativa de *E. coli* O157:H7 nas concentrações de 0,0125 $\mu\text{L/mL}$ AO + 0,00625 $\mu\text{L/mL}$ ITA + 0,24 mg/mL NI e de *L. plantarum* nas concentrações de 0,00625 $\mu\text{L/mL}$ AO + 0,0125 $\mu\text{L/mL}$ ITA + 0,24 mg/mL NI.

Em linguiça, as reduções na contagem de *E. coli* O 157:H7, ao final da estocagem, nos T2 e T3 foram de 2,06 e 2,12 log UFC/g, respectivamente, em comparação ao CP. Para a contagem de *E. coli* autóctone verificou-se que os tratamentos T2 e T3 apresentaram reduções do patógeno a níveis indetectáveis a partir do 10º dia de armazenamento. Em relação à contagem de bactérias lácticas, todos os tratamentos (T1, T2 e T3) apresentaram redução significativa em comparação aos lotes controle (CP e CN), a partir do 5º dia de estocagem ($P < 0,05$). Para os microrganismos psicotróficos, nenhum dos tratamentos apresentou efeito inibitório significativo.

Com relação à cor instrumental, verificaram-se menores valores de chroma (C^*) para as linguiças dos T2 e T3 ($P < 0,05$) ao final da estocagem. Contudo, as linguiças adicionadas de antimicrobianos (T1, T2 e T3) apresentaram menor descoloração (hue) e maior valor para cor vermelha (a^*) em comparação aos lotes controle. As linguiças tratadas com a combinação dos antimicrobianos (T2 e T3) apresentaram menor pH em comparação aos controles.

Quanto à análise sensorial, as linguiças adicionadas dos antimicrobianos naturais apresentaram diferença significativa para o controle para os atributos avaliados. Contudo, apresentaram índice de aceitabilidade acima de 70% para a maioria dos atributos. As combinações de óleos essenciais e nisina Z testadas foram eficientes para a redução significativa da população de *E. coli* O 157:H7 em linguiça mista frescal em comparação aos grupos controles. As combinações desses antimicrobianos também se mostraram efetivas em manter a estabilidade da linguiça mista frescal pelo controle do crescimento de bactérias lácticas deteriorantes e pela manutenção da cor vermelha e do pH das linguiças, apresentando-se sensorialmente aceitas pelos provadores.

2.1. Introdução

No Brasil, as linguiças, juntamente com as salsichas e mortadelas representam 81,6% do volume de produtos cárneos produzidos. Em 2013, as indústrias brasileiras de embutidos produziram um volume de 1.403.903 toneladas, movimentando um total de 7,9 bilhões de reais (IBGE, 2013).

O processo de fabricação de linguiça é geralmente simples, não exigindo tecnologia sofisticada. Contudo, devido à sua elevada atividade de água e ao fato de não serem submetidas a tratamento térmico durante o processamento, as linguiças frescas são suscetíveis à deterioração microbiana e normalmente apresentam reduzida vida-de-prateleira (Terra, 1998).

Entre os microrganismos responsáveis pela deterioração e contaminação dos produtos cárneos, as bactérias da família Enterobacteriaceae estão frequentemente presentes na matéria-prima carne (Cervený et al., 2009), podendo incluir gêneros patogênicos como *Salmonella*, *Campylobacter* e *Escherichia coli* (Sofos & Geonaras, 2010).

Entre as cepas de *E. coli*, o sorotipo O157:H7 é um dos mais preocupantes, pois uma baixa população desse microrganismo pode causar diarreia e colite hemorrágica em humanos e evoluir para a chamada síndrome hemolítica urêmica (Otero, 2014). A presença de *E. coli* O157:H7 já foi relatada em surtos alimentares que envolviam carne bovina mal cozida e outros produtos à base de carne, além de leite cru, frutas e vegetais (Erickson et al., 1995; Beuchat, 1996; Tauxe et al., 1997). Nos Estados Unidos, vários casos têm sido relatados ao longo dos anos. Segundo dados do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC, 2016), em 2013 foram relatados 33 casos envolvendo saladas prontas, 12 casos em 2014 envolvendo carne moída, 19 casos em 2015 envolvendo salada de frango e 09 casos em 2016 envolvendo broto de alfafa.

Além do controle de patógenos, o controle de bactérias deteriorantes nas linguiças é comercialmente importante para garantir estabilidade ao produto e extensa vida-de-prateleira. Entre as bactérias deteriorantes de maior importância em embutidos e outros produtos cárneos armazenados sob refrigeração estão as bactérias lácticas (Niven, 1986; Nychas et al, 2008).

Visando diminuir o risco microbiológico dos alimentos aliado à busca por compostos naturais que permitam reduzir o uso de aditivos sintéticos nos alimentos, os óleos essenciais e os peptídeos antimicrobianos têm despertado interesse como conservantes naturais (Burt, 2004; Holley & Patel, 2005). Os óleos essenciais apresentam uma ampla atividade antimicrobiana contra diferentes tipos de bactérias como *E.coli* O157:H7, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *Y. enterocolitica*, *P. vulgaris* entre outros microrganismos (Burt, 2004; Nuryastuti et al., 2009; Tiwari et al., 2009; Silveira et al., 2012; Andrade et al., 2014).

Dentre os componentes químicos antimicrobianos presentes nos óleos destacam-se: terpenos (ex. p-cimeno), terpenóides (ex. timol, carvacrol), fenilpropenos (ex. eugenol, cinamaldeído) e outros compostos contendo enxofre e nitrogênio em sua composição (ex. isotiocianato de alila, alicina) (Hyldgaard et al., 2012).

Devido à sua alta volatilidade, a adição de óleos essenciais nos alimentos pode causar alterações sensoriais indesejáveis (Lis-Balchin et al., 1998), por isso, o uso de óleos essenciais extraídos de plantas utilizadas como condimento no alimento alvo é uma forma de reduzir a repercussão sensorial negativa. Dessa forma, os óleos de essenciais de alho e de mostarda poderiam ser indicados para aplicação neste tipo de produto. O uso do alho pode aumentar a vida-de-prateleira dos alimentos apresentando ação antibacteriana e antioxidante (Abubakar, 2009; Fujisawa et al., 2009; Alorainy, 2011; Wu et al, 2015; Horita et al., 2016). Quanto ao óleo essencial de mostarda, alguns autores relatam que esse óleo apresenta a propriedade de reduzir o pH no interior da célula de bactérias como *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* (Nadarajah et al., 2005; Turgis et al., 2008).

Adicionalmente à estratégia de utilizar óleos extraídos de plantas usadas como condimentos, a combinação de seu uso ao de peptídeos antimicrobianos como a nisina em linguiça, pode possibilitar a redução da quantidade de óleo essencial utilizado, mantendo a eficiência antimicrobiana. Além disso, a nisina possui ação preferencialmente contra bactérias Gram positivas (Breukink et al., 1999; Brotz & Sahl, 2000), que poderia favorecer o controle de bactérias lácticas deteriorantes sem afetar as características sensoriais do alimento

(Kuwano et al., 2005). Neste sentido, a combinação de óleos essenciais e nisina em linguiça frescal pode ser uma estratégia natural para inibição tanto de bactérias Gram positivas quanto Gram negativas, aumentando a inocuidade e podendo prolongar a vida-de-prateleira desse produto (Trajano et al., 2009; Mathenjwa et al., 2012).

Os objetivos desse estudo foram 1) avaliar o efeito inibitório *in vitro* da combinação de isotiocinato de alila, do óleo de alho e da nisina Z contra um *pool* de cepas de *E. coli* O157:H7 e *Lactobacillus plantarum* e 2) avaliar a aplicação desses compostos naturais sobre a estabilidade microbiológica (*E. coli* O157:H7, *E. coli* autóctone, bactérias lácticas e aeróbios psicrotóxicos) e físico-química (pH e cor) de linguiça mista frescal.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Compostos orgânicos e cepas bacterianas

O isotiocianato de alila (ITA), 95%, foi adquirido da empresa Sigma Aldrich Chemical Co, Inc. (St. Louis, EUA). O óleo de alho (AO) foi adquirido da empresa Zhengzhou Sigma Chemical Co. LTD. (Henan, China) e, conforme especificação do fabricante, o AO foi obtido por destilação a vapor, com a seguinte composição: 51,8% de alicina, 0,3% de umidade e 47,9% de outros compostos tio-éster (alil sulfito e alil disulfito). A nisina Z (NI), 2,5%, foi adquirida da empresa Handary (Bruxelas, Bélgica).

As cepas de *E. coli* O157:H7 (02-0627, 02-0628, 00-0381, 02-0304 e NM 02-1840) foram cedidas pelo Professor Richard A. Holley do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade de Manitoba, Winnipeg, Canadá. Todas as cepas eram não portadoras dos genes *stx1* e *stx2*.

Um *pool* de *L. plantarum*, composto por cepas indígenas (194, 201, 202, 212 e 227), isoladas de embutidos cárneos artesanais e pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Tecnologia de Produtos Agropecuários (LTPA), foi utilizado como modelo de bactéria láctica nos testes *in vitro* da atividade antimicrobiana dos compostos naturais.

2.3 Atividade Antimicrobiana *in vitro*

2.3.1 Preparo dos inóculos bacterianos

As cepas de *E. coli* O157:H7 foram mantidas congeladas em solução de caldo TSB (Tryptone Soya Broth – Himedia Laboratories Pvt. Ltd, Mumbai, Índia) e glicerol (proporção de 75:25) a -80 °C. A cada 30 dias, as cepas eram reativadas em caldo TSB a 37 °C por 24 horas e mantidas a 4 °C para a composição do *pool*. O *pool* das cepas de *E. coli* O157:H7 foi obtido pela adição de 100 µL de cada cepa isolada, mantida em caldo TSB, em 9,5 mL de caldo TSB estéril com pH ajustado em 6,0. Essa preparação era incubada em estufa a 37 °C por cerca de 5 horas até a obtenção de população microbiana com contagem de células entre 10⁷ a 10⁸ UFC/mL verificada em comparação com a escala de McFarland (valor 0,5).

O *pool* de *L. plantarum* era constituído pela pipetagem de 20 µL de cada cepa isolada, mantida em caldo MRS (KASVI, Paraná, Brasil), em 9,5 mL de caldo MRS estéril. Essa preparação era incubada em estufa a 37 °C por cerca de 3 horas até a obtenção de população microbiana com contagem de células entre 10⁷ a 10⁸ UFC/mL verificada em comparação com a escala de McFarland (valor 0,5).

2.3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) de combinações dos compostos antimicrobianos

As doses de ITA e AO utilizadas nos testes de combinação com NI contra os microrganismos alvo partiram de valores de CIM definidos em experimento anterior (dados não publicados) da associação de ITA e OA sobre *E. coli* O 157:H7. Nesse estudo, verificou-se interação sinérgica entre os óleos essenciais ITA e AO na inibição de *E. coli* O 157:H7 (Índice de concentração inibitória fracionada - IFIC = 0,31, calculado de acordo com metodologia descrita por Palaniappan e Holley, 2010), com o uso de 0,0125 µL/mL de ambos os óleos essenciais. Partindo-se desses valores de CIM dos óleos,

foram realizados testes em combinação dos óleos com nisina Z nas doses de 125 UI/mL (0,12 mg/mL) e 250 UI/mL (0,24 mg/mL).

Para os testes de combinação dos óleos e NI, foi preparada uma solução mãe de cada óleo contendo 20 µL de óleo + 980 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para facilitar sua solubilização. A partir dessa solução, para o desafio de *E. coli* O157:H7, foram preparados tubos com capacidade de 10 mL contendo 80 µL do inóculo em caldo TSB ajustado a pH 6,0 sendo os tratamentos: T1 (0,24 mg/mL NI + 0,0125 µL/mL ITA + 0,0125 µL/mL AO), T2 (0,24 mg/mL NI + 0,00625 µL/mL ITA + 0,00625 µL/mL AO), T3 (0,24 mg/mL NI + 0,0125 µL/mL ITA + 0,00625 µL/mL AO), T4 (0,24 mg/mL NI + 0,00625 µL/mL ITA + 0,0125 µL/mL AO), T5 (0,24 mg/mL NI + 0,00312 µL/mL ITA + 0,00312 µL/mL AO) e T6 (0,12 mg/mL NI + 0,00625 µL/mL ITA + 0,00625 µL/mL AO). Tubos contendo o inóculo e o caldo de cultivo, sem a adição dos antimicrobianos, também foram preparados (grupo controle). Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 h. Após a incubação, procedeu-se a diluição seriada e semeadura das diluições em placas com ágar Sorbitol MacConkey (HIMEDIA, Mumbai, Índia), com incubação a 37 °C por 24 h para a contagem de *E. coli* O157:H7. Os resultados das contagens foram expressos em log UFC/g.

