

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FERNANDA CRISTINA KANDALSKI BORTOLOTTO

**SELEÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA IN VITRO E APLICAÇÃO DE ÓLEO DE ALHO E
ISOTIOCIANATO DE ALILA EM LINGUIÇA SUÍNA FRESCAL
INOCULADA COM *Escherichia coli* O157**

(Selection of essential oils for antimicrobial activity in vitro and application of garlic oil and allyl isothiocyanate in fresh pork sausage inoculated with *Escherichia coli* O157)

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2014

FERNANDA CRISTINA KANDALSKI BORTOLOTTO

**SELEÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA IN VITRO E APLICAÇÃO DE ÓLEO DE ALHO E
ISOTIOCIANATO DE ALILA EM LINGUIÇA SUÍNA FRESCAL
INOCULADA COM *Escherichia coli* O157**

(Selection of essential oils for antimicrobial activity in vitro and application of garlic oil and allyl isothiocyanate in fresh pork sausage inoculated with *Escherichia coli* O157)

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

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

Coorientador: Prof Dr Fernando
Bittencourt Luciano

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2014

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 ABREVIATURAS.....	Xiv
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2	
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Óleos Essenciais.....	3
2.1.1 Composição e mecanismos de ação dos óleos essenciais.....	4
2.1.2 Óleo essencial de orégano.....	6
2.1.3 Óleo essencial de alho.....	7
2.1.4 Óleo essencial de mostarda.....	9
2.1.5 Óleo essencial de canela.....	10
2.2 <i>E. coli</i> enterohemorrágica.....	11
2.3 Embutidos cárneos frescais.....	13
2.4 Aspectos de qualidade dos embutidos frescais.....	16
2.4.1 Microbiota de linguiças frescais.....	16
2.4.2 Aspectos físico-químicos de linguiças frescais.....	17
2.4.2.1 Oxidação lipídica.....	17
2.4.2.2 Cor instrumental.....	19
2.4.2.3 pH.....	20
CAPÍTULO 3	
3 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais contra <i>E. coli</i> O157 <i>in vitro</i>.....	21

3.1 Introdução.....	22
3.2 Material e métodos.....	24
3.2.1 Compostos químicos e cepas bacterianas.....	24
3.2.2 Preparo do inóculo bacteriano.....	24
3.2.3 Determinação de CIM e CBM dos óleos essenciais contra <i>E. coli</i> O157.....	25
3.2.4 Determinação do efeito antimicrobiano de combinações dos óleos essenciais contra <i>E. coli</i> O157.....	26
3.3 Resultados e Discussão.....	27
3.4 Conclusão.....	30
CAPÍTULO 4	
4 Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de alho e isotiocianato de alila em linguiça suína frescal inoculada com <i>E. coli</i> O157.....	32
4.1 Introdução.....	35
4.2 Material e métodos.....	36
4.2.1 Compostos químicos.....	36
4.2.2 Cultura bacteriana.....	36
4.2.3 Elaboração da linguiça suína frescal adicionada de óleos essenciais	37
4.2.3.1 Teste preliminar em massa de linguiça.....	37
4.2.3.2 Teste em linguiça embutida.....	39
4.2.4 Análise microbiológica.....	40
4.2.5 Análise físico-química.....	41
4.2.5.1 Determinação de pH.....	41
4.2.5.2 Determinação de cor instrumental.....	41
4.2.5.3 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	42
4.2.6 Análise estatística.....	42
4.3 Resultados.....	42
4.3.1 Teste preliminar em massa de linguiça.....	42
4.3.1.1 Análise microbiológica.....	42

4.3.1.2 Determinação de cor instrumental.....	43
4.3.2 Teste em linguiça suína frescal.....	47
4.3.2.1 Análise microbiológica.....	47
4.3.2.2 Análise físico-química.....	49
4.4 Discussão.....	53
4.5 Conclusão.....	60
CAPÍTULO 5	
5 Conclusão Geral.....	62
REFERÊNCIAS	63

“Se vi mais longe foi por estar de pé em ombro de gigantes”
Isaac Newton.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me ajudarem na realização desta importante etapa para minha carreira profissional. Apoio tanto financeiro, como por todas as horas que cuidaram de meus filhos quando eu estava ausente.

À meu marido, Daniel, companheiro de todas as horas que entendeu meu distanciamento e em nenhum momento deixou de me apoiar e incentivar.

À minha orientadora professora Dra. Renata E. F. de Macedo, por acreditar em meu potencial, transmitir sabiamente seus ensinamentos, e principalmente por toda a paciência que teve comigo ao longo desse período.

A todos os outros professores do programa de Mestrado em Ciência Animal da PUPPR pelos conhecimentos e experiências compartilhados, principalmente ao professor Dr. Fernando B. Luciano, meu co-orientador. Agradeço também ao Dr. Richard A. Holley, pela doação das cepas bacterianas usadas no experimento.

A todos os funcionários da PUCPR, em especial às técnicas de laboratório que muito me ajudaram e também pela amizade que desenvolvemos nesse período, Luciane e Hanna.

As graduandas, bolsistas de iniciação científica: Manoela, Stephane, Michele e Paloma, por toda ajuda na realização de meu experimento.

Aos diretores do Frigorífico Bizinelli, Ana e Ângelo Bizinelli, por todo apoio, compreensão e também pelos materiais disponibilizados.

E, por último, aos meus filhos, anjos que guiam meu caminho. João e Maria, vocês são a razão do meu constante crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada e desculpem-me pela ausência em determinados momentos, tenho certeza que um dia entenderão.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral dos objetivos de estudo desta dissertação.

O capítulo 2 trata-se de revisão de literatura.

Os capítulos 3 e 4 são artigos em diferentes estágios de publicação em periódicos científicos.

O Capítulo 5 finaliza esta dissertação com conclusões gerais deste trabalho e com sugestões para estudos futuros.

As referências de todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

Antimicrobianos naturais são alternativas aos conservantes tradicionais para a preservação de alimentos. Alinhados às novas demandas de mercado, muitos desses compostos são obtidos a partir de plantas aromáticas e especiarias ricas em óleos essenciais. As linguiças frescas são os derivados cárneos mais produzidos e comercializados no Brasil e devido às suas características físico-químicas são produtos altamente perecíveis e suscetíveis à contaminação microbiana. Entre os micro-organismos que podem contaminar as linguiças, o grupo das enterobactérias destaca-se, pois são organismos caracteristicamente encontrados na matéria-prima cárnea e que podem abrigar cepas patogênicas como *E. coli* O157, mundialmente associada a surtos alimentares. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais carvacrol, cinamaldeído, isotiocianato de alila (ITA) e do óleo de alho frente a um *pool* de cepas de *E. coli* O157 e avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante da combinação de ITA e óleo de alho em linguiça suína frescal inoculada com *E. coli* O157. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais, isoladamente e em combinação, contra *E. coli* O157 *in vitro* foram determinadas pela técnica de diluição em tubos. Após a definição das combinações de óleos essenciais com menor CIM *in vitro*, procederam-se os testes em massa de linguiça com diferentes combinações dos óleos de alho e ITA. As massas foram inoculadas com o *pool* de *E. coli* O157 e divididas em 5 tratamentos, sendo um grupo controle, onde não houve a adição dos óleos essenciais e os outros quatro grupos adicionados com diferentes combinações dos óleos (T1=125 ppm ITA+125 ppm OA; T2=125 ppm ITA+250 ppm OA; T3=250 ppm ITA+125 ppm OA; T4= 250 ppm ITA +250 ppm OA) . Os produtos foram mantidos sob refrigeração, a 6 °C, por um período de 20 dias, sendo realizadas contagem de *E. coli* O157 e a determinação de cor instrumental a cada 5 dias. Posteriormente, uma das combinações de ITA e óleo de alho (125ppm OA + 250ppm ITA) foi testada em linguiça frescal embutida, inoculada com *E. coli* O 157, e comparada a um lote controle, sem adição dos óleos essenciais. As linguiças foram estocadas a 6 °C por 35 dias, sendo analisadas a cada 7 dias para pH, cor instrumental, oxidação lipídica, contagem de *E. coli* O157, contagem de *E. coli* autóctone, de bactérias aeróbias mesófilas e de bactérias psicrófilas. Os resultados foram analisados estatisticamente e as médias comparadas pelo teste de Tukey e teste t ($P < 0,05$). As menores doses individuais dos óleos essenciais para inibição de *E. coli* O157 foram obtidas para ITA e cinamaldeído. Contudo, no uso conjunto dos óleos essenciais, a combinação de ITA e óleo de alho foi a única que apresentou efeito sinérgico contra o patógeno. Ao longo do período de estocagem, verificou-se redução na contagem de *E. coli* O157 de aproximadamente 2 log UFC/g tanto no teste com massa de linguiça quanto na linguiça embutida. Também houve diferença significativa ($P < 0,05$) na cor instrumental entre os tratamentos adicionados da combinação de ITA e óleo de alho e o tratamento controle, verificando maior estabilidade da cor vermelha e menor descoloração nos grupos adicionados dos óleos essenciais. O efeito antioxidante dos óleos essenciais na linguiça frescal também foi comprovado

pelos menores valores de TBARS em comparação ao controle. Para o crescimento de bactérias psicrotróficas em linguiça frescal não foi observada diferença significativa entre os tratamentos adicionado dos óleos essenciais e o controle, contudo, a ação antimicrobiana da combinação de ITA e óleo de alho em linguiça frescal foi comprovada sobre o crescimento de bactérias mesófilas ($P < 0,05$). A adição combinada do óleo essencial de alho e de ITA nas concentrações estudadas representa uma alternativa como agente conservante e antioxidante em linguiça suína frescal.

Palavras-chave: Óleo de alho. Isotiocianato de alila. Linguiça suína frescal. Conservador. Antioxidante.

ABSTRACT

Natural antimicrobials are considered as alternatives to the traditional food preservatives. Aligned to the new demands of the consumer market, these compounds are made from herbs and spices, rich in essential oils. Fresh pork sausages are the most produced and marketed meat products in Brazil. Because of their physical chemical characteristics, they are highly perishable and susceptible to microbial growth. Among the micro-organisms that can contaminate fresh sausages, the group of enterobacteria stands out as one of the most important, since it can be transmitted by the raw material and harbor pathogenic strains such as *E. coli* O157. The objectives of this study were to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of essential oils carvacrol, cinnamaldehyde, allyl isothiocyanate (AITC) and garlic oil against a pool of strains of *E. coli* O157 and the antimicrobial and antioxidant activities combining ITA and garlic oil in fresh pork sausage inoculated with *E. coli* O157. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the essential oils alone and in combination against *E. coli* O157 *in vitro* were determined by the tube dilution technique. After defining the combinations of essential oils with lower MIC *in vitro*, proceeded up the tests in bulk sausage with different combinations of oils of garlic and ITA. The masses were inoculated with *E. coli* O157 pool and divided into 5 treatments, a control group, where there was no addition of essential oils and the four other groups added with different combinations of oils (T1=125 ppmITA+125ppmOA, T2=125ppmITA+250ppmOA, T3=250ppmITA+125ppmOA; T4=250ppmITA+250ppmOA). The products were stored under refrigeration at 6 °C for a period of 20 days, counts of *E. coli* O157 and the determination of instrumental color every five days being held. Subsequently, one of the combinations of garlic oil and ITA (250ppmITA+125ppmOA) was tested in flush fresh sausages, inoculated with *E. coli* 157, and compared to a control batch without addition of essential oils. The sausages were stored at 6 °C for 35 days, and analyzed every 7 days for pH, instrumental color, lipid oxidation, counts of *E. coli* O157, autochthonous *E. coli*, count mesophilic aerobic bacteria and psychrotrophic. The results were analyzed statistically and means were compared by Tukey's test and t test ($P < 0.05$). The smaller single doses of essential oils to inhibit *E. coli* O157 were obtained for ITA and cinnamaldehyde. However, the combined use of the essential oils, the combination of garlic oil and ITA was the only one that showed a synergistic effect against the pathogen. Throughout the storage period, there was a reduction in the count of *E. coli* O157 approximately 2 log CFU/g in both the test mass of sausage as built in sausage. There was also a significant difference ($P < 0.05$) in instrumental color added between treatments combining ITA and garlic oil treatment and control, checking stability of red color and less discoloration in groups of essential oils added. The antioxidant effect of the essential oils in fresh sausages was also evidenced by lower TBARS values compared to the control group. For the growth of psychrotrophic bacteria in fresh sausages no significant difference between the group added the essential oils and the control group, however, the antimicrobial action of the combination of ITA and garlic oil was observed in fresh sausages was proven on the growth of mesophilic bacteria ($P < 0.05$). The combined addition of essential oil of garlic and ITA concentrations studied represent an alternative preservative and antioxidant in fresh pork sausage.

Keywords: Garlic oil. Allyl isothiocyanate. Fresh pork sausage. Preservative. Antioxidant.