A CIM foi definida como a menor dose do antimicrobiano onde se obteve redução da contagem do microrganismo alvo >90% (~1 log) e a CBM foi definida como a menor dose do antimicrobiano onde se obteve redução da contagem do microrganismo alvo >99.9% (~3 log) (Perricone et al, 2015). O mesmo procedimento foi realizado com o *pool* de *L. plantarum*, utilizando caldo e ágar MRS para o cultivo e isolamento das colônias, respectivamente, que foram contadas após incubação das placas a 37 °C por 48 horas.

2.3.3 Fabricação de linguiça mista frescal

Foram produzidos cinco lotes de linguiça, sendo um lote sem a adição dos antimicrobianos (controle negativo), um lote sem antimicrobianos e inoculado com *E. coli* O157:H7 controle positivo) e três lotes contendo os antimicrobianos naturais e inoculados com *E. coli* O157:H7 (tratamentos). A concentração inicial

do patógeno inoculado nas massas de linguiça foi de aproximadamente 6 log UFC/g.

Os tratamentos foram distribuídos conforme descrição a seguir:

- CN (controle negativo) = somente formulação da linguiça;
- CP (controle positivo) = formulação da linguiça + inóculo *E. coli* O157:H7;
- T1 = formulação da linguiça + inóculo *E. coli* O157:H7 + 20 mg/kg nisina Z;
- T2 = formulação da linguiça + inóculo *E. coli* O157:H7 + 20 mg/kg nisina Z + 125 µL/kg OA + 62,5 µL/kg ITA;
- T3 = formulação da linguiça + inóculo *E. coli* O157:H7 + 20 mg/kg nisina Z + 62,5 µL/kg AO + 125 µL/kg ITA.

Cada lote de linguiça foi produzido utilizando a formulação comercial básica apresentada na Tabela 1. O pernil suíno e a paleta bovina foram moídos em moedor elétrico (PC-10, Eccel Metalúrgica, Brusque, SC, Brasil) com disco de 8 mm. Os ingredientes secos foram adicionados e misturados manualmente à massa por 2 minutos. Posteriormente, o *pool* de *E. coli* O157:H7, preparado conforme descrito anteriormente, foi adicionado à massa (1%) e misturado manualmente por 2 minutos. Os antimicrobianos foram adicionados ao final do preparo da massa, com posterior embutimento utilizando embutideira mecânica (Jamar modelo EFI, Tupã, SP, Brasil), em envoltório natural ovino (Brascase Alimentos, Fazenda Rio Grande, PR, Brasil), previamente sanitizado em solução de ácido láctico 10% por 30 minutos. As linguiças foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis (LB – Laborclin, modelo 570671, Vargem Grande, Pinhais, Paraná, Brasil) e mantidas sob refrigeração a 6 °C durante 20 dias.

Em intervalos de 5 dias, amostras de linguiças foram submetidas à análise microbiológica (contagem de *E. coli* O157:H7, contagem de *E. coli* autóctone, contagem de bactérias lácticas e contagem de aeróbicos psicrotróficos) e físico-química (determinação de pH e de cor instrumental).

O experimento foi realizado em duas repetições. As determinações microbiológicas foram realizadas em duplicata (n=4) e as determinações físico-químicas foram realizadas em triplicata (n=6).

Tabela 1. Formulação de linguiça mista frescal

Ingredientes	Quantidade (g/1000g)
Carne suína magra (pernil)	595
Carne bovina (paleta)	275
Água	100
Sal (NaCl)	24
Antioxidante (eritorbato de sódio)*	0,12
Cheiro verde em pó	1
Cebola em pó	2
Pimenta branca em pó	2
Noz moscada	0,26
Sal de cura (91%NaCl + 9%NaNO ₂)**	0,62

* Marca Food Pryme, Sorocaba, SP, Brasil. ** Marca BRC Ingredientes, Rio Claro, SP, Brasil

2.3.4 Análise microbiológica

Para a análise microbiológica, foram pesados assepticamente 25 g de linguiça, transferidos para sacos plásticos estéreis contendo 225 mL de água peptonada 0,1% (HIMEDIA, Mumbai, Índia) e homogeneizados em *Stomacher* (IUL Instruments, Barcelona, Espanha). A partir dessa primeira diluição (10^{-1}), foram preparadas diluições subseqüentes e semeadas em superfície em ágar Sorbitol McConkey (HIMEDIA, Mumbai, Índia), seguido de incubação a 37 °C por 24h para a contagem de *E. coli* O157:H7 e de *E. coli* autóctone. As colônias com coloração rosa clara semelhante à do meio de cultura foram identificadas como presuntivas para *E. coli* O157:H7, visto que esse microrganismo possui como característica a fermentação retardada de D-sorbitol (Thompson et al., 1990). As colônias com coloração roxa foram identificadas como *E. coli* autóctone.

A contagem de bactérias lácticas foi realizada em ágar MRS (KASVI, Paraná, Brasil), após a semeadura das diluições em profundidade e incubação das placas a 37 °C por 48h. A contagem de microrganismos aeróbios psicotróficos foi realizada com ágar PCA (HIMEDIA, Mumbai, Índia), após semeadura em superfície e incubação das placas sob refrigeração a 6 °C por 7 dias. Os resultados foram expressos em log UFC/ g.

2.3.5 Determinação de pH

Foi utilizado um pHmetro (HI253 Hanna Instruments, Dallas, Texas, USA), onde o eletrodo era inserido em 3 pontos aleatórios do gomo de linguiça, de acordo com metodologia descrita no Manual de Análises do Instituto Adolf Lutz (Ial, 2008).

2.3.6 Determinação de cor instrumental

A cor foi avaliada utilizando o método da ASTM International (2001) com o auxílio de colorímetro portátil (Konica Minolta CR 410, Tokyo, Japan) e coordenadas de cor L^* , a^* e b^* . A medição foi realizada pela média de 3 avaliações diretamente sobre a superfície das amostras utilizando fonte de luz D_{65} , diâmetro de abertura de 50 a 53 mm e ângulo de observação de 2° . A partir dos resultados de a^* e b^* , foram calculados os valores de hue ($h = \text{ARCTAN}(b/a)$), que indicam intensidade de descoloração, e C^* (croma) ($c = \sqrt{a^2 + b^2}$), que indicam saturação de cor.

2.3.7 Análise sensorial

Para a análise sensorial, foram elaboradas três formulações de linguiça mista frescal. Uma formulação controle, formulada com carne bovina, suína e condimentos, sem a adição dos compostos naturais e outras duas formulações elaboradas com os mesmos ingredientes, porém com adição dos óleos essenciais e de nisina Z em diferentes concentrações, conforme as doses definidas no experimento com linguiça. O preparo das linguiças seguiu o mesmo procedimento descrito anteriormente, porém, sem a adição do *pool* de *E. coli* O157:H7.

As massas de linguiça de cada tratamento foram cozidas em grelha elétrica (Oster, modelo 4777-33, Chicago, IL, EUA) até atingir a temperatura interna de 71°C . Posteriormente, foram porcionadas em fatias de aproximadamente 1 cm e apresentadas a 100 provadores não treinados (32 homens, 68 mulheres com idades entre 18 e 50 anos) para avaliação de cor,

odor, textura, sabor e avaliação global. O teste afetivo de aceitabilidade foi realizado com aplicação de escala hedônica estruturada de nove pontos e utilizado para avaliar o quanto os provadores gostaram ou desgostaram dos atributos de cor, odor, textura, sabor e avaliação global das amostras, utilizando ficha de análise (Dutcosky, 2014).

A análise sensorial foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o número de protocolo 1.675.506.

2.3.8 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa Statgraphics Centurion XVI versão 16.1.11. O resultado obtido no experimento foi analisado por ANOVA e as médias comparadas por teste de Tukey adotando nível de significância 5%.

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1 Atividade antimicrobiana *in vitro* dos compostos naturais

Os resultados do efeito da associação de óleos essenciais e nisina Z sobre *E. coli* O157:H7 e *L. plantarum in vitro* estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Contagem de *E. coli* O157:H7 (log UFC/g) *in vitro*, em função da associação de diferentes doses dos antimicrobianos

Tempo (h)	C	T1	T2	T3	T4	T5	T6
24	10,40	2	4,62	2	2	6,69	4,93
Redução logarítmica*		8,4	5,78	8,4	8,4	3,71	5,47

* em relação ao controle; C = controle, T1 = 0,24 mg/mL NI + 0,0125 µL/mL ITA + 0,0125 µL/mL AO, T2 = 0,24 mg/mL NI + 0,00625 µL/mL ITA + 0,00625 µL/mL AO, T3 = 0,24 mg/mL NI + 0,0125 µL/mL ITA + 0,00625 µL/mL AO, T4 = 0,24 mg/mL NI + 0,00625 µL/mL ITA + 0,0125 µL/mL AO, T5 = 0,24 mg/mL NI + 0,00312 µL/mL ITA + 0,00312 µL/mL AO, T6 = 0,12 mg/mL NI + 0,00625 µL/mL ITA + 0,00625 µL/mL AO

Tabela 3. Contagem de *L. plantarum* (log UFC/g) *in vitro*, em função da associação de diferentes doses dos antimicrobianos

Tempo (h)	C	T1	T2	T3	T4	T5	T6
24	8,11	2,51	5,0	2,6	2,67	7,08	5,45
Redução logarítmica*		5,6	3,11	5,51	5,44	1,06	2,66

* em relação ao controle; C = controle, T1 = 0,24 mg/mL NI + 0,0125 µL/mL ITA + 0,0125 µL/mL AO, T2 = 0,24 mg/mL NI + 0,00625 µL/mL ITA + 0,00625 µL/mL AO, T3 = 0,24 mg/mL NI + 0,0125 µL/mL ITA + 0,00625 µL/mL AO, T4 = 0,24 mg/mL NI + 0,00625 µL/mL ITA + 0,0125 µL/mL AO, T5 = 0,24 mg/mL NI + 0,00312 µL/mL ITA + 0,00312 µL/mL AO, T6 = 0,12 mg/mL NI + 0,00625 µL/mL ITA + 0,00625 µL/mL AO

Entre as diferentes doses das combinações de antimicrobianos verificou-se que os tratamentos T1, T2, T3 e T4, nos quais a dose de NI foi de 0,24 mg/mL e a dos óleos variou de 0,00625 µL/mL a 0,0125 µL/mL, obtiveram alta redução logarítmica (> 3 log UFC/mL) de ambos os microrganismos desafiados (*E. coli* O157:H7 e *L. plantarum*). Por sua vez, a manutenção das doses dos óleos essenciais (0,00625 µL/mL) associada à redução em ½ da dose de NI (0,12 mg/mL) usada no T6, continuou apresentando alta redução de *E. coli* O157:H7 (> 3 log UFC/mL), porém com mediana redução na contagem de *L. plantarum* (1 a 3 log UFC/mL). A manutenção da dose de NI (0,24 mg/mL) com redução em ¼ das doses dos óleos (0,00312 µL/mL), usada no T5, manteve a alta redução da população de *E. coli* O157:H7 (>3 log UFC/mL), porém apresentou a menor ação inibitória sobre *L. plantarum*, com baixa redução da população (~1 log UFC/mL) (Burt, 2004)

Contrário ao observado no presente estudo em que se verificou ação antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7 e *L. plantarum* da NI em combinação com óleos essenciais, Olasupo et al. (2003) não observaram efeito antimicrobiano da nisina sobre *E. coli* e *S. Typhimurium in vitro* em combinação com outros compostos naturais (timol, carvacrol, eugenol, ácido cinâmico e diacetil).