LISTA DE ABREVIATURAS

BHA	Butil Hidroxianisol
BHT	Butil Hidroxitolueno
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
ITA	Isotiocianato de Alila
MDA	Malonaldeído
PCA	Plate Count Agar
PPM	Parte Por Milhão
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TSB	Tryptone Soya Broth
UFC	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE TABELAS

Artigo 1 – Capítulo 3

	Página
Tabela 1. CIM e CBM do carvacrol, cinamaldeído, isotiocianato de alila e óleo essencial de alho frente ao <i>pool</i> de <i>E. coli</i> O157 <i>in vitro</i>	27
Tabela 2. Efeito da combinação de diferentes óleos essenciais frente ao <i>pool</i> de cepas de <i>E. coli</i> O157 <i>in vitro</i>	27

Artigo 2 – Capítulo 4

Tabela 1. Doses dos óleos essenciais testadas em massa de linguiça suína frescal	38
Tabela 2. Formulação de linguiça suína frescal.....	38
Tabela 3. Contagem de <i>E. coli</i> O157 (log UFC/g) em massa de linguiça suína frescal adicionada de diferentes combinações de óleo essencial de alho e isotiocianato de alila (média±desvio padrão)	43
Tabela 4. Valores médios de coordenada de cor L* encontrados em massa de linguiça suína frescal adicionada de diferentes combinações de óleo essencial de alho e isotiocianato de alila.....	44
Tabela 5. Valores médios de coordenada de cor a* encontrados em massa de linguiça suína frescal adicionada de diferentes combinações de óleo essencial de alho e isotiocianato de alila	44
Tabela 6. Valores médios de coordenada de cor b* encontrados em massa de linguiça suína frescal adicionada de diferentes combinações de óleo essencial de alho e isotiocianato de alila.....	44
Tabela 7. Valores médios de coordenada de cor h encontrados em massa de linguiça suína frescal adicionada de diferentes combinações de óleo essencial de alho e isotiocianato de alila.....	45
Tabela 8. Valores médios de coordenada de cor C* encontrados em massa de linguiça suína frescal adicionada de diferentes combinações de óleo essencial de alho e isotiocianato de alila.....	45
Tabela 9. Resultado da avaliação de percepção sensorial de massa de linguiça adicionada de óleos essenciais.....	46

LISTA DE FIGURAS

	Página
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	
Figura 1. Estrutura química carvacrol.....	7
Figura 2. Estrutura química alicina.....	8
Figura 3. Estrutura química isotiocianato de alila.....	10
Figura 4. Estrutura química cinamaldeído.....	11
Capítulo 4 – Artigo 2	
Figura 1. Contagem da bactéria <i>E. coli</i> O157 nas linguiças frescas controle e tratamento, durante o período de armazenagem.....	47
Figura 2. Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos nas linguiças frescas controle e tratamento, durante o período de armazenagem.....	48
Figura 3. Contagem de micro-organismos psicrotóxicos nas linguiças frescas controle e tratamento, durante o período de armazenagem.....	49
Figura 4. Médias dos valores de pH nas linguiças frescas controle e tratamento, durante o período de armazenagem.....	49
Figura 5. Evolução das coordenadas de cor L* e b* nas linguiças frescas ao longo de 35 dias de estocagem sob refrigeração.....	50
Figura 6. Evolução das coordenadas de cor a*, C* e h nas linguiças frescas ao longo de 35 dias de estocagem sob refrigeração.....	52
Figura 7. Médias dos valores de TBARS (mg MDA/kg) nas linguiças frescas controle e tratamento, durante o período de armazenagem.....	53

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A carne é um dos alimentos mais consumidos no mundo. Quanto ao seu aspecto nutricional, é uma ótima fonte de aminoácidos essenciais e de alguns minerais. O grande consumo também se deve ao seu sabor e à grande variedade de técnicas de preparo a que pode ser submetida, bem como produtos industrializados que se obtêm a partir dela (CARDOSO; ARAUJO, 2003).

Com a industrialização da carne, surgiu uma alternativa para o aproveitamento de cortes menos nobres, agregando valor aos produtos fabricados e aumentando o lucro das indústrias. A diversificação da oferta inclui uma grande variedade de produtos como almôndegas, hambúrgueres, empanados, linguiças, mortadelas e salames. Nos últimos anos, especial atenção tem sido dada a alimentos com menor tempo de preparo para o consumidor, preço acessível, sabor agradável, boa qualidade e também com menor teor de gordura (PARDI, 1996; TERRA, 1998).

Em relação aos tipos de alimentos, dentre outros produtos frequentemente envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos, as carnes merecem especial destaque, pois possuem elevada atividade de água, pH favorável ao crescimento de micro-organismos e elevado percentual de nutrientes, tornando-as excelentes meios de cultura para o desenvolvimento de patógenos e organismos deteriorantes (CARDOSO; ARAUJO, 2003). Mesmo com todos os avanços nas plantas industriais a fim de garantir a produção de alimentos seguros e nutritivos ao consumidor, ainda é comum ocorrer contaminações por micro-organismos patogênicos nestes produtos, levando a sérias injúrias ou até mesmo a morte das pessoas que os consomem. Dessa forma, a segurança alimentar é um tema muito frequente em estudos e pesquisas (BRASIL, 2008).

As linguiças do tipo frescal são alimentos altamente suscetíveis à contaminação microbiana e representam um excelente meio para a multiplicação de micro-organismos. As prováveis fontes de contaminação

envolvem matéria prima de qualidade higiênico-sanitária insatisfatória, envoltórios, temperos ou condimentos, assim como a água utilizada em todas as operações de limpeza (MILANI et al., 2003). As condições de higiene em que os alimentos são beneficiados ou preparados também são fatores responsáveis pela multiplicação microbiana (MARQUES et al., 2006). Entre os micro-organismos que podem contaminar as linguiças, o grupo das enterobactérias destaca-se, pois são organismos frequentemente encontrados na matéria-prima cárnea e que podem abrigar cepas patogênicas como *E. coli* O157, mundialmente associada a surtos alimentares (CHACON et al., 2006).

Na fabricação da linguiça, assim como na maioria dos embutidos cárneos, podem ser adicionados aditivos conservadores para inibir o crescimento microbiano indesejável e com isso, garantir a segurança sanitária do produto (DAGUER, 2005). Com esta função, são empregados os sais de cura, que possuem como compostos ativos os sais de nitrito e/ou nitrato. Contudo, com o crescente aumento do número de consumidores preocupados com a relação alimento e saúde, surge a necessidade de substituir ou reduzir o uso dos sais de cura e de outros aditivos químicos em produtos cárneos (SEBRANEK, BACUS, 2007). Uma das alternativas estudadas para a redução ou substituição dos sais de cura nos produtos cárneos é o emprego de compostos naturais que não possuem efeito tóxico à saúde humana. Pesquisas sobre aditivos naturais alternativos derivados de plantas ou animais mostram-se promissoras na extensão de vida de prateleira desse tipo de produto (TIWARI et al., 2009; MATHENJWA et al., 2012).

O uso de ervas e extratos de plantas naturais sabidamente possuidoras de atividade antimicrobiana e antioxidante e vêm sendo alvo de intensas pesquisas (MC CARTHY et al., 2001; SEBRANEK et al., 2005; KANATT et al., 2008; MATHENJWA et al., 2012).

Assim, o objetivo geral da presente pesquisa foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais contra *E. coli* O157 e selecionar os que obtiveram os melhores resultados, para posteriormente avaliar seu efeito sobre a estabilidade de linguiça suína frescal, prospectando seu uso potencial como conservante natural nesse tipo de produto cárneo.

CAPÍTULO 2

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Óleos essenciais

Óleos essenciais são líquidos aromáticos extraídos de plantas (flor, caule, folha, fruto, semente, tronco ou raiz), obtidos através de vários processos, entre eles destilação, pressão a frio, extração com dióxido de carbono supercrítico ou fermentação (SANCHEZ et al., 2010; HYLDGAARD et al., 2012). O método de destilação a vapor é o mais utilizado a nível industrial para a produção dos óleos comerciais (BURT, 2004).

De uma forma geral, os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas, líquidas e incolores. Seus compostos incluem polifenóis, flavonoides, taninos, alcaloides, terpenóides, isotiocianatos, polipeptídeos ou seus derivados oxigenados, e até mesmo compostos com enxofre (NEGI, 2012). Na mistura componentes majoritários encontram-se em concentrações em até 85%, existindo ainda outros em menores proporções presentes apenas como traços (BURT, 2004; PEREIRA, 2006).

Muitas plantas são usadas com fins medicinais por conterem esses compostos voláteis, mas em muitos casos, o próprio óleo separado da planta é usado como medicamento (SANTOS & NOVALES, 2012). O uso dos óleos essenciais em alimentos vem ganhando importância por apresentar eficiente ação antioxidante e antimicrobiana, substituindo dessa forma o uso de aditivos sintéticos. Além disso, plantas ricas em óleos essenciais são utilizadas a fim de conferir sabor e aroma nos alimentos. Assim, a utilização dessas plantas pode conferir ainda uma extensão na vida de prateleira, pois previne a deterioração dos alimentos (PETER, 2004).

Algumas plantas, tais como cravo, canela, mostarda, alho, gengibre e menta são ainda utilizados como terapias medicamentosas alternativas em países orientais (TAJKARIMI et al., 2010). Entretanto, esta função tornou-se

secundária a função de conferir sabor e aroma, no caso de uso em alimentos. (NEGI, 2012).

2.1.1 Composição e mecanismo de ação dos óleos essenciais

A composição do óleo essencial de uma determinada espécie vegetal pode variar significativamente, de acordo com uma série de fatores tais como: espécie da planta, etapa do ciclo vegetativo em que o vegetal se encontra, fatores ambientais como altitude, temperatura, umidade relativa, tempo de exposição solar, grau de hidratação do solo, presença de micronutrientes e até mesmo o regime de ventos a que a planta está submetida (OUSSALAH, 2007). Sua composição varia também em função da parte da planta de onde é extraído o óleo essencial, bem como do método utilizado para sua extração (ANGIONI et al., 2006; BAKKALI et al., 2008).

A atividade antimicrobiana intrínseca de um óleo essencial pode ser diretamente relacionada com a configuração química individual de seus componentes, a proporção em que se apresentam e a interação entre eles (BURT, 2004). Óleos essenciais são constituídos de uma família de compostos orgânicos de baixo peso molecular e com amplas diferenças com relação à atividade antimicrobiana, podendo ser divididos em quatro grupos: terpenos (p-cimeno), terpenóides (timol, carvacrol), fenilpropenos (eugenol, cinamaldeído) e outros compostos contendo enxofre e nitrogênio em sua composição (isotiocianato de alila, alicina) (HYLDGAARD et al., 2012).

Considerando o grande número de diferentes compostos químicos presentes nos óleos essenciais, provavelmente sua atividade antibacteriana não é atribuída à apenas um mecanismo específico, mas a vários alvos nas células bacterianas. Uma importante característica dos óleos essenciais e seus componentes é a sua hidrofobicidade, o que lhes permite interagir com os lipídios das membranas celulares bacterianas e mitocôndrias, causando distúrbios nessas estruturas, deixando-as mais permeáveis. Assim, a extensão da perda de componentes celulares e/ou extravasamento de íons e moléculas essenciais irão determinar à morte celular (HELANDER et al., 1998; CARSON et al., 2002; BURT, 2004).

Componentes dos óleos essenciais parecem agir também nas proteínas da membrana citoplasmática. Muitas ATPases estão localizadas na membrana citoplasmática circundadas pelos fosfolipídios de membrana, e os óleos essenciais podem se acumular na bicamada lipídica, distorcendo a interação lipídio-proteína (GILL & HOLLEY, 2006). Além disso, é possível ocorrer a direta interação entre os óleos essenciais com partes hidrofóbicas das proteínas, modificando sua conformação e, conseqüentemente, inativando a função proteica (BURT, 2004).

Segundo Marino et al. (2001), a maioria dos estudos que investigam a ação dos óleos essenciais em relação aos micro-organismos patogênicos em alimentos concorda que, geralmente, os óleos são ligeiramente mais ativos contra as bactérias Gram-positivas, do que contra as Gram-negativas. As bactérias Gram-negativas seriam menos susceptíveis à ação dos óleos essenciais devido à existência de membrana lipopolissacarídica externa à parede celular, a qual restringe a difusão de compostos hidrofóbicos até a membrana plasmática. Entretanto, nem todos os estudos com óleos essenciais afirmam sua maior atividade frente a bactérias Gram positivas (WILKINSON et al., 2003), pois os variados componentes majoritários desses óleos exibem diferentes níveis de atividade contra bactérias Gram negativas e Gram positivas (DORMAN & DEANS, 2000).

Óleos essenciais quando usados em alimentos além de conferir sabor podem contribuir na preservação, inibindo o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos ou deteriorantes, sendo usados em média de 0,05 – 0,1% (500 – 1000 ppm) nos sistemas alimentares (NEGI, 2012). Algumas ervas e especiarias contendo óleos essenciais possuem atividade antimicrobiana mais forte e devem ser usados em concentrações menores que 1000 ppm. Entretanto, outras requerem altas concentrações para atingirem efeito antimicrobiano esperado, o que muitas vezes inviabiliza uso devido transmissão de gosto indesejável ao produto testado. Dessa forma, associações entre diferentes óleos essenciais com diferentes mecanismos de ação, que possuem efeito sinérgico, fazem com que doses menores sejam utilizadas para uma efetiva atividade antimicrobiana sem alterar tão

significativamente os aspectos sensoriais do alimento tratado (TAJKARIMI et al., 2010).

2.1.2 Óleo essencial de orégano

Orégano (*Origanum*) é uma erva pertencente à família Lamiaceae e possui uma grande diversidade de espécies (*Origanum vulgare*, *O. marjoram*, *O. dictamnus*, *O. hirtum*, *O. onites*). Uma grande parte do orégano comercializada no mundo pertence às espécies *O. vulgare* ssp. *hirtum* e *O. onites*, cultivados em áreas montanhosas do Mediterrâneo e algumas áreas da Turquia (DORMAN et al, 2003).

O óleo essencial de orégano tem atividade antimicrobiana contra diversos micro-organismos Gram positivos, Gram negativos e fungos (KIM et al. 1995, SOUZA et al. 2013). Vários estudos avaliaram o efeito do óleo essencial de orégano sobre diversos micro-organismos, sendo que os valores de concentração inibitória mínima variam de acordo com a cepa testada e a metodologia aplicada para o teste (BURT, 2004).

Marino, Bersani e Comi (2001), trabalhando com meio de cultura líquido, observaram que o óleo essencial de orégano na concentração de 800 ppm (0,08%) inibiu totalmente a multiplicação de *E. coli* O157:H7, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Micrococcus* sp. *Sarcina flava*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis* e *Listeria* sp, demonstrando assim o poder antimicrobiano desse óleo frente bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Estudos recentes comprovam as propriedades antimicrobianas do óleo essencial de orégano, mostrando que tais substâncias inibem fortemente o crescimento e algumas características metabólicas de cepas de *S. aureus* isolados de alimentos, incluindo supressão de atividade enzimática da coagulase e lipase, diminuindo a tolerância ao sal e inibindo produção de enterotoxinas (KIM et al., 1995; JUNEJA; FRIEDMAN, 2007; LAHUCKY et al., 2010; SOUZA et al., 2013). Alguns autores reportam uma alta concentração do composto fenólico carvacrol no óleo de orégano, sendo este o composto

majoritário, presente na concentração de 80-85% (MARINO et al., 2001; BAKKALI et al., 2008; TAJKARIMI et al., 2010).

Pereira (2006) encontrou, no óleo essencial de orégano extraído das folhas da planta, como componente majoritário o carvacrol (Figura 1), que mostra eficiente ação antioxidante, comparada à conhecida atividade da vitamina E e BHT (hidroxibutiltolueno). Os terpenos presentes no óleo essencial de orégano possuem importante atividade antioxidante, pois são capazes de doar elétrons aos radicais livres reativos, tornando-as moléculas mais estáveis e não reativas (DORMAN et al., 2003). Devido seu amplo uso como tempero nos mais variados alimentos e preparações, sua utilização como conservante natural é promissora, frente seu poder antimicrobiano contra os mais variados micro-organismos (NEGI, 2012).

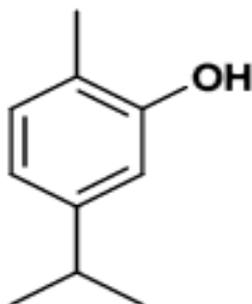


Figura 1. Estrutura química do carvacrol
Fonte: BURT, 2004.

2.1.3 Óleo essencial de alho

O uso medicinal do alho é bem documentado ao longo da história (HYLDGAARD et al., 2012), sendo um ingrediente muito usado na culinária como condimento. Pertence à família Liliaceae, espécie *Allium sativum* L., sendo o bulbo a parte mais usada para a extração de óleo essencial. Como componente químico majoritário destaca-se a alicina, que é reportada como sendo o principal elemento com ação antimicrobiana (NEGI, 2012).

Ying e Cheng (2003) relatam propriedades antimicrobianas do alho, quando adicionado em maionese na concentração de 1%, sendo capaz de reduzir a contagem de *Salmonella sp* em até dois ciclos logarítmicos. O óleo essencial de alho também mostra significativa redução de *E. coli* em carne fresca (em concentrações de 0,5-1%) segundo estudos dos mesmos autores.

A alicina (Figura 2) desempenha ação muito importante na defesa da planta contra insetos, fungos e bactérias existentes no solo. Devido ao seu poder redutor, provoca uma reação instantânea com grupos tiol, levando a inativação de diversas enzimas. Ao longo de vários anos, estudos *in vitro* demonstraram que a alicina tem uma forte atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária contra uma vasta gama de micro-organismos (HYLDGAARD et al., 2012).

A atividade antimicrobiana da alicina é atribuída a um grupo químico reativo (-S(O)-S-) que se liga e inibe uma ampla gama de alvos intracelulares. Estudos indicam que a alicina é uma inibidora não específica de muitas enzimas, dentre elas tiol-proteases, glutatona e acetil-Coa (HYLDGAARD et al., 2012).

Em produtos altamente perecíveis como carnes, torna-se indispensável à ação de antimicrobianos para preservar a sua qualidade e segurança por um período maior de tempo, além disso, do ponto vista sensorial a combinação de aromas com alho é uma prática de tempero comum na Europa e na América Latina, e bem aceito pelos consumidores (TJKARIMI et al., 2010).

Doses bactericidas de alicina são citadas por diversos autores, variando entre 3 a 100 µg/mL, enquanto que doses bacteriostáticas são citadas variando de 0,15 a 1,5 µg/mL (HYLDGAARD et al., 2012). Sasaki et al (1999), demonstraram a efetividade do óleo essencial de alho contra *E. coli* O157:H7 em testes *in vitro*.

A alicina poderia potencialmente ser usada em combinação com outros agentes antimicrobianos, porque possui efeitos comprovados sobre inibição de síntese de RNA e, assim, reduziria ou impediria ação de mecanismos de proteção de células que são dependentes de proteínas (HYLDGAARD et al., 2012).

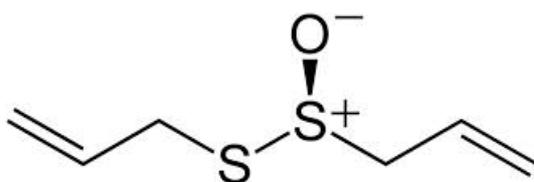


Figura 2. Estrutura química da Alicina.

2.1.4 Óleo essencial de mostarda

O óleo essencial de mostarda apresenta um odor forte e sabor picante, e é muito utilizado na culinária de países orientais, como Índia e Bangladesh. A mostarda pertencente à família Brassicaceae, com destaque para algumas espécies como *Brassica nigra* e *B. juncea*, que apresentam em sua composição glucosinolatos que são compostos sulfúricos formados por um grupo β -D-tioglicosídico e uma cadeia lateral com estruturas variáveis. A reação de hidrólise dos glucosinolatos, catalisada por uma enzima endógena conhecida como mirosinase, pode resultar vários compostos, dentre eles os isotiocianatos. Vários destes compostos são voláteis com comprovada atividade fungicida, nematicida e bactericida (NJOROGÉ et al., 2008).

O composto alifático isotiocianato de alila, é o composto majoritário da ação hidrolítica da enzima mirosinase endógena sobre o glucosinolato sinigrina em plantas crucíferas como a mostarda, raiz forte e wasabi (CHACON et al., 2006).

Luciano e Holley (2009) testaram a ação do isotiocianato de alila sobre as enzimas tioredoxina redutase e acetato quinase extraídas de *E. coli*, e observaram atividade inibitória em ambas as enzimas. A tioredoxina redutase foi inibida com a menor concentração testada (1 μ L/L), sugerindo que a atividade inibitória desta substância contra *E. coli* pode estar relacionada, pelo menos em parte, à inibição da síntese de DNA. A enzima acetato quinase também foi inibida, sua ação está envolvida no metabolismo energético da célula bacteriana. Acetato quinase juntamente com a enzima fosfoacetilase, são usadas para formar acetil-Coa, que está envolvida em várias vias metabólicas celulares.

O isotiocianato de alila ao penetrar na membrana das células bacterianas não age num alvo exclusivo, seu mecanismo de ação antimicrobiana está assim relacionado com sua inibição geral de enzimas e alterações de proteínas por clivagem oxidativa de ligações dissulfeto (LUCIANO E HOLLEY, 2009).

Com as características relatadas de poder antimicrobiano, o potencial uso do isotiocianato de alila (ITA) (Figura 3) em alimentos é muito promissor para

aumentar a vida de prateleira dos produtos, reduzindo ou eliminando o uso de aditivos sintéticos, que segue a demanda crescente dos consumidores, por alimentos mais naturais (LEMAY et al., 2002). Pesquisas em produtos cárneos, dentre eles salame (CORDEIRO et al., 2013), mortadela (HOLLEY, 1997) e até mesmo em carne moída (NADARAJAH et al., 2005) já demonstraram o potencial antimicrobiano do ITA.

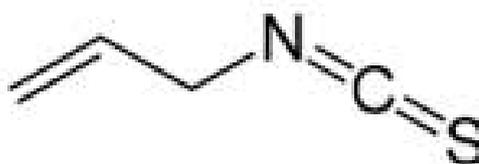


Figura 3. Estrutura química do Isotiocianato de Alila.
Fonte: Hyltdgaard et al., 2012

2.1.5 Óleo essencial de canela

O óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume – família Lauraceae) é utilizado como flavorizante, aromatizante e conservante natural de alimentos (MATAN et al., 2006). De acordo com as partes utilizadas na extração de óleo essencial, os compostos majoritários se alteram (cânfora da casca de raízes, eugenol das folhas, e cinamaldeído da casca), sugerindo diferentes perfis de atividade. A atividade antimicrobiana do óleo essencial obtido das cascas tem sido relatada contra bactérias e fungos, com especial interesse na atividade contra patógenos e micro-organismos deteriorantes de alimentos (HELANDER et al., 1998). Dessa forma pode-se afirmar que seu componente maioritário, o trans-cinamaldeído (Figura 4), é o principal responsável pela atividade antibacteriana do óleo da casca da canela (JUNEJA, FRIEDMAN, 2007).

Oussalah et al. (2006), em seu estudo *in vitro* sobre a ação do óleo essencial de canela (75% de cinamaldeído), observou o extravasamento de conteúdo celular por aumentar permeabilidade da membrana plasmática de *E. coli* e *Salmonella infantis*. Os compostos ativos presentes no óleo de canela também apresentam a capacidade de interferir na síntese enzimática bacteriana, além de provocarem danos à estrutura de sua parede celular, assim como o eugenol e o carvacrol (GILL, HOLLEY, 2006). É sabido que o cinamaldeído possui atividade inibitória frente ao crescimento de *E. coli*

O157:H7 e *S. typhimurium* em concentrações semelhantes ao carvacrol e ao timol (BURT, 2004). Diversos outros autores comprovaram a atividade antimicrobiana sinérgica dos óleos essenciais de cravo e canela contra bactérias e fungos *in vitro* (LÓPEZ et al., 2005; TRAJANO et al., 2009; SILVA et al., 2009). Contudo, como a atividade antimicrobiana desse óleo pode ser menor em sistemas alimentares do que em meios de cultura, são necessários estudos para comprovar a eficiência dos óleos essenciais para a inibição de patógenos em sistemas alimentares.

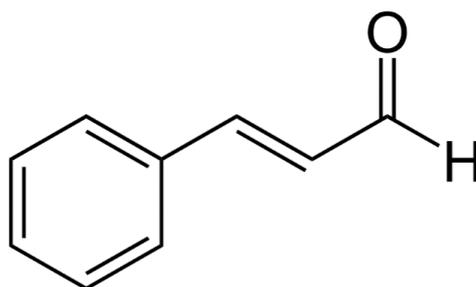


Figura 4. Estrutura química do Cinamaldeído
Fonte: BURT, 2004

2.2 *Escherichia coli* enterohemorrágica

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa e um dos habitantes mais comuns do trato intestinal dos animais de sangue quente. Sua presença na água e nos alimentos é um importante indicador de contaminação fecal, porém, a grande maioria das estirpes desta espécie não são patogênicas. Contudo, algumas cepas podem causar infecções urinárias, intestinais e produzir enterotoxinas causadoras de graves doenças de origem alimentar (JAY, 2005).

E. coli O157 é um sorotipo de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) que produz verotoxinas ou Shiga-toxinas. Essas toxinas podem causar sérios danos à saúde humana, incluindo colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica. Surto alimentares causados por esta bactéria estão associados ao consumo de carne, leite, suco de frutas, vegetais e até mesmo água contaminados (NORMANNO et al., 2004). Os fatores de virulência deste micro-organismo permitem sua adesão causando então sua toxicidade. Uma proteína de membrana, denominada intimina, media a adesão do patógeno aos enterócitos na forma de um pedestal, causando discretas lesões em suas

vilosidades. Os principais produtos tóxicos da *E. coli* são as verotoxinas, também conhecidas como shiga toxinas. Seu nome vem da capacidade em induzir efeito citopático característico em monocamadas de células Vero. Entretanto, nem todas as cepas de *E. coli* produzem toxinas. A enterohemolisina é um fator de virulência acessório que a *E. coli* pode possuir, definindo esta produção (DONTOROU et al., 2003). *E. coli* O157 não fermenta sorbitol em 24 h e não possui ativa a enzima β -glicuronidase o que a faz diferente da maioria das outras *E. coli* (GETTY, 2000).

Sintomas causados pelas EHEC incluem diarreia suave à severa, inicialmente sem sangue, dores abdominais e ausência ou leve fase febril. Numa primeira fase ocorre a diarreia aquosa por 24 a 48 horas, seguida de diarreia com sangue por quatro a dez dias, com severa dor abdominal e severa desidratação. Síndrome urêmica hemolítica afeta principalmente crianças e caracteriza-se por anemia, trombocitopenia e falência renal aguda (JAY, 2005).

Globotriosil ceramida (Gb3) é o receptor para as verotoxinas. Esse é um receptor presente na superfície de células de tecidos corporais específicos, sendo abundante nas células da córtex renal humana, além de células endoteliais (GETTY et al., 2000).

Bovino é o principal reservatório da *E. coli* O157, apesar de este micro-organismo já ter sido isolado em outras espécies como suínos, ovelhas e aves (NORMANNO et al., 2004). Consumo de carne bovina mal passada ou ainda leite cru podem originar surtos de *E. coli* O157, entretanto uma série de outros produtos já foram implicados como causadores de surtos: leite não pasteurizado e queijo de cabra, linguiças, sanduíches de carne bovina, sucos de fruta não pasteurizados (DONTOROU et al., 2003). Normanno et al. (2004) isolaram cepas de *E. coli* O157 em linguiças frescas comercializadas no sul da Itália, adquiridas de açougues locais. Em 150 amostras adquiridas de açougues locais, 10 foram positivas para *E. coli* O157.

A *E. coli* O157:H7 tem sido reconhecida mundialmente, nos últimos tempos, como um dos micro-organismos mais envolvidos nos surtos de doenças vinculadas por alimentos em humanos. Em 1982, ocorreu o primeiro surto de *E. coli* O157:H7 pelo consumo de hambúrguer mal cozido em uma

grande rede de “fast food” nos Estados Unidos, que envolveu 600 pessoas, resultando na morte de quatro crianças (KASNOWSKI, 2004).

Nos Estados Unidos da América, em 1994, o consumo de salame contaminado com *Escherichia coli* O157:H7 que levou a 18 casos de DTA, serviu para que EUA e Canadá passassem a exigir redução da ordem de 5 log na população de *E. coli* O157:H7 durante o processo de produção de embutidos fermentados (PALANICHAMY et al., 2008).

No Brasil, durante os anos de 1999 a 2008 foram notificados 6.062 surtos de DTAs, envolvendo 117.330 pessoas doentes e 64 óbitos. Os principais tipos de micro-organismos envolvidos nessas DTAs foram as enterobactérias como *Salmonella* sp., *Shigella* sp. e *Escherichia coli*. As carnes e derivados estiveram entre os maiores causadores desses surtos, logo atrás dos produtos a base de ovos (BRASIL, 2008). Diante destes fatos, a inocuidade ainda é um requisito de qualidade que deve ser alcançado nos produtos cárneos fabricados no País.

2.3 Embutidos cárneos frescais

Entendem-se como produtos cárneos processados ou preparados, aqueles em que as propriedades originais da carne fresca foram modificadas através de tratamento físico, químico ou biológico, ou através da combinação destes métodos. O processo envolve geralmente cortes ou cominuições mais ou menos intensos, adição de condimentos, especiarias e aditivos diversos (PARDI et al., 1996).