No estudo de Zou et al. (2013) verificou-se efeito antimicrobiano e sinergismo entre nisina e isotiocianato de alila *in vitro* sobre algumas bactérias patogênicas. Após 24 h de incubação, houve redução de 1,28 log UFC/mL de *Salmonella Typhimurium* e 2,12 log UFC/mL de *Shigella boydii* com o uso de doses >640 UI/mL de nisina + 1,28 µL/mL de isotiocianato de alila. No presente estudo, os valores de redução encontrados para todos os tratamentos, exceto o T5 para *L. plantarum*, foram superiores aos relatados por Zou et al. (2013) com o uso de doses de ITA e de NI, em concentrações cerca de 400 vezes e 2,5

vezes inferiores (250 UI/mL), respectivamente, às doses utilizadas pelos autores.

Nos estudos *in vitro* realizados por Kruger (2006) e Rohani et al (2011) verificou-se para a combinação de óleos essenciais e nisina contra *Listeria monocytogenes*, valores de CIM de 5 µL/mL (óleo de orégano) + 6 mg/mL (nisina) e de 0,1 µL/mL (óleo de alho) + 12,5 UI/mL (nisina). O estudo de Kruger (2006) verificou dose inibitória *in vitro* de nisina (6 mg/mL) em combinação com óleo de orégano contra sobre *L. monocytogenes* 25 vezes superior à do presente estudo. Por sua vez, a CIM do óleo de alho encontrada por Rohani et al (2011) foi 8 vezes superior à maior dose desse mesmo óleo utilizada no presente estudo para inibição de *L. plantarum*. Contudo, para a nisina, a dose de CIM encontrada por Rohani et al. (2011) foi 20 vezes inferior à dose utilizada do presente experimento (250 UI/mL nisina Z). Essa variação na ação antimicrobiana de nisina pode ser atribuída aos diferentes meios de cultivo utilizados para os testes *in vitro*. Murdoc et al (2006) afirmam que as altas concentrações de cátions divalentes, como Fe²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ e alguns sais (Bellamy et al, 1992; Ellison, 1994; Jones et al, 1994; Branem & Davidson, 2004), presentes no meio, podem dificultar a ação inibitória da nisina sobre os microrganismos e Kuwano et al (2005) sugerem que a presença elevada de NaCl (100 mM) no meio pode reduzir a atividade antimicrobiana da nisina contra *E. coli*, devido ao fato de a nisina apresentar vários aminoácidos catiônicos (Buchman et al, 1988). No presente experimento *in vitro*, o meio TSB, utilizado para o desafio de *E. coli* O 157:H7 apresentou concentração de 75 mM de NaCl, o que também pode ter contribuído para a obtenção de maior dose inibitória em comparação ao obtido por Rohani et al. (2011).

Os resultados dos testes *in vitro* comprovam o efeito inibitório da associação de AO, ITA e NI sobre *E. coli* O157:H7 e *L. plantarum*. Tendo em vista que as maiores reduções na população desses microrganismos foram obtidas nos tratamentos T1, T3 e T4, os dois últimos tratamentos foram selecionados para serem testados em linguiça, visto que nesses tratamentos as doses dos óleos essenciais eram inferiores às utilizadas no T1.

2.4.2 Efeito dos compostos naturais sobre a estabilidade de linguiça mista frescal

Quando aplicados em alimentos, as doses dos compostos antimicrobianos obtidas *in vitro* devem ser extrapoladas para se adquirir o mesmo efeito na matriz alimentar (Shelef, 1983; Smid & Gorris, 1999). O aumento das doses dos óleos essenciais obtidas *in vitro* no presente estudo justifica-se pelas características da matriz cárnea, que é composta por lipídios, proteínas e outros componentes que podem interagir quimicamente com os óleos essenciais, influenciando e reduzindo sua ação. Devido a sua natureza lipofílica, os óleos se dissolvem na porção oleosa dos alimentos, tornando-se menos disponíveis para agir contra as bactérias presentes na porção aquosa (Mejholm & Dalgaard, 2002; Tassou et al., 2004). Nas linguiças, as doses dos óleos essenciais de alho e isotiocianato de alila foram extrapoladas em 10 vezes, referindo-se ao estudo de Pandit e Shelef (1994) que aumentaram os compostos naturais antimicrobianos na mesma proporção para aplicação em linguiça de fígado suíno.

Segundo recomendação do *Codex Alimentarius*, a aplicação da nisina em produtos cárneos processados não deve exceder a dose de 25 mg/kg (General Standard For Food Additives, Codex Stan Review 2015). Considerando-se esse fato, a dose de nisina escolhida para aplicação na linguiça mista frescal foi de 20 mg/kg a qual poderia apresentar-se como dose inibitória visto que a menor dose testada *in vitro* foi considerada como bactericida contra os agentes patogênicos *E. coli* O157:H7 e *L. plantarum*.

2.4.3 Análises microbiológicas

As contagens microbianas de *E. coli* O157:H7 ao longo do período de armazenamento da linguiça mista frescal sob refrigeração estão apresentadas na Figura 1.

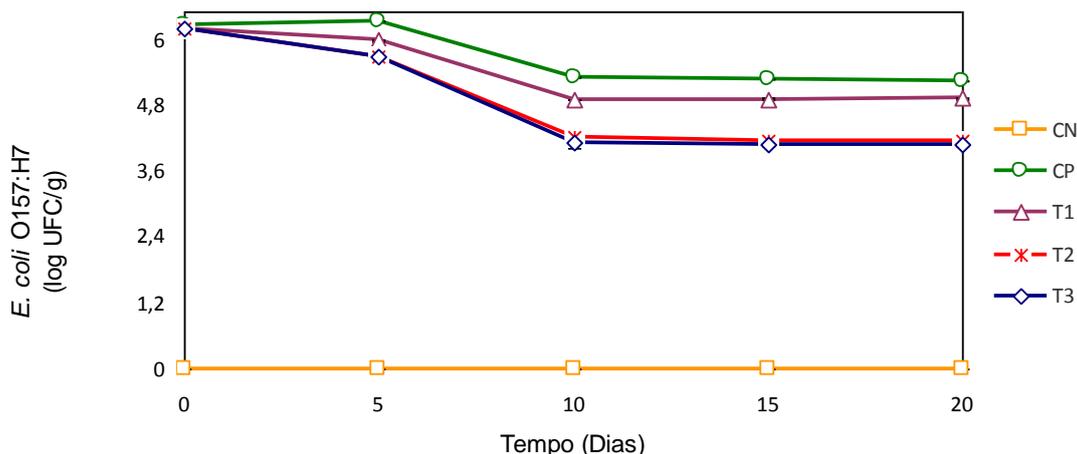


Figura 1. Médias das contagens de *E. coli* O157:H7 em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração. CN = controle negativo, CP = controle positivo, T1 = 20 mg/kg NI, T2 = 20 mg/kg NI + 125 µL/kg AO + 62,5 µL/kg ITA, T3 = 20 mg/kg NI + 62,5 µL/kg AO + 125 µL/kg ITA..

A contagem inicial da população de *E. coli* O157:H7 nas amostras foi de aproximadamente 6,2 log UFC/g sendo que a contagem desse patógeno, a partir do 5º dia, foi significativamente ($P < 0,05$) inferior nas amostras contendo a combinação de nisina Z e óleos essenciais em relação às amostras sem adição dos antimicrobianos naturais (CN e CP) ou adicionada somente de nisina Z (T1). As reduções na contagem de *E. coli* O 157:H7, ao final de 20 dias de armazenamento, nos tratamentos 1, 2 e 3 foram de 1,29, 2,06 e 2,12 log UFC/g, respectivamente, em comparação ao CP.

Nos estudos de Chacon (2006), Solomakos et al. (2008) e Djenane et al. (2012), os autores realizaram testes contra *E. coli* O157:H7 em carne moída. Foram utilizados óleo essencial de lavanda (2 µL/g), óleo essencial de hortelã (1 µL/g), óleo essencial de tomilho (6 µL/g) em associação com nisina (500 UI/g e 1000 UI/g) e ITA microencapsulado (4,98 µL/g) e as reduções da população do patógeno variaram de 3,1 log UFC/g a 5,07 log UFC/g. Embora todas as reduções tenham sido superiores à maior redução encontrada no presente estudo (2,12 log UFC/g), as doses dos óleos essenciais utilizadas pelos autores foram de 16 a 96 vezes maiores bem como as doses de nisina foram de 25 a 50 vezes superiores as doses do presente estudo.

Moreira et al. (2007) e Rounds et al. (2012) utilizaram óleo de melaleuca (15 µL/g e 20 µL/g), extrato de oliva (50 µL/g), óleo essencial de capim-limão (10 µL/g) e óleo essencial de cravo (10 µL/g) a fim de inibir a proliferação de *E. coli* O157:H7 em carne moída e hambúrguer bovino cozidos. Verificou-se reduções do agente patogênico entre 1 log UFC/g a 3,5 log UFC/g. Vale salientar que as doses utilizadas por esses autores foram 80 a 800 vezes superiores às utilizadas de ITA e AO no presente estudo o qual apresentou redução de *E. coli* O157:H7 entre 2,06 log UFC/g e 2,12 log UFC/g.

No estudo de Wan Norhana et al. (2012) verificou-se que o uso de nisina (500 UI/g) em associação com EDTA (0,02 M) e diacetato de sódio (3%) em camarão inoculado com *L. monocytogenes* reduziu o agente patogênico em 1,11 log UFC/g no tempo final do experimento (7^o dia). No presente estudo, T1, T2 e T3 apresentaram reduções de *E. coli* O157:H7 de 1,31 log UFC/g, 1,98 log UFC/g e 2,08 log UFC/g respectivamente no 10^o dia. Essas reduções são superiores a verificada por Wan Norhana et al (2012) mesmo os autores tendo utilizado 480 UI/g a mais de nisina que no presente experimento (20 UI nisina Z pura).

Para a contagem de *E. coli* autóctone (Figura 2), verificou-se que nos tratamentos 2 e 3 a população desse microrganismo foi reduzida a níveis indetectáveis após 10 dias de estocagem, enquanto que no tratamento contendo somente nisina, essa redução foi alcançada no 15^o dia. As linguiças do CN e CP somente alcançaram esses valores de redução, ao final de 20 dias de estocagem. Nesse período, em todos os tratamentos, os valores para contagem de *E. coli* foram inferiores ao tolerado pela legislação brasileira, RDC nº 12/ 2001, (Brasil, 2001) para coliformes a 45°C/g.

Assim como no presente estudo, Lemay et al. (2002), observaram redução gradual de *E. coli* em carne de frango sob todas as condições testadas (controle, lactato de sódio e óleo essencial de mostarda). Após 14 dias, as contagens de *E. coli* foram próximas ou abaixo do nível de detecção (<1 log UFC/g) para todos os tratamentos, incluindo o controle.

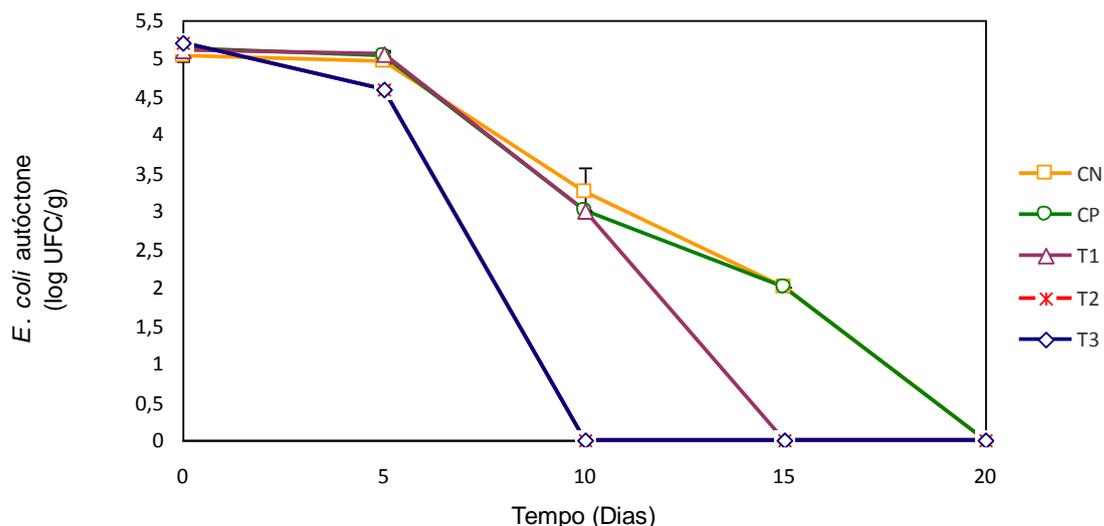


Figura 2. Médias dos valores das contagens de bactérias *E. coli* autóctones em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração. CN = controle negativo, CP = controle positivo, T1 = 20 mg/kg NI, T2 = 20 mg/kg NI + 125 µL/kg AO + 62,5 µL/kg ITA, T3 = 20 mg/kg NI + 62,5 µL/kg AO +125 µL/kg ITA.

Embora a adição de antimicrobianos tenha promovido redução média de *E. coli* O157:H7 em linguiça (1 a 3 log UFC/ g), verificou-se ação inibitória significativa dos compostos naturais sobre a população de *E. coli* autóctone presente no embutido, com alta redução da contagem, superior a 3 log UFC/g. A menor redução sobre o *pool* de *E. coli* O 157:H7 pode ter relação com a concentração inicial do patógeno inoculada nas linguiças (>6 log UFC/g), a qual não é comum de ocorrer naturalmente nesse tipo de produto cárneo. Dessa forma, o uso combinado dos OE e NI nas concentrações testadas neste trabalho podem ser considerados eficientes para a redução da contaminação por *E. coli* naturalmente presente em linguiça.

Em relação à contagem de bactérias lácticas (Figura 3), diferentemente do constatado para *E. coli* O 157:H7, todas as linguiças adicionadas de NI, incluindo as do T1 apresentaram redução significativa em comparação aos grupos controle (CN e CP) a partir do 5º dia de estocagem ($P < 0,05$). Nesses tratamentos, as contagens de bactérias lácticas foram reduzidas para valores inferiores a 6 log UFC/ g, a partir do 10º dia, permanecendo constantes até o final da estocagem. Esse valor é considerado como limite máximo para a

contagem de bactérias lácticas como indicadora de deterioração em produtos cárneos. Diferentemente do resultado do presente estudo, Silveira et al. (2014) observaram aumento na população de bactérias lácticas ao longo de 14 dias de estocagem em linguiça fresca adicionada de óleo essencial de louro (0,5 $\mu\text{L/g}$ e 1 $\mu\text{L/g}$). Nesse produto, os autores observaram contagem de bactérias lácticas superior a 7 log UFC/g ao final da estocagem em todos os tratamentos (controle e com adição de óleo de louro) e não constaram ação significativa dos tratamentos com óleos essenciais sobre a população láctica.

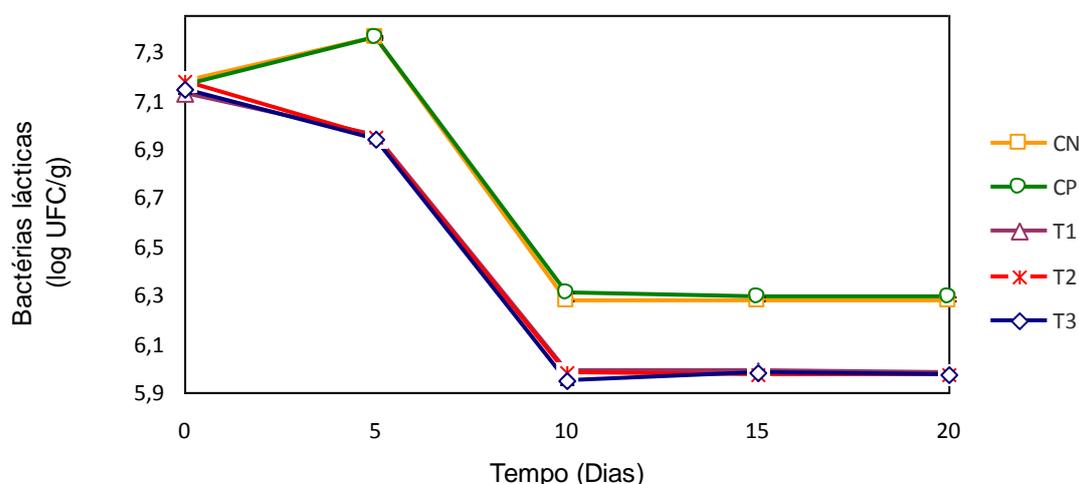


Figura 3. Médias dos valores das contagens de bactérias lácticas em linguiça mista fresca adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração. CN = controle negativo, CP = controle positivo, T1 = 20 mg/kg NI, T2 = 20 mg/kg NI + 125 $\mu\text{L/kg}$ AO + 62,5 $\mu\text{L/kg}$ ITA, T3 = 20 mg/kg NI + 62,5 $\mu\text{L/kg}$ AO + 125 $\mu\text{L/kg}$ ITA.

A contagem inicial de microrganismos psicotróficos (Figura 4) nas amostras foi de aproximadamente 6 log UFC/g, sendo que os tratamentos não apresentaram efeito sobre essa população microbiana não havendo diferença significativa em relação aos controles, apresentando contaminação média de 6,13 log UFC/g. A microbiota psicotrófica em carnes é representada principalmente por bactérias dos gêneros *Aeromonas* e *Pseudomonas*, as quais se multiplicam rapidamente em ambientes com alta atividade de água, ambiente neutro e presença de oxigênio (Jeppesen, 1995), podendo se multiplicar ativamente em produtos embalados aerobicamente e formar parte

da microbiota dominante ao final do período de armazenamento (Mano et al., 2002).

O aumento na contagem de aeróbios psicrotróficos durante a estocagem refrigerada de linguiça frescal corrobora com os dados de Silveira et al (2014), que observaram aumento na contagem de psicrotróficos, partindo de 4 log UFC/g para >7 log UFC/g, em linguiças adicionadas de óleo de louro (*Laurus nobilis*) após 14 dias de estocagem. Tanto no estudo de Silveira et al (2014) quanto no presente estudo, pode-se verificar que os óleos essenciais e sua combinação com nisina Z não foram eficientes na redução desses microrganismos. O fato de as linguiças não terem sido embaladas a vácuo pode ter contribuído para o crescimento desse grupo de microrganismo no produto, pois a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está relacionada com a quantidade de oxigênio disponível. Isto pode ocorrer porque em atmosfera com baixa difusão de oxigênio, a ocorrência de alterações oxidativas nos óleos é menor ou porque as células que obtêm energia através de metabolismo anaeróbico são mais sensíveis a ação tóxica dos óleos essenciais (Paster et al, 1990).

No estudo de Tsigarida et al. (2000) verificou-se que o uso de embalagem a vácuo associado a presença de óleo essencial de orégano apresentou efeito sinérgico frente a inibição do microrganismo *L. monocytogenes* e da microbiota deteriorante de carne bovina. Os autores constataram que a dose de 8 µL/g de óleo de orégano obteve redução inicial de 2 a 3 log na microbiota deteriorante, entretanto foi possível observar que a inibição foi ainda mais eficiente nas amostras embaladas a vácuo com filme de baixa permeabilidade em comparação com as amostras armazenadas em condições aeróbias e amostras embaladas a vácuo com película altamente permeável.

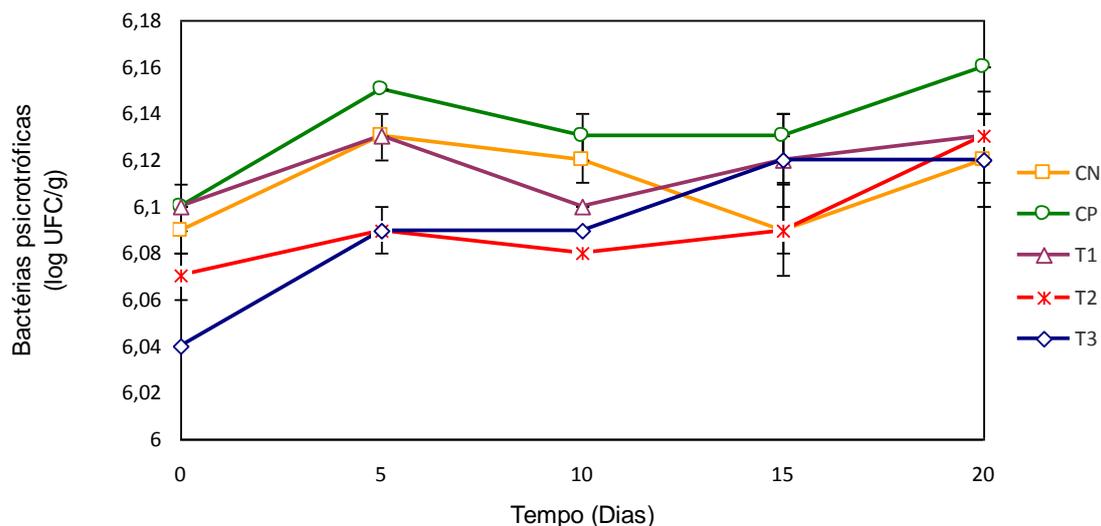


Figura 4. Médias dos valores das contagens de bactérias psicrotróficas em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração. CN = controle negativo, CP = controle positivo, T1 = 20 mg/kg NI, T2 = 20 mg/kg NI + 125 µL/kg AO + 62,5 µL/kg ITA, T3 = 20 mg/kg NI + 62,5 µL/kg AO +125 µL/kg ITA.

2.4.4 Análise físico-química

No que se refere ao pH (Figura 5), houve aumento dos valores ao longo da estocagem em todos os tratamentos. Houve diferença significativa entres os tratamentos (T2 e T3) e os controles ($P < 0,05$) nos tempos 5, 15 e 20 dias. Ao final do período de armazenamento, o pH das linguiças tratadas com a combinação dos compostos naturais (T2 e T3) apresentaram valores inferiores aos dos controles, com valores de 6,05 e 6,18, respectivamente. Esses valores de pH nas linguiças dos tratamentos 2 e 3 estão próximos aos valores iniciais (6,01), indicando estabilidade no pH ao longo da estocagem nesses tratamentos.

O aumento do pH verificado nas linguiças pode estar relacionado com a redução de bactérias lácticas, as quais possuem capacidade de aumentar a acidez da carne através de seu metabolismo (Delazari et al., 1977) e do aumento de bactérias psicrotróficas que podem usar compostos proteicos como fonte de energia levando à produção de amônia e, conseqüentemente, aumento o pH (Jay, 2000).

Nos estudos de Kitakawa (2002) e Figueiró (2013), ambos obtiveram declínio do pH nas linguças mista frescal e linguça suína frescal, respectivamente com associação ao aumento de bactérias lácticas. Entretanto, no estudo de Georgantelis (2007), houve aumento crescente de pH de 5,8 para 6,2 em linguça suína frescal sendo esse aumento associado à presença de enterobactérias e *Pseudomonas*.

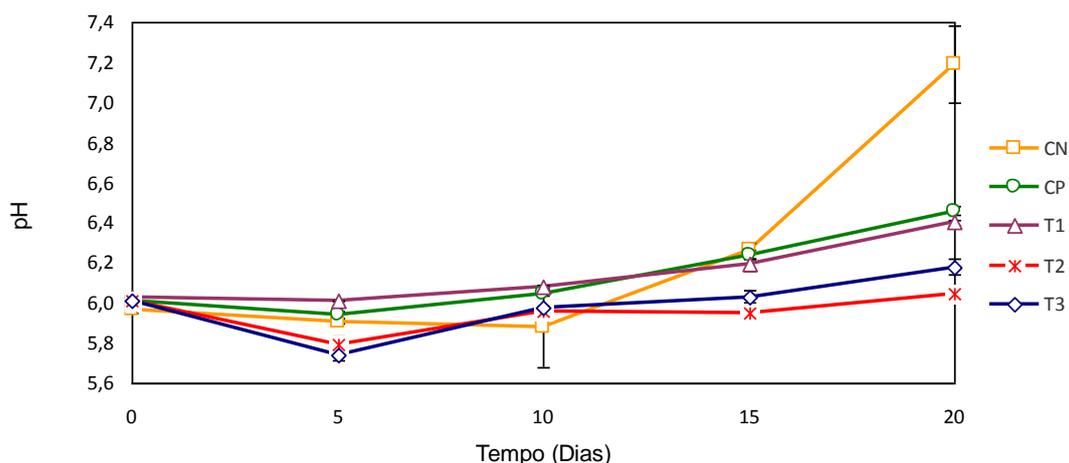


Figura 5. Médias dos valores de pH em linguça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração. CN = controle negativo, CP = controle positivo, T1 = 20 mg/kg NI, T2 = 20 mg/kg NI + 125 µL/kg AO + 62,5 µL/kg ITA, T3 = 20 mg/kg NI + 62,5 µL/kg AO + 125 µL/kg ITA..