O regulamento técnico de identidade e qualidade de linguiças (BRASIL, 2000) define-as como sendo um “produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionado ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, e submetido a processo tecnológico adequado”. Ainda segundo este regulamento, as linguiças frescais caracterizam-se por apresentar teores máximos de 70% de umidade, 30% de gordura e 0,1% de cálcio (em base seca), e um teor mínimo de 12 % de proteína.

O Brasil é o 4º maior produtor de carne suína do mundo, estando atrás apenas da China, União Européia e Estados Unidos. O País também é o 4º maior exportador mundial desse tipo de carne, atrás dos Estados Unidos,

União Européia e Canadá (ABIPECS, 2012). No que se refere ao mercado brasileiro, o consumo de carne suína permanece em processo de fortalecimento, estando próximo a 15 Kg/ ano. A preferência dos consumidores brasileiros está centrada nos produtos industrializados e a demanda por carne *in natura* ainda é incipiente, mas apresenta potencial para crescer (ABIPECS, 2012).

A industrialização da carne suína surgiu como alternativa para o aproveitamento dos cortes menos nobres da carcaça, agregando valor aos produtos e aumentando o lucro das indústrias. A diversificação da oferta inclui um grande número de produtos como almondegas, hambúrgueres, empanados, linguiças, mortadelas, salames, entre outros. Nos últimos anos, especial atenção tem sido dada a alimentos com menor tempo de preparo para o consumidor, de preço acessível, sabor agradável, de boa qualidade e também com menor teor de gordura (CORREIA, 2008).

As linguiças constituem os derivados cárneos mais fabricados no Brasil uma vez que sua elaboração não exige tecnologia sofisticada. Entretanto, por não serem submetidas a tratamento térmico, as linguiças frescas podem apresentar elevada carga microbiana e conseqüentemente, reduzida vida de prateleira (TERRA, 1998; SILVEIRA, 2012).

A carga microbiana das linguiças frescas pode ser proveniente da matéria-prima contaminada no abatedouro pela pele do animal, sujidades do solo, conteúdo gastrintestinal ou durante seu processamento por meio de equipamentos e utensílios mal higienizados, água usada na limpeza ou formulação do produto, manipuladores e embalagens (SILVEIRA, 2012). Dessa forma, o estado microbiológico inicial da carne utilizada na elaboração de produtos derivados é de suma importância na qualidade microbiológica desses produtos e, conseqüentemente, em sua vida útil (GERMANO; GERMANO, 2003).

Numerosos fatores influenciam o tipo de micro-organismo que contamina os produtos cárneos como o pH, a adição de sais e condimentos, aditivos e forma de processamento. O tipo e a intensidade da contaminação também são influenciados pela embalagem, temperatura de armazenamento e composição química do produto final (GERMANO; GERMANO, 2003). Normalmente a

microbiota deteriorante das linguiças frescas é geralmente composta por enterobactérias, *Pseudomonas*, bactérias lácticas e leveduras (BROMBERG, 2002).

Os embutidos frescos curados, como as linguiças frescas, recebem adição de sais de cura (sais de nitrato e /ou sais de nitrito) como agentes conservantes que atuam inibindo o desenvolvimento de micro-organismos específicos, principalmente *Clostridium botulinum*. Esses sais também têm efeito positivo na cor do produto, pois conferem cor avermelhada bastante atrativa, na prevenção da oxidação lipídica e na promoção de sabor e aroma. Contudo, a ação antimicrobiana do nitrito é pouco eficaz contra patógenos entéricos gram-negativos, tais como *Salmonella* e *Escherichia coli* (TOMPKINS, 2005; SEBRANEK, BACUS, 2007). Esses sais de cura também são pouco eficientes contra bactérias lácticas, consideradas como deterioradoras em produtos cárneos (BROMBERG, 2002).

A forte demanda dos consumidores por alimentos de alta qualidade, mais naturais e seguros pode ser atribuída em partes pela facilidade de acesso a informação e noções de saúde para obtenção de maior qualidade de vida. Há também novos conceitos sobre segurança alimentar sendo difundidos devido à ocorrência de surtos alimentares causados por micro-organismos patogênicos. Dessa forma, a busca por alternativas aos conservantes químicos e outros aditivos alimentares, vem sendo alvo de constante estudo (TAJKARIMI, 2010).

O uso de antimicrobianos naturais como ácidos orgânicos, óleos essenciais, extratos de plantas e bacteriocinas podem ser uma boa alternativa para assegurar segurança alimentar e fornecer alimentos mais naturais (BURT, 2004). Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas testando a eficiência dos óleos essenciais como conservantes em vários tipos de alimento, em especial aos derivados cárneos (KANATT, et al., 2008; TAJKARIMI et al., 2010; HAYES et al., 2011).

Diferentes estudos já demonstraram a efetividade antimicrobiana dos óleos essenciais em controlar ou inibir o crescimento de micro-organismos deteriorantes ou patogênicos que são vinculados por alimentos (LEMAY et al., 2002; KANATT et al., 2008; MATHENJWA et al., 2012; CORDEIRO et al., 2013). Porém, quando aplicados em alimentos com intuito de inibir ou controlar

algum micro-organismo específico, os óleos essenciais têm sua atividade reduzida através de interações que fazem com os componentes dos alimentos, como gorduras e proteínas. Dessa forma, há necessidade de aumentar as doses definidas como inibitória e bactericida mínimas, quando faz-se aplicação em alimentos. Como são compostos aromáticos, conferem sabor e aroma específicos ao alimento, e quanto menor for a concentração aplicada ao alimento, menor serão as mudanças em relação ao gosto ou odor. Assim sendo, usando o potencial antimicrobiano de condimentos que já estão naturalmente presentes em certas receitas, podem-se minimizar esses efeitos adversos (TAJKARIMI, 2010).

2.4 Aspectos de qualidade dos embutidos frescos

2.4.1 Microbiota de linguiças frescas

A qualidade microbiológica da linguiça fresca é determinada pelo padrão microbiológico estabelecido pela Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, a qual define valores para Coliformes a 45 °C, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Clostridium* sulfito redutor a 46 °C e *Salmonella* sp (BRASIL, 2001).

O grupo dos micro-organismos conhecidos como Coliformes termotolerantes constitui-se de um grupo de enterobactérias capazes de fermentar lactose a 45 °C com produção de gás e ácido, tendo como representante mais expressiva a bactéria *E. coli*. Altas contagens deste grupo de microrganismo indicam falhas higiênicas ao longo do processamento (FIGUEIRÓ, 2013).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos gram positivos, anaeróbicos facultativos, podendo ser coagulase positiva ou negativa (JAY, 2005). A prova da coagulase é utilizada para identificar *Staphylococcus aureus* em alimentos. *Staphylococcus aureus* é uma das espécies patogênicas mais comuns associadas aos alimentos, devido produção de enterotoxinas nos alimentos. Toxinas estas frequentemente associadas aos surtos de intoxicação alimentar. Por essa bactéria estar frequentemente presente na pele e mucosa humana, sua presença nos alimentos é um indicador de manipulação inadequada dos mesmos (SILVA JR, 2002).

A microbiota psicrotrófica de carnes e derivados pode se multiplicar em temperaturas iguais ou inferiores a 0 °C, sendo elas responsáveis por grande parte das alterações dos produtos refrigerados. Apesar dos micro-organismos psicrotróficos não serem considerados um fator determinante na qualidade de linguiça frescal, se presentes, podem atuar como indicativo de deterioração microbiológica, e o aumento de sua contagem resulta em perda de qualidade do produto (JAY, 2005).

Como a linguiça é mantida em ambientes refrigerados, a microbiota de superfície será dominada por organismos capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração (JAY, 2005). A microbiota psicrotrófica de produtos cárneos, como a linguiça, será composta predominantemente por bactérias Gram negativas causadoras de putrefação quando em ambiente aeróbico, enquanto que em ambiente anaeróbico, como embalagens a vácuo ou com atmosfera modificada com alto teor de dióxido de carbono, essa microbiota será composta por bactérias lácticas não putrefativas (SOFOS, 2008).

Um primeiro indício de alteração da linguiça frescal é a produção de odores desagradáveis, perceptíveis quando o número de micro-organismos existentes alcança em torno de 10^7 UFC/g. Neste momento observa-se aumento do pH e de compostos como amoníaco e aminas, decorrentes do metabolismo bacteriano (SILVEIRA, 2012). Quando a população de micro-organismos atinge em torno de 10^8 UFC/g, aparece um outro indício de alteração na carne, através da formação de uma limosidade superficial.

2.4.2 Aspectos físico-químicos de linguiças frescas

2.4.2.1 Oxidação lipídica

A oxidação lipídica é o termo utilizado para descrever uma sequência complexa de alterações químicas resultantes da interação de lipídios com o oxigênio. Este processo pode ocorrer por mecanismos químicos ou enzimáticos (FIGUEIRÓ, 2013). A auto-oxidação é um processo químico, considerado o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras e ocorre através da reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados (ORDONEZ, 2005).

Hidroperóxidos são considerados os produtos mais importantes da reação inicial obtidos da oxidação lipídica. Os produtos oriundos de sua decomposição, como malonaldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos e ácidos são de extrema importância para a qualidade dos alimentos tendo em vista as alterações sensoriais que exercem nos mesmos (GEORGANTELIS, 2007; ARAÚJO, 2011).

Os produtos da oxidação lipídica são indesejáveis, não somente pela produção de odores e até mesmo alterando coloração característica dos produtos, mas também pela destruição de constituintes essenciais, ocasionando um decréscimo do valor nutricional dos alimentos e a formação de compostos tóxicos durante o processamento como álcoois, aldeídos, cetonas ésteres e outros hidrocarbonetos (CAMPAGNOL et al., 2011).

O malonaldeído, produto oriundo da oxidação lipídica, tem sido muito utilizado como um modelo para quantificação dos produtos secundários da oxidação. Por meio de sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), forma-se um composto de coloração rósea, utilizado para detectar o nível de oxidação dos produtos alimentícios, principalmente os cárneos (CAMPAGNOL et al., 2011).

Para se evitar a oxidação há a necessidade de se manter ao mínimo os níveis de temperatura e luz, que são os responsáveis pelo desencadeamento do processo de formação de radicais livres. Ainda é necessário evitar a presença de traços de metais, contato com o oxigênio e bloquear a formação dos radicais livres por meio do emprego de antioxidantes (ARAÚJO, 2011).

Antioxidantes são compostos que podem prevenir ou retardar o processo oxidativo causados pelos radicais livres e pelas espécies reativas ao oxigênio em alimentos, postergando a deterioração, rancidez e descoloração decorrente da autooxidação. Estas mudanças levam a deterioração do sabor, aroma e coloração dos alimentos, itens importantíssimos na observação do consumidor por ocasião da aquisição (CAMPAGNOL et al., 2011).

Os antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais. Os primeiros têm como representantes compostos fenólicos sintéticos como o butil hidroxitolueno (BHT) e butil hidroxianisol (BHA). Contudo, há uma preocupação com a utilização desses antioxidantes sintéticos devido a relatos sobre efeitos

negativos, como carcinogenicidade. E é nesse contexto que os antioxidantes naturais, como tocoferol, polifenóis e pigmentos carotenoides, têm apresentado uma grande relevância na proteção contra oxidação lipídica, pois são compostos seguros e atóxicos ao organismo humano (GEORGANTELIS, 2007).

Com a considerável preocupação nos últimos tempos de se substituir aditivos sintéticos por naturais, demanda mundial por alimentos mais saudáveis, antioxidantes naturais vêm ganhando espaço, especialmente os antioxidantes obtidos de plantas medicinais e ervas (VALENCIA et al., 2008).

2.4.2.2 Cor instrumental

A cor é a primeira característica sensorial apreciada pelo consumidor. Essa impressão óptica é relacionada de imediato com diversos aspectos ligados à qualidade ao grau de frescor. Assim, o aspecto exterior pode ser associado ao tempo de armazenamento e à vida útil do produto (ORDÓNEZ, 2005).

A mioglobina é o principal pigmento responsável pela cor da carne. A molécula de mioglobina é formada por uma porção proteica, denominada globina, e por um grupo prostético de natureza não-proteica. Este último é um grupamento heme, denominado ferro portoporfirina IX (ORDÓNEZ, 2005).

Na ausência de oxigênio (O_2), a mioglobina encontra-se na forma de desoximioglobina, apresentando coloração roxa. Quando a carne é exposta a atmosferas ricas em O_2 , a desoximioglobina passa para o estado de oximioglobina e desenvolve a coloração vermelho brilhante. Ao longo de uma contínua exposição ao O_2 , há oxidação da oximioglobina em metamioglobina, sendo extremamente indesejável para a atratividade da carne, devido sua coloração marrom (KENNEDY et al., 2004).

Em produtos cárneos, como as linguiças, que recebem sais de cura em sua composição, os sais de nitrito de sódio e/ou potássio, reagem com a mioglobina, transformando-a em metamioglobina. O sal aumenta a capacidade de oxidação da mioglobina e reduz a tensão superficial do oxigênio da carne, promovendo a oxidação do pigmento. O óxido nítrico combinado com a metamioglobina origina a nitrosometamioglobina, que pode reduzir-se a

nitrosomioglobina (pigmento da carne curada sem ação do calor) (DAGUER, 2005).

2.4.2.3 pH

Grande parte dos alimentos frescos, como carnes e derivados, apresentam pH ligeiramente ácido, em torno de 5,0 a 6,5. Valores de pH serão influenciados nas carnes por diversos fatores, entre eles, espécie animal em questão, tipo de músculo, temperatura em que ocorre processo post-mortem e fatores de estresse (ORDÓNEZ, 2005).

A velocidade de redução do pH após o abate é importante, pois influencia a qualidade da carne e seus derivados. O pH desempenha um importante papel na capacidade de retenção de água, perda de peso ao cozimento e na força de cisalhamento. O baixo pH pode causar inibição da atividade de enzimas proteolíticas, desnaturação de proteínas miofibrilares e encurtamento excessivo do sarcômero, que torna a carne mais dura com menor capacidade de retenção de água (GOU et al., 2002).

Assim, o pH de um embutido frescal como a linguiça, pode variar em torno de 5,6 a 6,4, dependendo da qualidade da matéria-prima cárnea que foi utilizada em sua formulação, além de aditivos intencionais que possam ser adicionados aos produtos para conferir alguma característica específica (PARDI, 1996).