Para as coordenadas C^* e h (Figura 6 e 7), que indicam a intensidade de cor (saturação) e a descoloração, respectivamente, verificou-se diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$) no final do tempo de armazenamento, com menores valores de C^* para as linguças dos tratamentos T2 e T3. Contudo, apesar da menor intensidade de cor, as linguças adicionadas de antimicrobianos (T1, T2 e T3) apresentaram menor descoloração (hue) em comparação às dos grupos controle (CN e CP). Como o chroma (C^*) dos alimentos representa a somatória de suas cores, tanto a cor vermelha quanto a amarela contribui para seus valores (AMSA, 2012). Nos grupos controle, os valores de cor amarela (Figura 9) foram superiores aos dos tratamentos, o que poderia explicar o maior valor de C^* . Por sua vez, a descoloração durante a estocagem é um atributo importante a ser considerado em produtos cárneos, representada por maiores valores de hue.

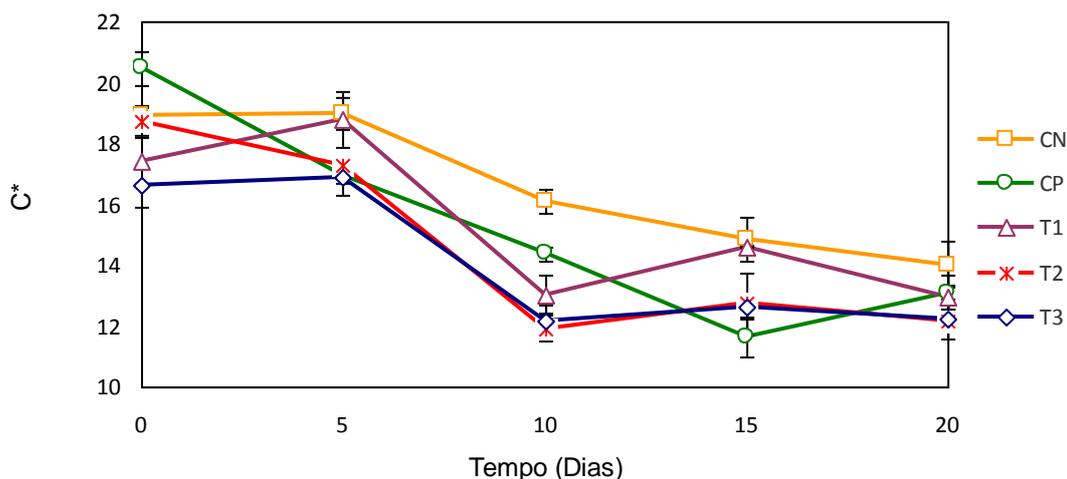


Figura 6. Médias dos valores da coordenada de cor C* em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração. CN = controle negativo, CP = controle positivo, T1 = 20 mg/kg NI, T2 = 20 mg/kg NI + 125 µL/kg AO + 62,5 µL/kg ITA, T3 = 20 mg/kg NI + 62,5 µL/kg AO +125 µL/kg ITA.

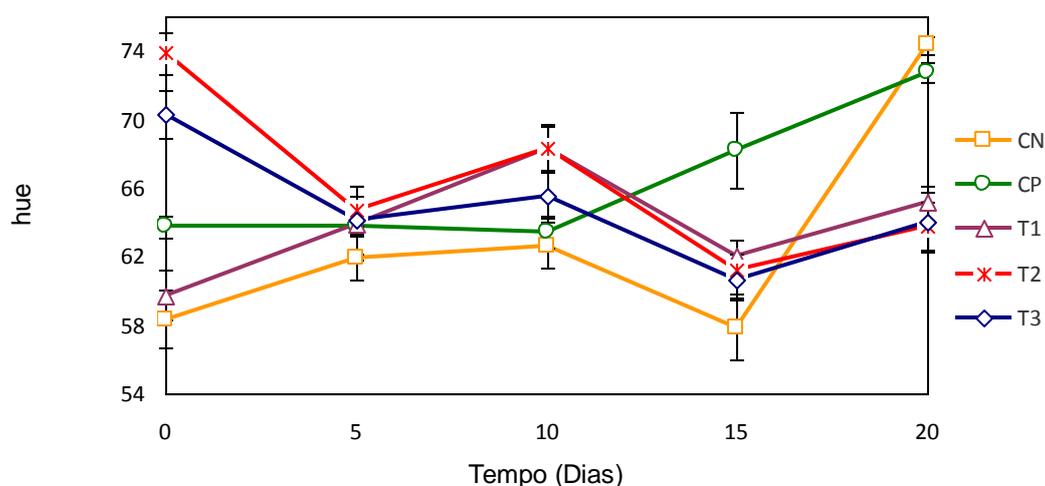


Figura 7. Médias dos valores da coordenada hue em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração. CN = controle negativo, CP = controle positivo, T1 = 20 mg/kg NI, T2 = 20 mg/kg NI + 125 µL/kg AO + 62,5 µL/kg ITA, T3 = 20 mg/kg NI + 62,5 µL/kg AO +125 µL/kg ITA.

Com relação à coordenada L* (Figura 8), todas as amostras apresentaram redução de luminosidade ao longo da estocagem. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos e os controles no 20º dia. No final do período de estocagem, as linguiças dos T2 e T3 apresentaram valores próximos de luminosidade e superiores às que receberam somente

adição de nisina Z pura. Essas diferenças podem ter ocorrido devido à heterogeneidade de cor das amostras, com presença de porções mais claras e mais escuras, que é característica inerente às linguiças.

O presente estudo está em acordo com os resultados de Chiavaro et al. (2008) que verificaram redução na luminosidade de linguiça suína frescal ao longo de 15 dias de estocagem. Por sua vez, Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero (2010) verificaram aumento do valor de luminosidade (L^*) com posterior estabilidade até o final do experimento.

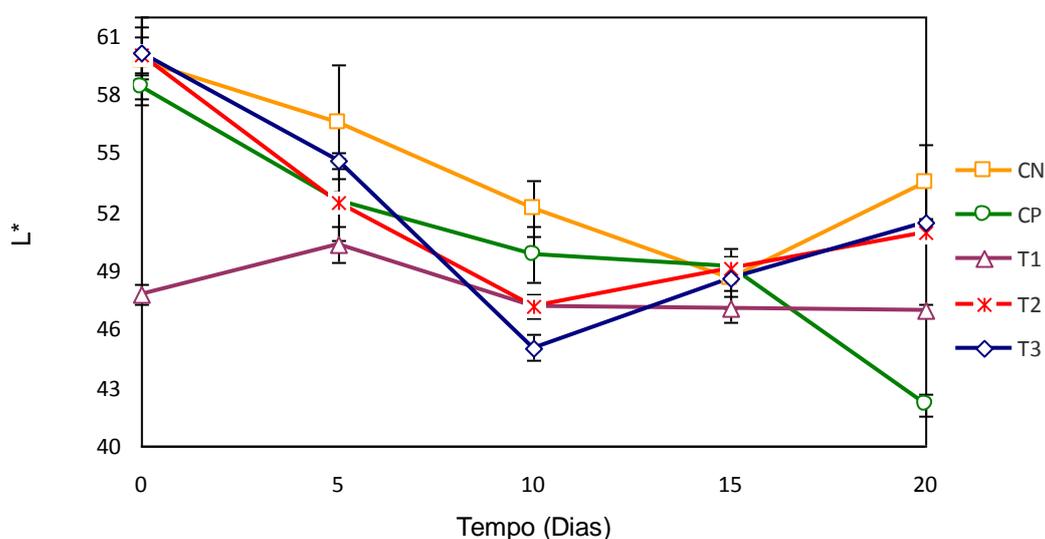


Figura 8. Médias dos valores de luminosidade em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração. CN = controle negativo, CP = controle positivo, T1 = 20 mg/kg NI, T2 = 20 mg/kg NI + 125 μ L/kg AO + 62,5 μ L/kg ITA, T3 = 20 mg/kg NI + 62,5 μ L/kg AO + 125 μ L/kg ITA.

Com relação à coordenada a^* (Figura 9), que indica a intensidade da coloração vermelha do produto, houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as linguiças adicionadas dos antimicrobianos e as dos grupos controle ao longo do período de armazenamento. Ao final da estocagem, as linguiças do T1, T2 e T3 apresentaram maiores valores para a cor vermelha em comparação aos controles demonstrando diferença significativa ($P < 0,05$).

O armazenamento das linguiças em temperatura refrigerada e a atividade antioxidante dos óleos essenciais (Liu et al., 2009) podem ter influenciado na estabilidade da coloração do produto uma vez que a ação

antioxidante dos óleos essenciais pode ser atribuída à sua propriedade de sequestrar radicais livres, além de inibir enzimas hidrolíticas e oxidativas, mantendo a cor dos produtos tratados (Burt, 2004; Bakkali et al., 2008; Tajkarimi et al., 2010).

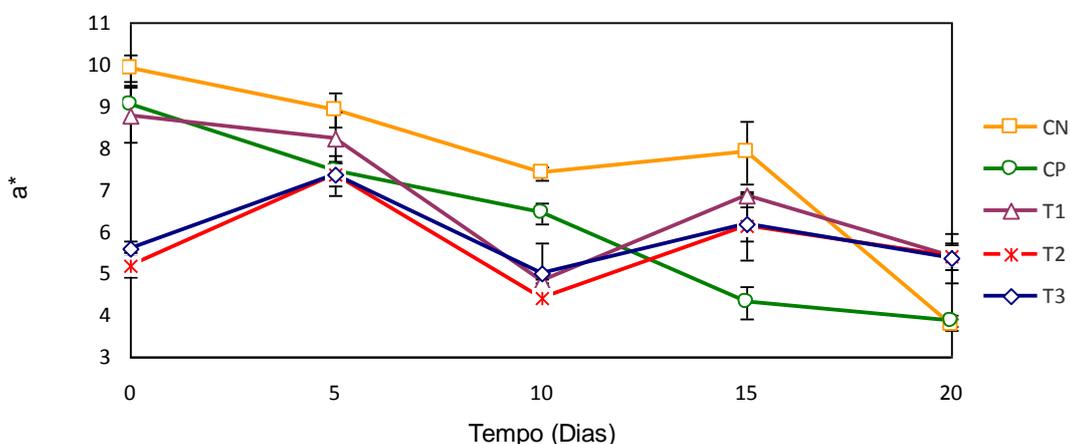


Figura 9. Médias dos valores da coordenada de cor a^* em linguiça mista frescal adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração. CN = controle negativo, CP = controle positivo, T1 = 20 mg/kg NI, T2 = 20 mg/kg NI + 125 µL/kg AO + 62,5 µL/kg ITA, T3 = 20 mg/kg NI + 62,5 µL/kg AO + 125 µL/kg ITA.

Para a coordenada b^* (Figura 10), que indica o espectro de cor amarela/azul, houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos (T2 e T3) e os controles nos tempos 10 e 20 dias, sendo observado que as linguiças adicionadas da combinação dos antimicrobianos (T2 e T3) apresentaram menor intensidade dessa cor em comparação aos controles ao final da estocagem. Considerando que as linguiças frescas apresentam como cor característica a cor vermelha, altos valores de cor amarela não são desejáveis neste tipo de produto sendo as amostras tratadas com as combinações de óleos essenciais e nisina Z as que apresentaram as melhores características de cor.