O gênero *Pseudomonas* é um dos principais causadores da deterioração de carnes e derivados em aerobiose sob refrigeração, isso devido sua aptidão proteolítica. Essa proteólise gera formação de muco e altera a consistência da carne. Neste caso o pH tende a se alcalinizar em função de compostos formados, como amônia, que facilitará o desenvolvimento de outros micro-organismos (JAY, 2005).

CAPÍTULO 3

3 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais contra *E. coli* O157 *in vitro* **(*Antimicrobial activity of essential oils against E. coli* O157 *in vitro*)**

RESUMO

Antimicrobianos naturais são alternativas aos conservantes tradicionais para a preservação de alimentos. Alinhados às novas demandas de mercado, são obtidos a partir de plantas aromáticas ricas em óleos essenciais. Em alimentos seu uso é prospectado principalmente para a conservação devido à sua ação inibitória sobre o crescimento microbiano. Entre os micro-organismos emergentes, causadores de enfermidades transmitidas por alimentos, estão cepas patogênicas de *E. coli* como *E. coli* O157, mundialmente associada a surtos alimentares. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de alho, do carvacrol (um dos principais componentes do óleo essencial de orégano), do cinamaldeído (principal constituinte do óleo essencial de canela) e do isotiocianato de alila (ITA - um dos principais componentes do óleo essencial de mostarda) frente a um *pool* de cepas de *E. coli* O157. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais, isoladamente e em combinação, contra *E. coli* O157 *in vitro* foram determinadas pela técnica de diluição em tubos. Todos os óleos essenciais testados mostraram atividade inibitória sobre *E. coli* O 157, sendo da menor para a maior dose, ITA, cinamaldeído, carvacrol e óleo de alho. As menores doses individuais dos óleos essenciais para inibição de *E. coli* O157 foram obtidas para ITA e cinamaldeído, 50 ppm e 100 ppm respectivamente. Contudo, no uso conjunto dos óleos essenciais, a combinação de ITA e óleo de alho foi a única que apresentou efeito sinérgico contra o patógeno. O emprego da combinação de ITA e óleo de alho mostra-se promissora para uso em alimentos, sendo eficiente na inibição de *E. coli* O 157.

Palavras-chave: Óleos essenciais, concentração inibitória mínima, *E. coli* O157:H7, sinergismo.

ABSTRACT

Natural antimicrobials are alternatives to traditional food preservatives. Aligned to the new demands of the consumer market, these compounds are made from herbs and spices, rich in essential oils. Among the emerging micro-organisms that cause foodborne diseases in humans are pathogenic strains of *E. coli* such as *E. coli* O157, associated with foodborne outbreaks worldwide. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* activity of essential oils, carvacrol (major component of essential oil of oregano), cinnamaldehyde (main constituent of cinnamon essential oil), allyl isothiocyanate (ITA - a major component of essential oil of mustard) and garlic oil against a *pool* of *E. coli* O157. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the essential oils, alone and in combination, against *E. coli* O157 were determined *in vitro* by the tube dilution technique. All essential oils tested showed inhibitory activity against *E. coli* O 157, with the lowest to the highest dose, ITA, cinnamaldehyde, carvacrol and garlic oil. The smaller single doses of essential oils to inhibit *E. coli* O157 were obtained for ITA and cinnamaldehyde, 50ppm and 100ppm respectively. However, when tested in combination, garlic oil and ITA was the only one that showed a synergistic effect against the pathogen. The use of a combination of garlic oil and ITA shown to be promising for use in food, being effective in inhibition of *E. coli* 157.

Keywords: Essencial oils, Minimum Inhibitory Concentration, *E. coli* O157:H7, synergism.

3.1 INTRODUÇÃO

A despeito de todos os avanços tecnológicos ocorridos nos processos de produção de alimentos, ainda é comum a ocorrência de surtos por doenças transmitidas por alimentos (KIM et al., 1995). Geralmente as bactérias são as principais responsáveis pela deterioração ou contaminação de carnes e derivados, em função da alta atividade de água, pH próximo da neutralidade e por possuírem riqueza de nutrientes (ORDÓÑEZ, 2005).

No ano de 2013, as doenças transmitidas por alimentos foram um importante problema de saúde pública nos EUA, demonstrando através de

resultados de estatísticas que medidas preventivas precisam ser encontradas. Tais estatísticas revelaram pouco mais de 19000 casos de doenças transmitidas por alimentos, com 4200 hospitalizações e 80 mortes. Destes, casos de *E. coli* chegam perto de 30% do total das estatísticas (CDC, 2013).

Para controlar o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e deterioradores nos produtos cárneos, torna-se indispensável o uso de aditivos conservadores (SEBRANEK; BACUS, 2007). Contudo, com a atual demanda dos consumidores por produtos saudáveis, a indústria de alimentos vem buscando alternativas para substituir os conservantes sintéticos por conservantes naturais, sem comprometer a qualidade do produto final (NEGI, 2012).

Dentre essas alternativas, destacam-se os óleos essenciais por suas comprovadas ações antimicrobianas (HYLDGAARD et al., 2012; NEGI, 2012; TAJKARIMI et al., 2010; BURT, 2004) . A atividade antimicrobiana dos óleos depende da composição de cada um, sendo uma importante característica destes a hidrofobicidade, que lhes permite interagir com lipídios das membranas celulares bacterianas e mitocôndrias, causando distúrbios nessas estruturas, deixando-as mais permeáveis. Perda de íons e de outros componentes celulares podem ocorrer, em maior ou menor grau, que determinarão à morte celular (HELANDER et al., 1998; CARSON et al., 2002; BURT, 2004).

Componentes dos óleos essenciais podem ainda agir em proteínas da membrana citoplasmática bacteriana. Enzimas como ATPases são sabidamente localizadas na membrana citoplasmática circundadas por moléculas de lipídios. Moléculas lipofílicas de hidrocarbonos dos óleos essenciais podem se acumular na bicamada lipídica, distorcendo a interação lipídio-proteína. Ainda direta interação entre componentes lipofílicos com partes hidrofóbicas das proteínas pode ocorrer, modificando estrutura celular (BURT, 2004).

A ação antimicrobiana do óleo de orégano (*Origanum vulgare* L.) e do óleo de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) tem sido relatada por diversos autores (KIM et al., 1995; GUTIERREZ et al., 2008; OROOJALIAN et al., 2010). Apesar de sua ação antimicrobiana efetiva, os óleos essenciais de

orégano e de canela apresentam odor acentuado, que dificulta seu uso em alguns alimentos. Diante disso, sugere-se a aplicação combinada de óleos essenciais em concentrações sub-inibitórias individuais para suavizar os odores peculiares de cada óleo e permitir a potencialização de sua ação conservadora (NEGI, 2012). Dentre os óleos com potencial aplicação em carnes e derivados, os óleos de mostarda e de alho são alternativas interessantes, pois, por serem geralmente utilizados como condimentos nos produtos cárneos, não causariam alterações sensoriais significativas nesses produtos quando utilizados em doses bacteriostáticas e bactericidas (GUTIERREZ et al., 2008).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito inibitório *in vitro* de carvacrol (um dos principais componentes do óleo essencial de orégano), do cinamaldeído (principal componente do óleo essencial de canela), do isotiocianato de alila (um dos principais componentes do óleo essencial de mostarda) e do óleo essencial de alho contra um *pool* de cepas de *E. coli* O157.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 COMPOSTOS QUÍMICOS E CEPAS BACTERIANAS

Os óleos essenciais carvacrol, cinamaldeído e isotiocianato de alila foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich Chemical Co, Inc. (St. Louis, EUA). O óleo de alho foi adquirido da empresa Zhengzhou Sigma Chemical Co., LTD. (Henan, China) com concentração de 55,2% de alicina, principal componente de ação antimicrobiana do alho.

As cepas de *E. coli* O157 (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. Essas cepas não produzem shiga-toxina.

3.2.2 PREPARO DO INÓCULO BACTERIANO

As cepas de *E. coli* O157 foram mantidas congeladas em solução de caldo TSB (Trytone Soya Broth – Himedia Laboratories Pvt. Ltd, Mumbai, Índia) + 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 foi constituído pela pipetagem 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 10^7 a 10^8 UFC/mL verificada em comparação com a curva de crescimento realizada através de espectrofotômetro (Milton Roy, Spectronic 21D, USA), previamente definida para o *pool* de *E. coli* O157.

3.2.3 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) e CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA *E. coli* O157

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais foi determinada pela técnica de diluição em caldo (CLSI, 2009). A concentração do óleo essencial mais baixa que não apresentou crescimento microbiano visível (turvação) ou crescimento em placa nas primeiras 24 horas de incubação foi considerada a CIM. A mais baixa concentração do óleo essencial que não apresentou crescimento microbiano visível (turvação) ou crescimento em placa em 72 horas de incubação foi considerada como Concentração Bactericida Mínima (CMB).

Para determinar a CIM e a CMB de cada óleo, primeiramente foi preparada uma solução mãe contendo 20 µL do óleo desejado com 980 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para facilitar sua solubilização. Foi utilizada dose máxima de 2% de DMSO, pois acima disto, este pode se tornar tóxico para a célula bacteriana. A partir desta solução, foram preparados 5 tubos de contendo 80 µL do inóculo, composto pelo *pool* de *E. coli* O157, juntamente com caldo TSB ajustado a pH 6,0 e a quantidade de solução mãe correspondente a cada concentração do óleo.

Em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 37 °C por 24 horas. Após esse período, os tubos cujas concentrações não apresentaram turvação visível foram considerados como a CIM. Alíquotas de 100 µl do conteúdo desses tubos foram posteriormente semeadas em ágar PCA (Ágar Padrão para

Contagem, Neogen Corporation, Michigan, USA). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por mais 24 horas para averiguar o crescimento bacteriano e caso não houvesse crescimento de colônias, a dose utilizada era considerada como CBM. As determinações foram realizadas em duplicata e experimento foi repetido duas vezes gerando um n=4.

Para a determinação de CIM e CBM do óleo de alho foi necessário ajustar a metodologia descrita anteriormente, visto que a simples adição da solução do óleo ao caldo provocava turvação. Dessa maneira, foi necessária a contagem em placa para se conhecer a população inicial do inóculo e a população após a exposição ao antimicrobiano. Os tubos contendo caldo TSB, inóculo e diferentes concentrações do óleo de alho foram incubados a 37 °C por 24 horas. Após esse período foi realizada a diluição seriada e o plaqueamento em ágar PCA. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para a contagem das colônias. A dose de óleo de alho que apresentou redução de 1 log UFC/mL na contagem do inóculo em relação à contagem do controle após 24 horas de incubação foi considerada como CIM e a redução de 3 log UFC/mL ou mais, ou seja, redução de 99,9% da população em relação ao inóculo inicial, foi considerada como CBM (BURT, 2004).

3.2.4 DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE COMBINAÇÕES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA *E. coli* O157

Com o intuito de verificar a existência de efeito aditivo ou sinérgico entre os óleos, o carvacrol, o cinamaldeído e o óleo de alho foram testados em combinação com o isotiocianato de alila, visto que esse último foi o óleo que mostrou as menores CIM e CBM isoladamente contra *E. coli* O157.

A partir dos resultados de CIM obtidos para carvacrol, cinamaldeído e ITA isoladamente, as doses foram reduzidas em 1/2, 1/4 e 1/8 e testadas em combinação.

Em virtude do intenso aroma do óleo de alho e vislumbrando seu uso em linguiça frescal, as doses de CIM foram reduzidas em 1/8, 1/16 e 1/32 e testadas em combinação com doses de 1/2, 1/4 e 1/8 de CIM de ITA.

O procedimento utilizado para o estudo dos óleos em combinação foi o mesmo descrito para a determinação de CIM dos óleos individualmente, em

caldo TBS com incubação a 37 °C por 24 horas, e avaliação pela turvação do meio.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima dos óleos testados frente ao *pool* de *E. coli* O157 estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. CIM e CBM do carvacrol, cinamaldeído, isotiocianato de alila e óleo essencial de alho frente ao *pool* de *E. coli* O157 *in vitro*

Óleo Essencial	CIM	CBM
Carvacrol	200 ppm	400 ppm
Cinamaldeído	100 ppm	400 ppm
Isotiocianato de alila	50 ppm	200 ppm
Óleo de alho (55,2% alicina)	200 ppm	NE

CIM = concentração inibitória mínima, CBM = concentração bactericida mínima, NE = não encontrado

Os óleos essenciais mais ativos frente ao *pool* testado de *E. coli* O157 foram o cinamaldeído e o isotiocianato de alila, com as menores concentrações inibitórias. Para efeito bactericida, o óleo que demonstrou melhor atividade foi o isotiocianato de alila (ITA). Em relação ao óleo de alho, não foi encontrada a CBM. Testes para determinação da CBM desse óleo foram realizados até a concentração de 800 ppm, e nessa dose não houve a redução de ao menos 3 log UFC/ mL do patógeno alvo. Dessa forma, devido à alta dose necessária e da provável inviabilidade da utilização do óleo de alho em matriz alimentar na concentração bactericida, pela repercussão sensorial negativa que sua adição provocaria, optou-se por não testar doses maiores que 800 ppm para encontrar o valor de CBM.

Os resultados do uso combinado dos óleos essenciais contra *E. coli* O157 estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Efeito da combinação de diferentes óleos essenciais frente ao *pool* de cepas de *E. coli* O157 *in vitro*

Efeito Testado	Óleos essências (ppm)				Resultado
	CV	CN	AL	ITA	
Aditivo ½ CIM	100	-	-	25	Aditivo
Sinérgico ¼ CIM	50	-	-	12,5	NS
Sinérgico ⅛ CIM	25	-	-	6,25	NS
Aditivo ½ CIM	-	50	-	25	NA
Sinérgico ¼ CIM	-	25	-	12,5	NS

Sinérgico $\frac{1}{8}$ CIM	-	12,5	-	6,25	NS
Sinérgico $\frac{1}{8}$ CIM AL + $\frac{1}{2}$ CIM ITA	-	-	25	25	Sinergismo
Sinérgico $\frac{1}{16}$ CIM AL + $\frac{1}{4}$ CIM ITA	-	-	12,5	12,5	Sinergismo
Sinérgico $\frac{1}{32}$ CIM AL + $\frac{1}{8}$ CIM ITA	-	-	6,25	6,25	NS

CV = carvacrol, CN = cinamaldeído, ITA = isotiocianato de alila, AL = óleo de alho, NS = não houve efeito sinérgico, NA = não houve efeito aditivo

Estudos para avaliar o efeito sinérgico entre óleos essenciais têm o intuito de verificar a possibilidade de utilização de quantidades menores de cada óleo para efeito antimicrobiano, causando menor impacto sensorial no produto (SILVA, 2009). Com os resultados encontrados as melhores combinações foram as que uniram o isotiocianato de alila com o óleo de alho e o isotiocianato de alila com o carvacrol. A interação que não se mostrou interessante foi a do isotiocianato de alila com o cinamaldeído, demonstrando que em conjunto o efeito isolado de ambos não se somou e nem se repetiu. Isso comprova que diferentes mecanismos de inibição de crescimento bacteriano funcionam melhor na tentativa de redução de doses, como é o caso da alicina e do isotiocianato de alila, que por apresentarem em sua composição compostos sulfurosos agem de forma diferente dos compostos fenólicos carvacrol e cinamaldeído, pensando em futura aplicação em matriz alimentar.

Resultados similares aos obtidos neste estudo para a dose inibitória de cinamaldeído contra *E. coli* foram relatados por Pei et al. (2009) e Oussalah et al. (2007), que encontraram valores de CIM de cinamaldeído entre 200 a 400 ppm. Ainda Pei et al. (2009) encontraram para carvacrol contra *E. coli* valor de CIM de 400 ppm. Marino et al. (2001), observaram que o óleo essencial de orégano na concentração de 800 ppm inibiu totalmente a multiplicação de *E. coli* O157:H7 *in vitro*.

No estudo realizado por Pei et al. (2009), foi encontrado como CBM do cinamaldeído 1600 ppm e carvacrol 800 ppm contra *E. coli*, através da técnica de diluição em caldo. Esses autores testaram também eugenol e timol, além do carvacrol e cinamaldeído, concluindo que esses dois últimos óleos essenciais apresentaram efeitos individuais muito similares e juntos revelaram efeito aditivo, mas não sinérgico.

Martins et al. (2013), trabalhando com os óleos essenciais de orégano, tomilho, cravo e canela, observaram os melhores resultados de CBM frente a

cepa de *E. coli*, na ordem de 500 ppm para os óleos de orégano e tomilho. E CBM na ordem de 2000 ppm para os óleos de cravo e canela.

O cinamaldeído é conhecido por ter ação inibitória sobre *E. coli* e *Salmonella typhimurium* em concentrações parecidas com as do carvacrol, mas não desintegra a membrana externa e nem enfraquece o ATP intracelular (HELANDER et al., 1998). Pei et al. (2009) afirmam que o cinamaldeído mostra forte efeito bacteriano contra *E. coli* isoladamente, porém quando em conjunto com outros compostos, estes efeitos não são tão evidentes. Essa afirmação foi comprovada com o presente estudo.

Resultados divergentes entre autores podem ocorrer devido diferentes métodos de estudo usados (difusão em disco ou diluição em tubos). Além disso, fatores como meio de cultura utilizado, pH deste, tempo de incubação, volume do inóculo, tempo e temperatura de incubação, afetam consideravelmente resultados destes tipos de experimentos. Diferenças encontradas entre os diversos autores podem ser atribuídas ainda a fatores inerentes ao óleo utilizado, como fatores pré-colheita (variedade, condições ambientais, localização) e diferenças nos métodos de extração dos óleos, bem como parte da planta que foi utilizada para a extração do óleo (MARINO et al., 2001; GUTIERREZ et al., 2008).

Luciano e Holley (2009) encontraram como CIM do isotiocianato de alila frente a *E coli* O157:H7 o valor de 50 µL/L (ppm) em pH de 6,5. Já em pH de 5,5 e 4,5, a dose encontrada foi de 25 µL/L (ppm), concluindo que o agente antimicrobiano isotiocianato de alila possui melhor ação em pH mais baixos. No presente estudo, em pH 6,0, a CIM encontrada frente *E coli* O157 foi de 50 ppm, essa mesma dose inibitória foi encontrada pelos autores acima citados em pH 6,5.

Gutierrez et al. (2008), testaram a eficácia de alguns óleos essenciais, dentre eles o óleo essencial de orégano, frente *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*, para verificação de efeitos isolados e em conjunto, bem como interações com proteínas, lipídios e carboidratos, pensando em futura aplicação em matrizes alimentares. Constataram que há melhor ação dos óleos essenciais em alimentos ricos em proteínas e com pH mais ácido. Verificaram também que interações entre

diferentes óleos essenciais permite redução de doses, diminuindo impacto sensorial e controlando melhor bactérias que são mais resistentes aos antimicrobianos naturais como é o caso de *Pseudomonas sp.*

Nesse mesmo estudo, as interações entre óleo de orégano e tomilho, e óleo de orégano e manjeriço, demonstraram efeito combinado melhor do que quando avaliados isoladamente.

Nedorostova et al. (2009) trabalharam com óleos essenciais, dentre eles óleo de alho e óleo de orégano, frente bactérias Gram positivas e Gram negativas. O óleo de alho apresentou como CIM contra bactérias Gram positivas médias de valores entre 80-100 ppm, e entre 250- 550ppm para bactérias Gram negativas. Nesse estudo os autores afirmaram que baseado na composição química dos óleos essenciais, conclui-se que plantas contendo compostos sulfurosos em sua composição são mais potentes, seguindo-se de espécies que contenham timol e carvacrol.

Sasaki et al. (1999) num estudo testando atividade de alho em pó contra *E. coli* O157, concluiu que pó obtido de alho novo é mais efetivo contra essa bactéria, do que quando comparado com pó obtido de plantas com mais de uma ano.

Uma hipótese para o desenvolvimento de sinergismo entre agentes antimicrobianos sobre *E. coli* foi proposta por Pei et al. (2009) em seu estudo com carvacrol. Estes propuseram que como o carvacrol é uma molécula hidrofóbica e propensa a causar distúrbios na membrana externa de bactérias Gram negativas, libera lipopolissacarídeos e aumenta permeabilidade da membrana citoplasmática. Dessa forma o carvacrol desintegra membrana externa da *E. coli*, fazendo com que outro óleo essencial entre no citoplasma da célula e se combine com proteínas e enzimas desativando-as, causando assim o efeito sinérgico.

Essa mesma possibilidade em explicar efeito sinérgico foi citada por Hyldgaard et al. (2012), que dizem que agentes antimicrobianos apresentando diferentes modos de ação, agem sobre diferentes sítios na célula bacteriana, dependendo indiretamente um do outro, para efetivar sua ação antimicrobiana conjunta.

3.4 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo comprovam a eficiência antimicrobiana dos óleos essenciais de alho, carvacrol, cinamaldeído e isotiocianato de alila (ITA) sobre *E. coli* O157 *in vitro*. As menores doses individuais dos óleos essenciais para inibição de *E. coli* O157 foram obtidas para ITA e cinamaldeído. Contudo, no uso conjunto dos óleos essenciais, a combinação de ITA e óleo de alho foi a única que apresentou efeito sinérgico contra o patógeno, em doses reduzidas de 1/4 e 1/16 da CIM individual de ITA e de óleo de alho, respectivamente. Dessa maneira, o emprego da combinação de ITA e óleo de alho mostra-se promissor em linguiças frescas, sendo eficiente em baixas doses na inibição de *E. coli* O 157, minimizando a possibilidade de acarretar prejuízo sensorial ao produto.

CAPÍTULO 4

4 Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de alho e de isotiocianato de alila em linguiça suína frescal inoculada com *E. coli* O157

(Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of garlic essential oil and allyl isothiocyanate in fresh pork sausage inoculated with E. coli O157)

RESUMO

Antimicrobianos naturais são alternativas aos conservantes tradicionais para a preservação de alimentos. Alinhados às novas demandas de mercado, são obtidos a partir de plantas aromáticas e especiarias ricas em óleos essenciais. As linguiças frescas são os derivados cárneos mais produzidos e comercializados no Brasil e devido às suas características físico-químicas, são produtos altamente perecíveis e suscetíveis à contaminação microbiana. Entre os micro-organismos que podem contaminar as linguiças, o grupo das enterobactérias destaca-se, pois pode ser veiculado pela matéria-prima cárnea e abrigar cepas patogênicas como *E. coli* O157, mundialmente associada a surtos alimentares. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante da combinação de isotiocianato de alila (ITA) e óleo de alho em massa de linguiça e em linguiça suína frescal inoculadas com *E. coli* O157. Os testes em massa de linguiça foram realizados com diferentes combinações dos óleos de alho e ITA. As massas foram inoculadas com o *pool* de *E. coli* O157 e divididas em 5 tratamentos, sendo um controle, sem a adição dos óleos essenciais. Os produtos foram mantidos sob refrigeração, a 6 °C, por um período de 20 dias, sendo realizadas, a cada 5 dias, a contagem de *E. coli* O157 e a determinação de cor instrumental. Posteriormente, uma das combinações de ITA e óleo de alho foi testada em linguiça frescal, inoculada com *E. coli* O 157, e comparada a um lote controle, sem adição dos óleos essenciais. As linguiças foram estocadas a 6 °C por 35 dias, sendo analisadas a 7 dias para pH, cor instrumental, TBARS, contagem de *E. coli* O157, contagem de *E. coli* autóctone, de bactérias aeróbias mesófilas e de bactérias

psicotróficas. Os resultados foram analisados estatisticamente e as médias comparadas pelo teste de Tukey e teste t ($P < 0,05$). Ao longo do período de estocagem, verificou-se redução na contagem de *E. coli* O157 em aproximadamente 2 log UFC/g tanto no teste com massa de linguiça quanto na linguiça que recebeu adição dos óleos (125 ppm de AO e 250 ppm de ITA). Também houve diferença significativa ($P < 0,05$) na cor instrumental entre os tratamentos adicionados da combinação de ITA e óleo de alho e o tratamento controle, verificando maior estabilidade da cor vermelha e menor descoloração nos grupos adicionados dos óleos essenciais. O efeito antioxidante dos óleos essenciais na linguiça frescal também foi comprovado pelos menores valores de TBARS em comparação ao controle. Controle iniciou com 0,02mg mda/Kg chegando ao término do experimento com 0,15mg mda/Kg, enquanto que o grupo tratado com os óleos os valores de mda permaneceram na ordem de 0,08mg ao longo do experimento. Para o crescimento de bactérias psicotróficas em linguiça frescal não foi observada diferença significativa entre o grupo adicionado dos óleos essenciais e o controle, contudo, a ação antimicrobiana da combinação de 250 ppm de ITA e 125 ppm de óleo de alho em linguiça frescal foi comprovada sobre o crescimento de bactérias mesófilas ($P < 0,05$). A adição combinada do óleo essencial de alho e de ITA, nas concentrações estudadas, representa uma alternativa como agente conservante e antioxidante em linguiça suína frescal.

Palavras-chave: linguiça frescal, óleo essencial de alho, isotiocianato de alila, *E. coli* O157:H7, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Natural antimicrobials are considered as alternatives to the traditional food preservatives. Aligned to the new demands of the consumer market, these compounds are made from herbs and spices, rich in essential oils. Fresh pork sausages are the most produced and marketed meat products in Brazil. Because of their physical-chemical characteristics, they are highly perishable and susceptible to microbial growth. Among the micro-organisms that can contaminate fresh sausages, the group of enterobacteria stands out as one of

the most important, since it can be transmitted by the raw material and harbor pathogenic strains such as *E. coli* O157. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial and antioxidant activities of combinations of allyl isothiocyanate (ITA) and garlic oil in bulk sausage and fresh pork sausage inoculated with *E. coli* O157. Different AIT and garlic oil combinations were chosen to be tested in bulk sausages inoculated with a pool of *E. coli* O157. Bulk sausages were distributed into 5 treatments, including a control test, without the addition of essential oils. They were kept under refrigeration at 6 °C for a period of 20 days. At 5 day intervals, count of *E. coli* O157 and determining of instrumental color were performed. One of the combinations of ITA and garlic oil used in bulk sausage was chosen to be tested in embedded fresh pork sausage inoculated with *E. coli* O157, and compared to a control batch without addition of essential oils. Sausages were stored at 6 °C for 35 days. At 7 day interval, pH, instrumental color, TBARS, counts of *E. coli* O157, counts *E. coli* autochthonous, mesophilic aerobic bacteria and psychrotrophic bacteria were assessed. The results were statistically analyzed and means were compared by Tukey test and t test ($P < 0.05$). Throughout the storage period, there was a reduction in the count of *E. coli* O157 in approximately 2 log CFU / g in both the bulk and the pork sausage that were added oils (125ppm garlic oil and 250ppm of AIT). There was also a significant difference ($P < 0.05$) in instrumental color among bulk sausages treated with AIT and garlic oil and the control. Treated sausages showed higher red color values (a^*) and lower discoloration values (h). The antioxidant effect of the essential oils in fresh sausages was also evidenced by lower TBARS values compared to the control group. Control group started with 0.02 mg MDA/kg nearing the end of the experiment with 0.15 mg MDA/kg, whereas the group treated with oils MDA values remained in the range of 0.08 mg throughout the experiment. With regard to the psychrotrophic bacteria growth there was no significant difference between the sausages with essential oils and the control group, however, the antimicrobial effect of the combination of 250 ppm of AIT and 125 ppm of garlic oil was proven on the growth of mesophilic bacteria ($P < 0.05$). The combination of garlic essential oil and AIT might be used as a natural preservative and antioxidant agent in fresh pork sausage.

Key words: Garlic oil. Allyl isothiocyanate. Pork fresh sausages. Natural preservative. Antioxidant.

4.1 INTRODUÇÃO

As linguiças frescas são bastante populares no Brasil e sua produção representa 40% do mercado de derivados cárneos brasileiro. O processo de fabricação de linguiça é geralmente simples, não exigindo tecnologia sofisticada. Contudo, devido à sua elevada atividade de água e 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; SILVEIRA, 2012).

Escherichia coli destaca-se entre os principais micro-organismos envolvidos em doenças transmitidas por alimentos no Brasil. Essa espécie pode abrigar cepas patogênicas como o sorotipo *E. coli* O157, o qual tem sido associado a surtos alimentares envolvendo derivados cárneos relatados mundialmente nos últimos anos (DONTOROU et al., 2003; SALLAM et al., 2004; NORMANNO et al., 2004; DOUROU et al., 2009).