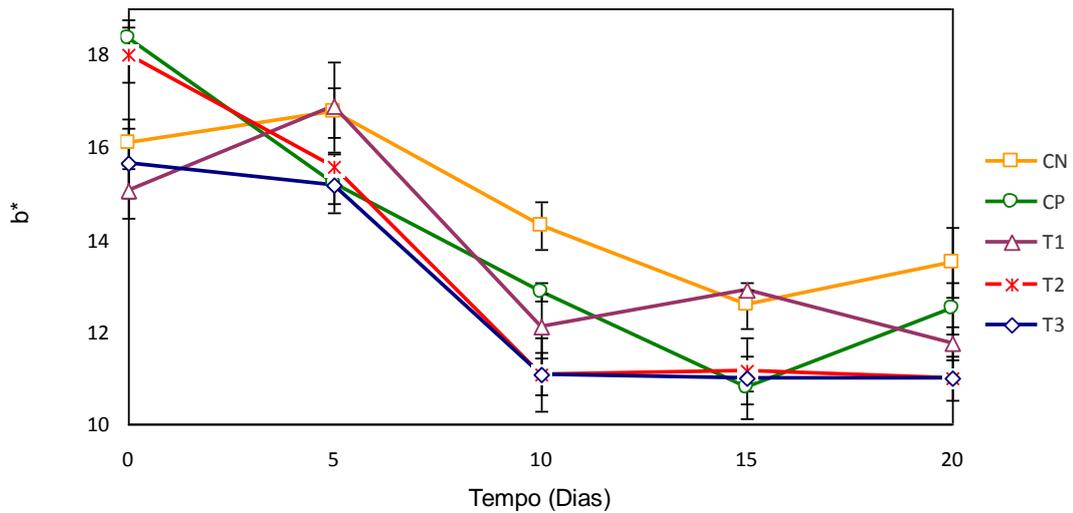


Figura 10. Médias dos valores da coordenada de cor b* em linguiça mista fresca adicionada de diferentes concentrações de antimicrobianos naturais durante 20 dias de armazenamento sob refrigeração. CN = controle negativo, CP = controle positivo, T1 = 20 mg/kg NI, T2 = 20 mg/kg NI + 125 µL/kg AO + 62,5 µL/kg ITA, T3 = 20 mg/kg NI + 62,5 µL/kg AO + 125 µL/kg ITA .

2.4.5 Análise sensorial

Os resultados da análise sensorial estão apresentados na Tabela 4. A análise foi realizada com três amostras: 1) somente formulação, 2) formulação + 125 µL/kg AO + 62,5 µL/kg ITA e 3) formulação + 62,5 µL/kg AO + 125 µL/kg ITA e verificou-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre o controle e as amostras para todas as características analisadas (cor, odor, sabor, textura e avaliação global).

Tabela 4. Escores médios das características sensoriais de linguiça mista fresca sem (controle) e com a adição de óleo essencial de alho, isotiocianato de alila e nisina Z em diferentes doses (Lotes 1 e 2)

Características	Controle	Lote 1	Lote 2
Cor	7,22 ^{ab}	6,74 ^a	7,26 ^b
Odor	6,95 ^b	6,10 ^a	6,23 ^a
Maciez	7,06 ^a	7,31 ^a	6,92 ^a
Sabor	7,52 ^b	6,34 ^a	6,76 ^a

Avaliação global	7,44 ^b	6,65 ^a	6,72 ^a
------------------	-------------------	-------------------	-------------------

Controle = formulação, Amostra 1 = formulação + 125 µL/kg AO + 62,5 µL/kg ITA, Amostra 2 = formulação + 62,5 µL/kg AO + 125 µL/kg ITA

Pode-se verificar que as características de cor, sabor, textura e avaliação global apresentaram índice de aceitabilidade acima de 70%, indicando aceitação por parte dos provadores. Somente para o atributo de odor, os lotes acionados dos antimicrobianos apresentaram aceitação inferior a 70%, provavelmente devido à volatibilidade dos óleos essenciais que interferiram no aroma das linguiças. Contudo, para todos os atributos avaliados, as notas recebidas pelas amostras tratadas com as diferentes doses dos antimicrobianos apresentaram-se acima de 6,0, que se refere à “gostei ligeiramente”, demonstrando que as amostras foram apreciadas pelos provadores.

Embora o grupo controle tenha obtido uma aceitação maior por parte dos provadores em relação às amostras, pode-se constatar que ambas as amostras testadas contendo os óleos essenciais e a nisina Z apresentaram aceitabilidade por parte dos consumidores havendo possibilidade de comercialização das mesmas.

Assim como no presente experimento, no estudo de Silveira et al. (2014) a adição de óleo de louro (0,05 g/100 g e 0,1 g/100g) em linguiça toscana teve aceitabilidade por parte dos provadores, porém a amostra controle teve melhor aceitação. Nesse estudo, verificou-se que o maior efeito da adição do óleo essencial foi em relação ao sabor e a avaliação global que obtiveram notas entre “nem gostei ou desgostei” e “gostei ligeiramente” Entretanto, no estudo de Govaris et al (2010) com o uso de óleo essencial de orégano, (0,6 g/100 g e 0,9 g/100 g) em carne moída ovina, ambas as doses do óleo foram sensorialmente aceitáveis sendo que o sabor e a aceitação global da amostra contendo 0,6 g/100 g de óleo essencial apresentou pontuação significativamente ($P < 0,05$) maior que o controle. No estudo de Horita et al. (2016), a adição de alho e seus derivados como o óleo de alho em salsichas não demonstrou diferença significativa ($P < 0,05$) em relação as características de aroma, sabor e avaliação geral.

Diferentemente do observado no presente experimento, no estudo de Karabagias et al (2011), a adição de óleo de orégano (0,1 g/100 g) e óleo de tomilho (0,1 g/100 g) em carne de cordeiro mostrou que essas doses causaram um odor forte e sabor desagradável no produto.

2.5 Conclusão

As combinações de óleos essenciais e nisina Z testadas foram eficientes para a redução significativa da população de *E. coli* O157:H7 em linguiça mista frescal em comparação aos grupos controle. As combinações desses antimicrobianos também se mostraram efetivas em manter a estabilidade da linguiça mista frescal pelo controle do crescimento de bactérias lácticas deteriorantes e pela manutenção da cor vermelha e do pH das linguiças.

Na avaliação sensorial foi possível verificar que houve aceitação de ambas as formulações contendo os compostos naturais antimicrobianos demonstrando potencial comercial desse produto.

Este estudo permitiu obter dados para o desenvolvimento de compostos naturais para inibição de patógenos e aumento de *shelf life* de linguiça frescal, contribuindo para a oferta de alimentos mais seguros e mais sustentáveis ao consumidor.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O grande consumo de produtos cárneos associado à busca por uma maior qualidade de vida através de vários fatores como uma alimentação saudável, rica em nutrientes e com menores quantidades de aditivos sintéticos favorece a pesquisa e a utilização de compostos naturais que podem ser adicionados nos alimentos. Vários estudos mostram que os óleos essenciais e a nisina apresentam atividade antimicrobiana a qual favorece a segurança alimentar e auxiliam no aumento de vida-de-prateleira dos produtos cárneos.

Nesse sentido, o presente estudo verificou a ação antimicrobiana da associação dos compostos naturais isotiocianato de alila, óleo essencial de alho e nisina Z adicionados em linguiça mista frescal apresentando redução do agente patogênico *E. coli* O157:H7 bem como de bactérias lácticas proporcionando aumento na validade do produto.

A realização da análise sensorial demonstrou a aceitabilidade do produto pelos consumidores revelando um potencial comercial do mesmo.

Referências

- Abubakar, M. (2009). Efficacy of crude extracts of garlic (*Allium sativum* Linn.) against nosocomial *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3: 179-185.
- Alorainy, M. S. (2011). Evaluation of antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*) against *E. coli* O157:H7. *Journal of Agricultural and Veterinary Sciences*. 4: 149-157.
- Amagase, H. (2001). Petesch, B. L., Matsuura, H. Intake of garlic and its bioactive components. *Journal of Nutrition*. 131: 955-962.
- AMSA. (2012). American Meat Science Association. Meat Color Measurement Guidelines.
- Andrade, C. Avaliação físico-química e microbiológica de linguiça toscana porcionada e armazenada em diferentes embalagens, sob condições de estocagem similares às praticadas em supermercados. 2005. 127f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2005.
- Andrade, B. F. M. T., Barbosa, L. N., Probst, I. S., Junior, A. F. (2014). Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*. 26: 34-40.
- Ankri, S., Mirelman, A. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection Journal*. 2: 125-129.
- ASTM International. (2011). American Society for Testing and Material. Standard practice for computing the colors of objects by using the CIE system. Pennsylvania: ASTM International.
- Aureli, P., Costantini, A., Zolea, S. (1992). Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 55: 344–348.
- Bajpai, V. K.; Rahman, A.; Kang, S. C. (2008). Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 125: 117–122.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 446-475.
- Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K. and Tomita, M. (1992) Antimicrobial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Journal of Applied Bacteriology*. 73: 472–479.
- Belletti, N., Lanciotti, R., Patrignani, F., Gardini, F. (2008). Antimicrobial efficacy of citron essential oil on spoilage and pathogenic microorganisms in fruit-based salads. *Journal of Food Science*. 73: 331-338.
- Beuchat, L. R. (1996). Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*. 59: 204-216.
- Bonev, B. B., Breukink, E., Swiezewska, E., Kruijff, B., Watts, A. (2004). Targeting extracellular pyrophosphates underpins the high selectivity of nisin. *The FASEB Journal*. 18: 1862-1869.
- Brandi, G., Amagliani, G., Schiavano, G., Santi, M., Sisti, M. (2006). Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on food borne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection*. 69: 2274–2279.
- Branen, J. K., Davidson, P. M. (2004). Enhancement of nisin, lysozyme and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*. 90: 63-74.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, Padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF; 2001.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiça. Diário Oficial da União: Brasília, DF. 2000.
- Breukink, E., Wiedemann, I., Van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Sahl, H. G., Kruijff, B. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*. 286: 2361-2364.
- Brotz, H., Sahl, H. G. (2000). New insights into the mechanism of action of lantibiotics-diverse biological effects by binding to the same molecular target. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46: 1-6.

- Buchman G. W, Banerjee S, Hansen J. N. (1988). Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *The Journal of Biological Chemistry*. 263:16260–16266.
- Buchanan, R. L., Doyle, M. P. (1997). Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. *Food Technology*. 51: 69–76.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223-253.
- Carson, C. F., Mee, B. J., Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46: 1914–1920.
- Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em <http://www.cdc.gov/ecoli/reporting-timeline.html>. Acesso em 20/07/2016.
- Cervený, J., Meyer, J. D., Hall, P. A. (2009). Microbiological spoilage of meat and poultry products in: compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages. *Food Microbiology and Food Safety*. 16: 69-868.
- Ceylan, E.; Fung, D. Y. C. (2004). Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 12: 1–55.
- Chacon, P. A., Buffo, R. A., Holley, R. A. (2006). Inhibitory effects of microencapsulated allyl isothiocyanate (AIT) against *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated, nitrogen packed, finely chopped beef. *International Journal of Food Microbiology*. 107: 231-237.
- Chiavaro, E., Zanardi, E., Bottari, B., Ianieri, A. (2008). Efficacy of different storage practices in maintaining the physicochemical and microbiological properties of fresh pork sausage. *Journal of Muscle Foods*. 19: 157-174.
- Clark, G. S. (1992). Allyl isothiocyanate. *Perfume and Flavor*. 17: 107– 109.
- Codex Alimentarius. General Standard For Food Additives – Codex Stan 192-1995. Adopted in 1995. Revision: 2015.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross., R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 777-788.

Crump, J. A., Sulka, A. C., Langer, A. J., Schaben, C., Crielly, A. S., Gage, R., Baysinger, M., Moll, M., Withers, G., Toney, D. M., Hunter, S. B., Hoekstra, M., Wong, S. K., Griffin, P. M., Van Gilder, T. J. (2002). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *New England Journal of Medicine*. 347: 555–560.

Cutter, C. N., Siragusa, G. R. (1995). Treatments with nisin and chelators to reduce *Salmonella* and *Escherichia coli* on beef. *Journal of Food Protection*. 58: 1028–1030.

Dave, D., Ghaly, A. E. (2011). Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 6: 486-510.

Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978. Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. *Diário Oficial, São Paulo*, 21 de outubro de 1978. 1-42.