Na fabricação da linguiça, os aditivos conservadores como os sais de cura compostos por sais de nitrito (NO_2) e/ou nitrato (NO_3) são empregados para inibir o crescimento microbiano indesejável da bactéria *Clostridium spp.*. Esses sais também têm efeito positivo na cor do produto, pois conferem cor avermelhada bastante atrativa, na prevenção da oxidação lipídica e na promoção de sabor e aroma. Contudo, a ação antimicrobiana do nitrito não é eficaz contra patógenos entéricos gram-negativos, tais como *Salmonella* e *Escherichia coli* (TOMPKINS, 2005; SEBRANEK, BACUS, 2007). Aliado ao fato de que o uso excessivo de sais de cura em produtos cárneos pode ser prejudicial à saúde do consumidor, devido possível interação destes com aminas secundárias (tornando-se compostos com potencial tóxico e até mesmo carcinogênico), verifica-se a crescente demanda por alimentos com menor teor de aditivos sintéticos, mas sem comprometer a segurança no consumo desses alimentos (ARAÚJO & RODRIGUES, 2008; TAJKARIMI, 2010).

Nesse sentido, a adição de compostos naturais com ação antimicrobiana na fabricação de linguiça frescal pode ser uma estratégia para o aumento de sua segurança e saudabilidade (TRAJANO et al., 2009; MATHENJWA et al., 2012).

Entre esses compostos, os óleos essenciais extraídos de plantas têm sido estudados como potenciais conservantes naturais para uso em alimentos (LEMAY et al., 2002; KANATT et al., 2008; MATHENJWA et al., 2012; CORDEIRO et al., 2013). Porém, quando aplicados em alimentos com intuito de inibir o crescimento de micro-organismos específicos, os óleos essenciais têm sua atividade reduzida pela interação com os componentes dos alimentos, como gorduras e proteínas (GUTIERREZ et al., 2008). Dessa forma, há necessidade de aumentar as doses antimicrobianas definidas *in vitro*. Adicionalmente, por sua característica aromática, os óleos essenciais, quando usados como conservantes, podem alterar o sabor e aroma dos produtos cárneos. Dessa forma, o uso de óleos essenciais extraídos de condimentos tradicionalmente utilizados na formulação de linguiça frescal pode minimizar esses efeitos adversos (TAJKARIMI, 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de alho e do isotiocianato de alila em linguiça suína frescal inoculada com *E. coli* O157.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Compostos químicos

O isotiocianato de alila foi obtido da empresa americana Sigma Aldrich Chemical Co, Inc. (St. Louis, USA). O óleo de alho foi adquirido da empresa chinesa Zhengzhou Sigma Chemical Co, LTD. (Henan, China), com concentração de 55,2% de alicina, principal componente de ação antimicrobiana do alho (padrão especificado pelo fabricante).

4.2.2 Cultura bacteriana

As cepas de *E. coli* O157 utilizadas no experimento (*E. coli* O157:H7 02-0627, 02-0628, 00-0381, 02-0304, *E. coli* O157:NM 02-1840 não produtoras de

Shiga Toxina) foram cedidas pelo Professor Richard A. Holley, do Departamento de Ciência de Alimentos, da Universidade de Manitoba, Winnipeg, Canadá.

As cepas de *E. coli* O157 foram mantidas congeladas em solução de caldo TSB (Tryptone Soya Broth – Himedia Laboratories Pvt. Ltd, Mumbai, Índia) + 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 foi constituído pela pipetagem 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 Mac Farland e com a curva de crescimento realizada em espectrofotômetro (Milton Roy, spectronic 21D, USA), previamente definida para o *pool* de *E. coli* O157.

4.2.3 Elaboração de lingüiça suína frescal adicionada de óleos essenciais

4.2.3.1 Teste preliminar em massa de lingüiça

As concentrações dos óleos usadas no teste com massa de lingüiça foram definidas após realização de prévio experimento onde se buscou identificar as CIM e CBM *in vitro* de ambos os óleos frente ao *pool* de *E. coli* O157.

Em experimento preliminar *in vitro* foram encontradas como CIM e CBM de óleo essencial de alho frente ao *pool* de *E. coli* O157, 200 e 400 ppm, respectivamente, e de ITA, 50 e 200 ppm, respectivamente. Na tentativa de se buscar um efeito antibacteriano sinérgico entre os antimicrobianos, essas doses foram reduzidas, sendo constatado efeito contra *E. coli* O 157 nas doses de 25 ppm e 12,5 ppm de ITA e de 25 ppm e 12,5 ppm de óleo de alho.

Tendo em vista que para manutenção dos resultados encontrados *in vitro* a concentração de óleos essenciais deve ser aumentada quando usada em matrizes alimentares (GUTIERREZ et al., 2008; BURT, 2004), para tanto, as

concentrações dos óleos essenciais foram aumentadas 10 vezes para teste da atividade antimicrobiana em massa de lingüiça frescal inoculada com o *pool* de *E. coli* O157 (Tabela 1).

Cinco lotes de lingüiça suína frescal foram elaborados no Laboratório de Tecnologia de Produtos Agropecuários da PUCPR, em São José dos Pinhais, Paraná, de acordo com formulação industrial apresentada na Tabela 2.

Tabela 1. Doses dos óleos essenciais testadas em massa de lingüiça suína frescal

Componentes	Tratamentos				
	Controle	1	2	3	4
Óleo de alho (ppm)	-	125	250	125	250
ITA (ppm)	-	125	125	250	250

ITA = isotiocianato de alila

Tabela 2. Formulação de lingüiça suína frescal

Ingredientes/ Aditivos	Quantidade	
	g	%
Carne suína magra (pernil)	1386	92,4
Água	37,5	2,5
Sal (NaCl)*	37,5	2,5
Estabilizante (polifosfato de sódio)*	15	1
Antioxidante (eritorbato de sódio)*	12	0,8
Condimento comercial para lingüiça*	7,5	0,5
Realçador de sabor (glutamato monossódico)*	3,75	0,25
Sal de cura (sal e nitrito de sódio)*	0,75	0,05
Total	1500	100

* Marca BRC Ingredientes, Rio Claro, SP, Brasil

Foi produzido 1,5 kg de massa lingüiça para cada tratamento. A carne suína do corte pernil foi moída em moedor elétrico (Modelo PC-10, Eccel Metalúrgica, Brusque, SC, Brasil) utilizando-se disco de 8 mm de diâmetro e posteriormente acondicionada em bandejas plásticas previamente higienizadas e sanitizadas com álcool 70%. Os ingredientes secos foram adicionados e misturados manualmente à massa por 2 minutos até completa homogeneização.

Posteriormente, foi adicionado à massa 15 ml de inóculo previamente preparado, mediante mistura manual por 2 minutos. Ao final, foram adicionados os óleos essenciais de alho e isotiocianato de alila nas concentrações descritas acima. Após nova mistura manual por 2 minutos, as massas foram divididas em porções de aproximadamente 100 g e acondicionadas em sacos plásticos

estéreis (LB – Laborclin, modelo 570671, Vargem Grande, Pinhais, Paraná, Brasil) devidamente identificados. As embalagens com as massas preparadas foram estocadas a 6 °C em câmara B.O.D. (Fanem, 347 CD, São Paulo, SP, Brasil) durante 20 dias. Porções foram retiradas para determinações de cor instrumental e contagem de *E. coli* O157 a cada 5 dias conforme metodologias descritas nos itens 4.2.4 e 4.2.5.

Com o intuito de verificar a ocorrência de alteração no sabor e aroma da massa de linguiça com a adição dos óleos essenciais, as combinações de óleos essenciais descritas acima foram adicionadas em 100 g de massa de linguiça sem a inoculação com *E. coli* O157 para a realização de avaliação de percepção sensorial de odor e sabor estranho à linguiça suína frescal. 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 cubos de aproximadamente 1 cm³ e apresentadas aos julgadores para avaliação de odor e sabor estranho à linguiça suína frescal.

A avaliação da percepção sensorial foi realizada por 5 pessoas da equipe de pesquisa do projeto, habituadas ao consumo de linguiça suína frescal e ao sabor e aroma característico desse alimento. As percepções individuais dos avaliadores quanto a odor e sabor estranho à linguiça suína frescal nas massas adicionadas de óleo essencial foram consideradas em conjunto, sendo o resultado de cada tratamento descrito em tabela como a percepção sensorial geral dos avaliadores.

A partir dos resultados obtidos no teste de percepção sensorial, uma das combinações de óleos essenciais testada em massa de linguiça foi escolhida para a realização de um novo experimento para avaliar o efeito antimicrobiano e antioxidante de sua adição em linguiça suína frescal ao longo de 35 dias de estocagem refrigerada.

4.2.3.2 Teste em linguiça embutida

Dois lotes de linguiça frescal foram elaborados no Laboratório de Tecnologia de Produtos Agropecuários da PUCPR, em São José dos Pinhais, Paraná, seguindo formulação semelhante à descrita no item anterior. Foi

produzido 1,5 kg de lingüiça para cada tratamento. A carne suína magra, proveniente do corte pernil, foi moída em moedor elétrico (Modelo PC-10, Eccel Metalúrgica, Brusque, SC, Brasil) utilizando disco de 8 mm de diâmetro, e posteriormente acondicionada em bandejas plásticas previamente higienizadas e sanitizadas com álcool 70%.

A carne suína e os ingredientes da marca comercial BRC Ingredientes, utilizados nas formulações foram fornecidos pelo Frigorífico Bizinelli, localizado na cidade de Curitiba, Paraná.

A carne moída e os ingredientes foram misturados manualmente por 2 minutos e ambos os lotes foram inoculados com 15 mL (1%) de inóculo composto pelo *pool* de *E. coli* O157, preparado conforme descrito anteriormente no item 4.2.2. Após mistura manual do inóculo à massa, o lote controle foi embutido, com auxílio de embutideira manual (Jamar modelo EFI, Tupã, SP, Brasil), em envoltório natural ovino (Tripovino, Araraquara, SP, Brasil), previamente sanitizado em solução de ácido láctico 10% por 30 minutos. O lote tratado recebeu a adição dos óleos essenciais na concentração de 125 ppm de óleo de alho e 250 ppm de isotiocianato de alila, os quais foram misturados manualmente à massa, previamente inoculada com *E. coli* O 157 e embutido conforme procedimento descrito para o lote controle.

Após embutimento, lingüiças, com cerca de 10 cm de comprimento em cada gomo foram distribuídas em embalagens plásticas estéreis (Laborclin, 570671, Pinhais, PR, Brasil) e armazenadas em câmara B.O.D. (Fanem, 347 CD, São Paulo, SP, Brasil) a 6 °C por um período de 35 dias. Em intervalos de 7 dias, 4 gomos de lingüiça de cada tratamento eram retirados e submetidos às determinações microbiológicas (contagem de população de *E. coli* O157, contagem de *E. coli* autóctone, contagem de população de aeróbios mesófilos e contagem de população de aeróbios psicrotróficos) e físico-químicas (pH, cor instrumental e oxidação lipídica).

4.2.4 Análise microbiológica

As amostras foram submetidas às contagens de *E. coli* O157, aeróbios mesófilos e aeróbios psicrotróficos de acordo com as metodologias preconizadas pela *American Public Health Association* (APHA, 2001). Foram

pesadas assepticamente amostras de 25 g do produto, transferidas para sacos plásticos estéreis e homogeneizadas por trinta segundos em homogenizador asséptico *Stomacher* (IUL Instruments, Barcelona, Espanha) com 225 mL de água peptonada 0,1% (HIMEDIA, Mumbai, Índia). A partir desta diluição, foram preparadas diluições decimais subsequentes, utilizando-se o mesmo diluente.

A contagem de *E. coli* O157 foi realizada em ágar Sorbitol McConkey (HIMEDIA, Mumbai, Índia), após semeadura em superfície, com incubação em estufa a 37 °C por 24 h. As colônias com coloração rosa clara semelhante à do meio de cultura foram identificadas como presuntivas para *E. coli* O157 e as colônias com coloração roxa foram identificadas como *E. coli* autóctone.

A contagem de micro-organismos aeróbicos mesófilos foi realizada utilizando-se *Plate Count Agar* (PCA - HIMEDIA, Mumbai, Índia), com semeadura em superfície, após incubação a 37 °C por 48 h.

A contagem de micro-organismos aeróbios psicrotróficos foi realizada com o mesmo ágar PCA, com semeadura em superfície, após incubação em câmara B.O.D. (Fanem, 347 CD, São Paulo, Brasil) a 6 °C por 10 dias.

Os resultados das contagens foram expressos em log UFC/g. Todas as determinações foram realizadas em quadruplicata (n=4).

4.2.5 Análise físico-química

4.2.5.1 Determinação de pH

Foi utilizado um pHmetro (HI253 Hanna Instruments, Dallas, Texas, USA), onde o eletrodo do mesmo era inserido em 4 pontos aleatórios do gomo de linguiça, realizando médias destes para cada amostra, de acordo com metodologia descrita no Manual de Análises do Instituto Adolf Lutz (IAL, 2008).

4.2.5.2 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 CIE L*, a*, b*. A medição foi realizada pela média de 4 disparos diretamente sobre a superfície das amostras utilizando fonte de luz D₆₅, 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.

4.2.5.3 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para determinação do número de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico utilizou-se metodologia descrita por Federici et al. (2007), com modificações. Utilizou-se solução de ácido tricloroacético 10% (TCA, Synth, Diadema, Brasil) e solução de ácido tiobarbitúrico 0,02 M (Tba, J. T. Baker, Inglaterra, UK). Este método tem por princípio a formação de um composto de coloração rósea resultante da reação do malonaldeído com o ácido 2-tiobarbitúrico. Realizou-se leitura espectrofotométrica (Espectrofotômetro Milton Roy, spectronic 21D, Ivyland, PA, EUA) a 535 nm e, então, converteu-se o valor encontrado para mg de malonaldeído/kg de amostra.