Delaquis, P. J., Mazza, G. (1995). Antimicrobial properties of isothiocyanates in food preservation. *Food Technology*. 49: 73–84.

Delaquis, P. J., Ward, S. M., Holley, R. A., Cliff, M. C., Mazza, G. (1999). Microbiological, chemical and sensory properties of pre-cooked roast beef preserved with horseradish essential oil. *Journal of Food Science*. 64: 519–524.

Delazari, I.; Leitão, M.F; Hsu, L.A. (1977). Efeito da microflora contaminante sobre o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em linguças. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v.8, p. 557-571.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J., Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocina nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*. 69: 193-202.

Dhingra, O. D.; Costa, M. L. N.; Silva, G. J.; Mizubuti, E. S. G.(2004). Essential oil of mustard to control *Rhizoctona solani* seedling damping off and seedling blight in nursery. *Fitopatologia Brasileira*. 29: 683-686.

Dillon, V. M., Board, R. G. (1994). Future prospects for natural antimicrobial food preservation systems. In *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation* ed. Dillon, V. M. and Board R. G. 297–305.

Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., Mauriello, G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 4863–4870.

- Djenane, D., Socorrista, M., Yanguela, J., Idir, L., Gómez, D., Roncalés, P. (2012). Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Science*. 92: 6678-674.
- Djenane, D., Yanguela, J., Amrouche, T., Boubrit, S., Boussad, N., Roncalés, P. (2011). Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. *Food Science and Technology International*. 17: 505-515.
- Dontorou, C., Papadopoulou, C., Filioussis, G., Economou, V., Apostolou, I., Zakkas, G., Salamoura, A., Kansouzidou, A., Levidiotou, S. (2003). Isolation of *E. coli* O157:H7 from foods in Greece. *International Journal of Food Microbiology*. 82: 273-279.
- Dorman, H. J. D., Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 308– 316.
- Dourou, D., Porto-Fett, A.C.S., Shoyer, B., Call, J.E., Nychas, G.J.E. (2009). Behavior of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in teewurst, a raw spreadable sausage. *International Journal of Food Microbiology*. 130: 245-250
- Dutcosky, S. D. Análise sensorial de alimentos. 4 ed. ver. e ampl. Curitiba: Champagnat, 2014. 536p.
- Ellison, R.T. (1994). The effects of lactoferrin on Gram-negative bacteria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 357: 71–90.
- Erickson, J. P., Stamer, J. W., Hayes, M., Mckenna, D. N., Van Alstine, L. A. (1995). An assessment of *Escherichia coli* O157:H7 contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurized eggs and environmental sources, and behavior in low pH dressings. *Journal of Food Protection*. 58: 1059-1064.
- Ettayebi, K., Yamani, J. E., Rossi-Hassani, B. D. (2000). Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*. 183: 191-195.

Feldberg, R. S., Chang, S. C., Kotik, A. N., Nadler, M., Neuwirth, Z., Sundstrom, D. C., Thompson, N. H. (1988). In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 32: 1763–1768.

Figueiró, L. S. (2013). Influência da redução do teor de nitrito de sódio na estabilidade oxidativa e avaliação microbiológica de linguiça suína frescal. 2013. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

Fujisawa, H., Watanabe, K., Suma, K., Origuchi, K., Matsufuji, H., Seki, T., Ariga, T. (2009). Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 73: 1948-1955.

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., Omar, N. B. (2007). Bacteriocin- based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 120: 51-70.

Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S. A. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. *Meat Science*. 76: 172–181.

Gould, G. W. (1996). Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *Journal of Food Protection*. 45: 82–86.

Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., Chatzopoulou, P. S. (2010). The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*. 137: 175-180.

Grosso, C., Ferraro, V., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Coelho, J. A., Palavra, A. M. (2008). Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds. *Food Chemistry*. 111: 197–203.

Gruhlke, M. C. H., Portz, D., Stitz, M., Anwar, A., Schneider, T., Jacob, N., Schlaich, N. L., Slusarenko, A. J. (2010). Allicin disrupts the cell's electrochemical potential and induces apoptosis in yeast. *Free Radical Biology and Medicine*. 49: 1916–1924.

- Gustafson, J. E., Liew, Y. C., Chew, S., Markham, J., Bell, H. C., Wyllie, S. G., Warmington, J. R. (1998). Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 26: 194–198.
- Harris, J. C. Cottrell, S. L., Plummer, S., Lloyd, D. (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57: 282–286.
- Hasper, H. E.; Kramer, N. E.; Smith, J. L.; Hillman, J. D.; Zachariah, C.; Kuipers, O. P., de Kruijff, B., Breukink, E. (2006). An alternative bactericidal mechanism of action of lantibiotic peptides that target lipid II. *Science*. 313: 1636- 1637.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., Von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 3590-3595.
- Helou, L., & Harris, I. M. (2007). Garlic. In T. S. Tracy, & R. L. Kingston (Eds.), *Herbal products; toxicology and clinical pharmacology* (2nd ed).. Totowa, New Jersey: Human Press.
- Holley, R.A., Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 22: 273–292.
- Horita, C. N., Farías-Campomanes, A. M., Barbosa, T. S., Esmerino, E. A., Cruz, A. G., Bolini, H. M. A., Meireles, M. A. A., Pollonio, M. A. R. (2016). The antimicrobial, antioxidant and sensory properties of garlic and its derivatives in Brazilian low-sodium frankfurters along shelf-life. *Food Research International*. 84: 1-8.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*. 3: 1-24.
- IAL, Instituto Adolf Lutz. (2008). *Métodos físico-químicos para análises de alimentos – Carnes e produtos cárneos*. 4ª ed. São Paulo.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/industria/pia/producao/producao2013/defaulttabzip_xls.shtm. Acesso em 17/10/2016

- Isshiki, K., Tokuoka, K., Mori, R., Chiba, S. (1992). Preliminary examination of allyl isothiocyanate vapor for food preservation. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 56: 1476–1477.
- Jaber, M. A., Al-Mossawi, A. (2007). Susceptibility of some multiple resistant bacteria to garlic extract. *African Journal of Biotechnology*. 6: 771-776.
- Jack, R. W.; Tagg, J. R., Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*. 59: 171-200.
- Jay, J. M. (2000). *Modern food microbiology*. 6th Ed. Maryland, USA: Aspen Publishers, 635 p.
- Jeppesen, C. (1995). Media for *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* spp. from food and environment. *International Journal of Food Microbiology*. 26: 25-41.
- Jones, E. M., Smart, A., Bloomberg, G., Burgess, L., Millar, M. R. (1994). Lactoferricin a new antimicrobial peptide. *Journal of Applied Bacteriology*. 77: 208–214.
- Kanemaru, K., Miyamoto, T. (1990). Inhibitory effects on the growth of several bacteria by brown mustard and allyl isothiocyanate. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*. 37: 823–829.
- Karabagias, I., Badeka, A., Kontominas, M. G. (2011). Shelf life extension of Lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. *Meat Science*. 88: 109-116
- Karmali, M. A. (1989). Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2: 15-38.
- King, L. A., Mailles, A., Mariani-Kurkdjian, P., Vernozy-Rozand, C., Montet, M. P., Grimont, F., Pihier, N., Devalk, H., Perret, F., Bingen, E., Espie, E., Vaillant, V. (2009). Community-wide outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with consumption of frozen beef burgers. *Epidemiology and Infection*. 137: 889-869.
- Kitakawa, J. H. A. (2002). Efeito do lactato de sódio na vida-de-prateleira de linguiça mista frescal. 2002. 128f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*. 1: 119–128.
- Kruger, M. F. (2006). Controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina. 2006. 91f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Kuwano, K., Tanaka, N., Shimizu, T., Nagatoshi, K., Nou, S., Sonomoto, K. (2005). Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26: 396-402.
- Labadie, J. (1999). Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science*. 52: 299-305.
- Lee, G. H., Kang, H. A., Kim, K. H., Shin, M. G., Lee, G. H., Kang, H. A., Kim, K. H., Shin, M.G. (2009). Microencapsulation effects of allyl isothiocyanate with modified starch using fluidized bed processing. *Food Science and Biotechnology*. 18: 1071–1075.
- Lemay, J. M., Choquette, J., Delaquis, P. J., Gáriepey, C., Rodrigue, N., Saucier, L. (2002). Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat mode. 78: 217-226
- Li, X. H., Jin, Z. Y., Wang, J. (2007). Complexation of allyl isothiocyanate by α - and β -cyclodextrin and its controlled release characteristics. *Food Chemistry*. 103: 461–466.
- Lin, C. M., Kim, J., Du, W. X., Wei, C. I. (2000). Bactericidal activity of isothiocyanate against pathogens on fresh produce. *Journal of Food Protection*. 63: 25–30.
- Lis-Balchin, M., Buchbauer, G., Hirtenlehner, T. (1998). Antimicrobial activity of *Pelargonium* essential oil added to a quiche filling as a model food system. *Letters in Applied Microbiology*. 27: 207–210.
- Lis-Balchin, M., Steyrl, H., Krenn, E. (2003). The comparative effect of novel *Pelargonium* essential oils and their corresponding hydrosols as antimicrobial agents in a model food system. *Phytotherapy Research*. 17: 60–65.

- Liserre., A. M., Landgraf, M., Destro, M. T., Franco, B. (2002). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* strains in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage. *Meat Science*. 61: 449-455.
- Liu, W., Hansen, J. N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactobacillus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 2551-2558.
- Liu, D. C., Tsau, R. T., Lin, Y. C., Jan, S. S., Tan, F. J. (2009). Effect of various levels of rosemary or Chinese mahogany on the quality of fresh chicken sausage during refrigerated storage. *Food Chemistry*. 117: 106-113.
- MacDonald, D. M., Fyfe, M., Paccagnella, A., Trinidad, A., Louise, K., Patrick, D. (2004). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to salami. *Epidemiology and Infection*. 132: 283-289.
- Mano, S. B., Pereda, J. A. O., Fernando, G. D. G. (2002). Aumento da vida útil e microbiologia da carne suína embalada em atmosfera modificada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 22: 1-10.
- Mari, M.; Bertolini, P.; Pratella, G. C. (2003). Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 761-766.
- Martin-Visscher, L. A., Yoganathan, S., Sit, C. S., Lohans, C. T., Vederas, J. C. (2011). The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against Gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. *FEMS Microbiology Letters*. 317: 152-159.
- Martinis, E. C. P., Franco, B. D. G. M. (1998). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. *International Journal of Food Microbiology*. 42: 112-126.
- Mathenjwa, S. A., Hugo, C. J., Bothma, C., Hugo, A. (2012). Effect of alternative preservatives on the microbial quality, lipid stability and sensory of boerewors. *Meat Science*. 91: 165-172.
- Mead, P. S., Griffin, P. M. (1998). *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*. 352: 1207–1212.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1990). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 5: 607–625.

Mejholm, O., Dalgaard, P. (2002). Antimicrobial effects of EOs on the seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 3:, 27-31.

Meng, J.; Doyle, M. P.; Zhao, T., Zhao, S. (1994). Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *International Journal of Food Science & Technology*. 51: 179-184.

Milani, L. I. G., Fries, L. L. M., Paz, P. B., Bellé, M., Terra, N. N. (2003). Bioproteção de linguiça de frango. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 23: 161-166.

Mirunalini, S., Dhamodharan, G., Karthishwaran, K. (2010). A natural wonder drug helps to prevent cancer: garlic oil. *Notulae Scientia Biologicae*. 2: 14-19.

Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., Roura, S. I. (2007). Effects of clove and tea tree oils on *Escherichia coli* O157:H7 in blanched spinach and minced cooked beef. *Journal of Food Processing and Preservation*. 31: 379-391.

Mulders, J. W., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J., Vos, W. M. (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *European Journal of Biochemistry*. 201: 581-584.

Murdock, C. A., Cleveland, J., Matthews, K. R., Chikindas, M. L. (2006). The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Applied Microbiology*. 44: 255–261.

Nadarajah, D., Han, J. H., Holley, R. A. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in packaged ground beef by allyl isothiocyanate. *International Journal of Food Microbiology*. 99: 269–279.

Nannapaneri, R., Chalova, V. I., Story, R., Wiggins, K. C., Crandall, V. G., Ricke, S. C., Johnson, M. G. (2009). Ciprofloxacin-sensitive and ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* are equally susceptible to natural orange oil-based antimicrobials. *Journal of Environmental Science and Health*. 44: 571-577.

Nature. Disponível em <http://www.nature.com/nsmb/journal/v11/n10/images/nsmb830-F1.gif>. Acesso em 20/06/2015.

Nielsen, P. V., Rios, R. (2000). Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology*. 60: 219–229.

Niven, C. F., Jr. (1986). Meat microbiology and parasitology. In J. F. Price, & B. S. Schweigert (Eds.), *The science of meat and meat products* (pp. 199e237). Westport: Food & Nutrition Press.

Normanno, G., Parisi, A., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Montagna, D., Chiocco, D., Celano, G.V. (2004). Typing of *E. coli* O157 strains from fresh sausage. *Food Microbiology*. 21:79-82.

Nowicki, D., Rodzik, O., Herman-Antosiewicz, A., Szalewska-Pałasz, A. (2016). Isothiocyanates as effective agents against enterohemorrhagic *Escherichia coli*: insight to the mode of action. *Nature*. 6: 1-12.

Nuryastuti, T., Van der Mei, H., Busscher, H. J., Irvati, S., Aman, A. T., Krom, B. P. (2009). Effect of cinnamon oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 6850-6855.

Nychas, G. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78: 77-89

O'Brien, S. J., Adak, G. K., Gilham, C. (2001). Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Emerging Infectious Diseases*. 7: 1049–1051.

Ohta, Y., Takatani, K., Kawakishi, S. (1995). Decomposition rate of allyl isothiocyanate in aqueous solution. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 59: 102–103.

Olasupo, N. A., Fitzgerald, D. J., Gasson, M. J., Narbad, A. (2003). Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology*. 36: 448-451.

Onyeagba, R. A., Ugbogu, O. C., Okeke, C.U, Itoakasi, O. (2006). Studies on the antimicrobial effects of garlic (*Allium sativum* Linn.), ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and lime (*Citrus aurantifolia* Linn.). *African Journal of Biotechnology*. 3: 552-554.

- Otero, V., Becerril, R., Santos, J. A., Rodríguez-Calleja, J. M., Nerín, C., García-López, M. L. (2014). Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157:H7 strains in vitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). *Food Control*. 42: 296-300.
- Palanichany, A., Jayas, D. S., Holley, R. A. (2008). Predicting survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausage using artificial neural networks. *Journal of Food Protection*. 71: 6-12.
- Palaniappan, K., Holley, R. A. (2010). Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 140: 164-168.
- Pandit, V. A., Shelef, L. A. (1994). Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Microbiology*. 11: 57–63.
- Pardi, M. C., Santos, I. C., Souza, E. P., Pardi, H. S. *Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne*. 2ª edição. Goiânia: Editora UFG, 2007. 1150 p.
- Paster, N., Juven, B. J., Shaaya, E., Menasherov, M., Nitzan, R., Weisslowics, H., Ravid, U. (1990). Inhibitory effect of oregano and thyme oils on moulds and foodborne bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 11: 33-37.
- Pennington, H. (2010). *Escherichia coli* O157. *The Lancet*. 376: 1428-1435.
- Periago, P. M., Moezelaar, R. (2001). Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*. 68: 141–148.
- Perin, L. M., Moraes, P. M., Viçosa, G. N., Junior, A. S., Nero, L. A. (2012). Identification of bacteriocinogenic *Lactococcus* isolates from raw milk and cheese capable of producing nisin A and nisin Z. *International Dairy Journal*. 25: 46-51.
- Perricone, M., Arace, E., Corbo, M. R., Sinigalia, M., Bevilacqua, A. (2015). Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Frontiers in Microbiology*. 6: 1-7
- Piper, C., Hill, C., Cotter, P. D., Ross, R. P. (2011). Bioengineering of a Nisin A-producing *Lactococcus lactis* to create isogenic strains producing the natural variants Nisin F, Q and Z. *Microbial Biotechnology*. 4: 375-382.

- Pol, I. E., Krommer, J., Smid, E. J. (2002). Bioenergetic consequences of nisin combined with carvacrol towards *Bacillus cereus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 3: 55-61.
- Pol, I. E., Smid, E. J. (1999). Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 29: 166-170.
- Punyaappa-path, S., Phumkhachorn, P., Rattanachaikunsopon, P. (2015). Nisin: production and mechanism of antimicrobial action. *International Journal of Current Research and Review*. 7: 47-53.
- Rattanachaikunsopon, P.; Phumkhachorn, P. (2010). Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 110: 614-619.
- Richard, C., Drider, D., Elmorjani, K., Marion, D., Prevost, H. (2004). Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 186: 4276-4284.
- Riley, L. W., Remis, R., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, A. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., Cohen, M. L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*. 308: 681-685.
- Riley, M. A., Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annual Review of Microbiology*. 56: 117-137.
- Rohani, S. M. R., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S. S., Griffiths, M. W. (2011). The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. *LTW Food Science and Technology*. 44: 2260-2265.
- Rogers, L. A., Whittier, E. O. (1928). Limiting factors in the lactic fermentation. *Journal of Bacteriology*. 16:211-229.
- Rounds, L., Havens, C. M., Feinstein, Y., Friedman, M., Ravishankar, S. (2012). Plant extracts, spices and essential oils inactivate *Escherichia coli* O157:H7 and reduce formation of potentially carcinogenic heterocyclic amines in cooked beef patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 3792-3799.

Ruhr, E., Sahl, H. G. (1985). Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 27: 841-845.

Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero. (2010). Effect of an argon-containing packaging atmosphere on the quality of fresh pork sausage during refrigerated storage. *Food Control*. 21: 1331-1337.

Sahl, H. G., Kordel M., Benz, R. (1987). Voltage-dependent depolarization of bacterial membrane and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. *Archives of Microbiology*. 149: 120-124.

Sallam, K.I., Ishioroshi, M., Samejima, K. (2004). Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. *Lebensm.-Wiss. U. - Technology*. 37:849-855.

Samelis, J., Bedie, G. K., Sofos, J. N., Belk, K. E., Scanga, J. A., Smith, G. C. (2005). Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. *LWT – Food Science and Technology*. 38: 21-28.

Sartz, L., De Jong, B., Hjertqvist, M., Plym-Forsell, L., Alsterlund, R., Lofdahl, S., Osterman, B., Stahl, A., Eriksson, H. B., Karpman, D. (2008). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage: aspects of sausage production that increase the risk of contamination. *Epidemiology and Infection*. 136: 370-380.

Schardd, R. L. (2012). Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *Journal of Food Protection*. 74: 123-131.

Schuller, F., Benz, E., Sahl, H. G. (1989). The peptide antibiotic subtilin acts by formation of voltage-dependent multi-state pores in bacterial and artificial membranes. *European Journal of Biochemistry*. 182: 181-186.

Selim, S. (2011). Antimicrobial activity of essential oils against vancomycin-resistant enterococci (VRE) and *Escherichia coli* O157:H7 in feta soft cheese and minced beef meat. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42: 188-197.

Shelef, L. (1983). A. Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*. 6: 29– 44

- Shelef, L. A., Jyothi, E. K., Bulgarelli, M. A. (1984). Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods. *Journal of Food Science*. 49: 737–740.
- Sikkema, J., De Bont, J. A. M., Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. 269: 8022– 8028.
- Silveira, S. M., Junior, A. C., Scheuermann, G. N., Secchi, F. L., Vieira, C. R. W. (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. *Ciência Rural*. 42: 1300-1306
- Silveira, S. M., Luciano, F. B., Fronza, N., Junior, A. C., Scheuermann, G. N., Vieira, C. R. W. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7°C. *Food Science and Technology*. 59: 86-93.
- Simitzis, P. E., Deligeorgis, S. G., Bizelis, J. A., Dardamani, A., Theodosiou, I., Fegeros, K. (2008). Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. *Meat Science*. 79: 217–223.
- Smid, E. J., Gorris, L. G. M. (1999). Natural antimicrobials for food preservation. In: Rahman, M. S. (Ed.), *Handbook of Food Preservation*. Marcel Dekker, New York, pp. 285-308
- Sofos, J. N., Geonaras, I. (2010). Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science*. 86: 2-14.
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*. 80: 159-166.
- Stoll, A., Seebeck, E. (1951). Chemical Investigations of alliin, the specific principle of garlic. *Advances in Enzymology*. 11: 377-400.
- Tajkarimi, M. M, Ibrahim, S. A., Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21: 1199-1218.

- Tajkarimi, M., Ibrahim, S. A. (2011). Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Control*. 22: 801-804
- Tassou, C., Drosinos, E. H., Nychas, G. J. E. (1995). Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 °C and 10 °C. *Journal of Applied Bacteriology*. 78: 593– 600.
- Tassou, C. C., Nychas, E., & Skandamis, P. N. (2004). Herbs and spices and antimicrobials. In K. V. Peter (Ed.), *Handbook of herbs and spices* (Vol. 2); (pp. 30-31). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Tauxe, R., Kruse, H. Heldberg, C., Potter, M., Madden, J., Wachsmuth, K. (1997). Microbial hazards and emerging issues associated with produce – a preliminary report to the National Advisory Committee on Microbiologic Criteria for Foods. *Journal of Food Protection*. 60: 1400-1408.
- Terra, N. N. (1998) Apontamentos sobre tecnologia de carnes. São Leopoldo, RS: Unisinos. 216 p.
- Thompson, J. S., Hodge, D. S., Borczyk, A. A. (1990). Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 2165–2168.
- Tiwari, B .K., Valdramidis, V. V., O'Donnel, C. P., Muthukumarappan, K., Cullen, P. J.(2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 5987-6000.
- Trajano, V. N., Lima, E. O., Souza, E. L., Travassos, A. E. R. (2009). Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 29: 542-545
- Tsigarida, E., Skandamis, P., Nychas, G. J. E. (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* and *autochthonous flora* on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. *Journal of Applied Microbiology*. 89: 901-909.
- Turgis, M., Borsa, J., Millette, M., Salmieri, S., Lacroix, M. (2008). Effect of selected plant essential oils or their constituents and modified atmosphere packaging on the radiosensitivity of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi* in ground beef. *Journal of Food Protection*. 71: 516–521.

- Turina, A. V., Nolan, M. V., Zygadlo, J. A., Perillo, M. A. (2006). Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*. 122: 101–113.
- Ultee, A., Kets, E. P., Alberda, M., Hoekstra, F. A., Smid, E. J. (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*. 74: 233–238.
- Ultee, A., Bennik, M. H., Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 1561–1568.
- Ulukanli, Z., Çavli, P. (2006). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 from beef Doner Kebabs Sold in Kars. *Gazy University Journal of Science*. 12: 99-104.
- Zou, Y., Seung, L. J., Lee, S. H., Kim, S., Cho, Y., Ahn, J. (2013). Enhanced antimicrobial activity of nisin in combination with allyl isothiocyanate against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* and *Shigella boydii*. *International Journal of Food Science and Technology*. 48: 324-333.
- Wan Norhana, M. N., Poole, S. E., Deeth, H. C., Dykes, G. A. (2012). Effects of nisin, EDTA and salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and native microflora on fresh vacuum package shrimps stored at 4°C. *Food Microbiology*. 31: 43-50.
- Wiedermann, I., Benz, R., Sahl, H. G. (2004). Lipid II-mediate pore formation by the peptide antibiotic nisin: a black lipid membrane study. *Journal of Bacteriology*. 186: 3259-3261.
- Williams, R. C., Isaacs, S., Decou, M. L., Richardson, E. A., Buffett, M. C., Slinger, R. W., Brodsky, M. H., Ciebin, B. W., Ellis, A., Hockin, J. (2000). Illness outbreak associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Genoa salami. *Canadian Medical Association Journal*. 162: 1409-1413.
- Wills, E. Enzyme inhibition by allicin, the active principle of garlic. (1956). *Biochemical Journal*. 63:5 14–520.
- Wu, X., Santos, R. R., Fink-Gremmels. (2015). Analyzing the antibacterial effects of food ingredients: model experiments with allicin and garlic extracts on biofilm formation and viability of *Staphylococcus epidermidis*. *Food Science & Nutrition*. 3: 158-168.