4.2.6 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa Statgraphics Centurion XVI versão 16.1.11. Os resultados obtidos no experimento 1, teste em massa de lingüiça frescal, foram analisados por ANOVA e as médias comparadas por teste de Tukey e os resultados do experimento 2, teste em lingüiça embutida, foram submetidos ao teste t. Em ambos os experimentos foi adotado o nível de significância de 5%.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Teste preliminar em massa de lingüiça

4.3.1.1 Análise microbiológica

As contagens microbianas ao longo do período de armazenamento da massa de lingüiça frescal sob refrigeração em câmara de incubação B.O.D. a 6 °C estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Contagem de *E. coli* O157 (log UFC/g) em massa de lingüiça suína frescal adicionada de diferentes combinações de óleo essencial de alho e isotiocianato de alila (média±desvio padrão)

Tempo (dias)	Tratamentos				
	Controle	T1	T2	T3	T4
0	6,57±0,15 ^a	6,57±0,15 ^a	6,57±0,15 ^a	6,57±0,15 ^a	6,57±0,15 ^a
5	5,91±0,08 ^c	6,24±0,14 ^b	6,69±0,09 ^a	5,89±0,07 ^{bc}	5,68±0,15 ^d
10	6,36±0,05 ^a	6,25±0,30 ^a	5,73±0,08 ^{bc}	5,74±0,26 ^b	5,22±0,14 ^c
15	5,92±0,02 ^{abc}	6,27±0,30 ^a	6,01±0,21 ^{ab}	5,42±0,27 ^{bc}	5,32±0,36 ^c
20	6,27±0,13 ^a	6,16±0,04 ^{ab}	5,86±0,32 ^{ab}	5,56±0,45 ^b	4,70±0,17 ^c
Redução na contagem de <i>E. coli</i> O157 após 20 dias	0,30	0,41	0,71	1,01	1,87

ITA = isotiocianato de alila; T1 = 125 ppm alho +125 ppm ITA, T2 = 250 ppm alho + 125 ppm ITA, T3 = 125 ppm alho + 250 ppm ITA, T4 = 250 ppm alho + 250 ppm ITA
 Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos (p<0,05).

A adição de combinação dos óleos essenciais em massa de lingüiça foi efetiva na inibição do crescimento de *E. coli* O157, principalmente nos tratamentos que receberam as maiores doses combinadas dos antimicrobianos. As contagens de *E. coli* O157 nos tratamentos 3 e 4, que receberam a adição de 125 ppm alho + 250 ppm ITA e 250 ppm alho + 250 ppm ITA, respectivamente, foram inferiores (p<0,05) às do tratamento controle em todos os períodos de tempo avaliados, sendo observadas reduções de 1,01 e 1,87 log UFC/g da contagem inicial de *E. coli* O157 nos tratamentos 3 e 4, respectivamente, após 20 dias de estocagem.

4.3.1.2 Determinação de cor instrumental

Os valores encontrados para a cor instrumental na massa de lingüiça seguem nas Tabelas 4 a 8.

Tabela 4. Valores médios de coordenada de cor L* encontrados em massas de lingüiça suína frescal adicionada de diferentes combinações de óleo essencial de alho e isotiocianato de alila

Tempo (dias)	Tratamentos				
	Controle	T1	T2	T3	T4
0	52,18±0,57 ^a	52,18±0,57 ^a	52,18±0,57 ^a	52,18±0,57 ^a	52,18±0,57 ^a
5	51,31±0,22 ^a	49,59±2,04 ^{ab}	47,23±0,81 ^b	48,69±0,28 ^{ab}	49,08±0,15 ^{ab}
10	52,37±1,39 ^a	48,10±0,88 ^b	47,91±1,03 ^b	49,45±1,82 ^{ab}	50,50±0,95 ^{ab}
15	45,78±0,79 ^c	49,91±0,3 ^{bc}	55,96±2,3 ^a	50,29±1,13 ^{bc}	54,01±3,43 ^{ab}
20	46,78±0,56 ^b	46,34±0,54 ^b	54,13±0,90 ^a	46,78±0,56 ^b	46,15±0,68 ^b

ITA = isotiocianato de alila; T1 = 125 ppm alho +125 ppm ITA, T2 = 250 ppm alho + 125 ppm ITA, T3 = 125 ppm alho + 250 ppm ITA, T4 = 250 ppm alho + 250 ppm ITA
 Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos (p<0,05).

Tabela 5. Valores médios de coordenada de cor a* encontrados em massas de lingüiça suína frescal adicionada de diferentes combinações de óleo essencial de alho e isotiocianato de alila

Tempo (dias)	Tratamentos				
	Controle	T1	T2	T3	T4
0	14,42±0,57 ^a	14,42±0,57 ^a	14,42±0,57 ^a	14,42±0,57 ^a	14,42±0,57 ^a
5	18,08±0,12 ^d	20,47±0,57 ^{bc}	22,03±0,11 ^a	21,24±0,34 ^{ab}	20,37±0,06 ^c
10	12,89±1,30 ^b	19,84±0,54 ^a	21,20±0,30 ^a	20,83±2,03 ^a	20,41±1,36 ^a
15	13,52±0,83 ^c	19,96±1,21 ^b	21,38±0,80 ^{ab}	23,94±0,36 ^a	22,12±1,59 ^{ab}
20	16,39±0,37 ^b	15,96±0,19 ^b	15,33±0,67 ^b	19,52±0,28 ^a	18,74±0,71 ^a

ITA = isotiocianato de alila; T1 = 125 ppm alho +125 ppm ITA, T2 = 250 ppm alho + 125 ppm ITA, T3 = 125 ppm alho + 250 ppm ITA, T4 = 250 ppm alho + 250 ppm ITA
 Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos (p<0,05).

Tabela 6. Valores médios de coordenada de cor b* encontrados em massas de lingüiça suína frescal adicionada de diferentes combinações de óleo essencial de alho e isotiocianato de alila

Tempo (dias)	Tratamentos				
	Controle	T1	T2	T3	T4
0	10,96±0,09 ^a				
5	11,42±0,11 ^a	11,45±0,86 ^a	11,49±0,26 ^a	9,79±0,18 ^b	11,04±0,07 ^a
10	11,64±0,35 ^a	10,75±0,30 ^a	10,84±0,23 ^a	11,07±0,69 ^a	11,35±0,05 ^a
15	12,33±0,83 ^a	11,48±0,88 ^a	13,17±0,86 ^a	13,00±0,46 ^a	12,46±0,21 ^a
20	10,60±0,30 ^b	10,35±0,14 ^a	11,82±0,40 ^a	10,89±0,27 ^b	10,84±0,18 ^a

ITA = isotiocianato de alila; T1 = 125 ppm alho +125 ppm ITA, T2 = 250 ppm alho + 125 ppm ITA, T3 = 125 ppm alho + 250 ppm ITA, T4 = 250 ppm alho + 250 ppm ITA
 Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos (p<0,05).

Tabela 7. Valores médios de coordenada de cor h encontrados em massas de lingüiça suína frescal adicionada de diferentes combinações de óleo essencial de alho e isotiocianato de alila

Tempo (dias)	Tratamentos				
	Controle	T1	T2	T3	T4
0	36,91±1,10 ^a	36,91±1,10 ^a	36,91±1,10 ^a	36,91±1,10 ^a	36,91±1,10 ^a
5	32,27±0,39 ^a	26,33±2,66 ^{bc}	27,55±0,60 ^{bc}	24,73±0,05 ^c	28,45±0,09 ^b
10	42,18±2,85 ^a	28,45±0,04 ^b	27,08±0,17 ^b	28,11±3,98 ^b	29,14±1,72 ^b
15	42,42±0,37 ^a	29,90±0,38 ^c	31,61±0,75 ^b	28,49±0,48 ^d	29,43±0,34 ^{cd}
20	32,90±0,16 ^b	32,96±0,10 ^b	37,67±2,11 ^a	29,16±0,25 ^c	30,05±0,68 ^c

ITA = isotiocianato de alila; T1 = 125 ppm alho +125 ppm ITA, T2 = 250 ppm alho + 125 ppm ITA, T3 = 125 ppm alho + 250 ppm ITA, T4 = 250 ppm alho + 250 ppm ITA
 Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Tabela 8. Valores médios de coordenada de cor C* encontrados em massas de lingüiça suína frescal adicionada de diferentes combinações de óleo essencial de alho e isotiocianato de alila

Tempo (dias)	Tratamentos				
	Controle	T1	T2	T3	T4
0	18,12±0,50 ^a	18,12±0,50 ^a	18,12±0,50 ^a	18,12±0,50 ^a	18,12±0,50 ^a
5	21,39±0,07 ^b	23,46±0,10 ^b	24,85±0,11 ^a	23,39±0,39 ^b	23,17±0,09 ^b
10	17,38±1,05 ^b	22,56±0,62 ^a	23,81±0,37 ^a	23,62±1,43 ^a	23,37±1,16 ^a
15	18,31±1,18 ^c	23,03±1,49 ^b	25,12±1,13 ^{ab}	27,25±0,53 ^a	25,40±1,49 ^{ab}
20	19,53±0,47 ^b	19,02±0,23 ^b	19,37±0,31 ^b	22,35±0,38 ^a	21,65±0,69 ^a

ITA = isotiocianato de alila; T1 = 125 ppm alho +125 ppm ITA, T2 = 250 ppm alho + 125 ppm ITA, T3 = 125 ppm alho + 250 ppm ITA, T4 = 250 ppm alho + 250 ppm ITA
 Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Com relação à coordenada L* (Tabela 4), verificou-se diferença entre os tratamentos nos períodos de tempo avaliados, contudo essas diferenças não afetaram a percepção visual de brilho das massas de lingüiças. A luminosidade das massas foi mais afetada pelo tempo de estocagem, visualizada em todos os tratamentos, e confirmada com a redução dos valores ao longo do tempo. Os valores iniciaram em 52,18 ($\pm 0,57$) e finalizaram próximos a 46 no vigésimo dia do experimento, demonstrando redução no brilho superficial das amostras ao longo do período de estocagem, exceto para T2.

Para a coordenada b* (Tabela 6), que indica a cor amarela, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos para a maioria dos

períodos de tempo avaliados, sendo as diferenças observadas em alguns períodos atribuídas a variações de cor inerentes às matérias-primas.

Com relação à coordenada a^* (Tabela 5), também houve diferença significativa entre as amostras ao longo dos dias do experimento, sendo que todos os tratamentos apresentaram aumento dos valores, porém com maiores valores nos tempos estudados para os tratamentos 3 e 4, que receberam as maiores concentrações dos óleos essenciais ($p < 0,05$). Para as coordenadas C^* (Tabela 8) e hue (Tabela 7), que indicam a intensidade de cor (saturação) e a descoloração das massas de linguiça, respectivamente, verificou-se diferença significativa entre os tratamentos ao longo do período de estocagem ($p < 0,05$), com menores valores de C^* e maiores valores de h para o tratamento controle. Evidenciando a capacidade dos óleos essenciais em manter a cor avermelhada característica da massa de linguiça ao longo da estocagem.

O resultado da avaliação de percepção sensorial das massas de linguiças com a adição das diferentes combinações de óleos essenciais está apresentado na Tabela 9.

Tabela 9. Resultado da avaliação de percepção sensorial de massa de linguiça adicionada de óleos essenciais

Concentrações de óleos essenciais (alho + ITA)	Percepção de aroma e sabor
T1	Aceitável, sobressaindo percepção de alho ao final
T2	Aceitável, sobressaindo percepção de alho no início da mastigação
T3	Aceitável, menor percepção do alho, ITA mascara percepção de alho
T4	Aceitável, sobressaindo gosto pungente de ITA e gosto de alho

ITA = isotiocianato de alila, T1=125 ppm +125 ppm, T2 = 250 ppm +125 ppm, T3 = 125 ppm +250 ppm, T4 = 250 ppm +250 ppm.

Verificou-se que a combinação de 125 ppm de óleo de alho e 250 ppm de ITA foi a que provocou menor alteração sobre o odor e o sabor da massa de linguiça. Dessa forma, optou-se por realizar um segundo experimento para verificar o efeito da adição dessa combinação de óleos sobre a estabilidade da linguiça frescal embutida e inoculada com *E. coli* O 157 em comparação a um tratamento controle, sem a adição dos óleos essenciais.

4.3.2 Teste em linguiça suína frescal

4.3.2.1 Análise microbiológica

As contagens microbianas ao longo do período de armazenamento da linguiça frescal sob refrigeração em câmara de incubação B.O.D. a 6 °C estão apresentadas nas Figuras 1 a 3.

A contagem inicial da população de *E. coli* O157 (Figura 1) nas amostras foi de aproximadamente 6,5 log UFC/g. Com exceção dos dias 0 e 7, a contagem deste grupo de bactérias foi significativamente ($p < 0,05$) inferior nas amostras contendo os óleos essenciais, comparativamente ao controle. O grupo tratado com os óleos essenciais de alho e ITA conseguiu uma redução na ordem de 4,5 log UFC/g, após 35 dias de armazenamento.

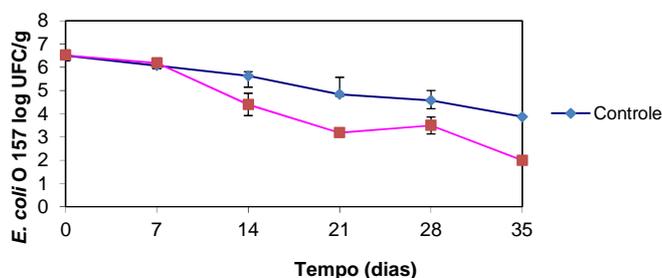


Figura 1. Contagem da bactéria *E. coli* O157 nas linguiças frescas controle e tratamento, durante o período de armazenagem.

Com relação as contagens de *E. coli* autóctone, estas iniciaram o experimento com contagens na ordem de 4 log UFC/g de amostra nas análises realizadas no tempo zero. Nas análises subsequentes, houve redução dessa população para 2 log UFC/g ou menos em ambos os tratamentos. Isso porque a partir do sétimo dia do experimento não foram mais observadas colônias características deste micro-organismo nas placas.

No presente trabalho, com relação a contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos (Figura 2), a contaminação inicial das amostras também foi de cerca de 6,5 log UFC/g. Assim como na contagem de *E. coli* O157, verificou-se menor contagem de mesófilos ($p < 0,05$) nas amostras do tratamento a partir de 14 dias de estocagem sendo que nos dias 14, 21, 28 e

35 houve diferença significativa entre os tratamentos. O grupo tratado com os óleos essenciais foi que apresentou menores contagens comparadas ao controle.

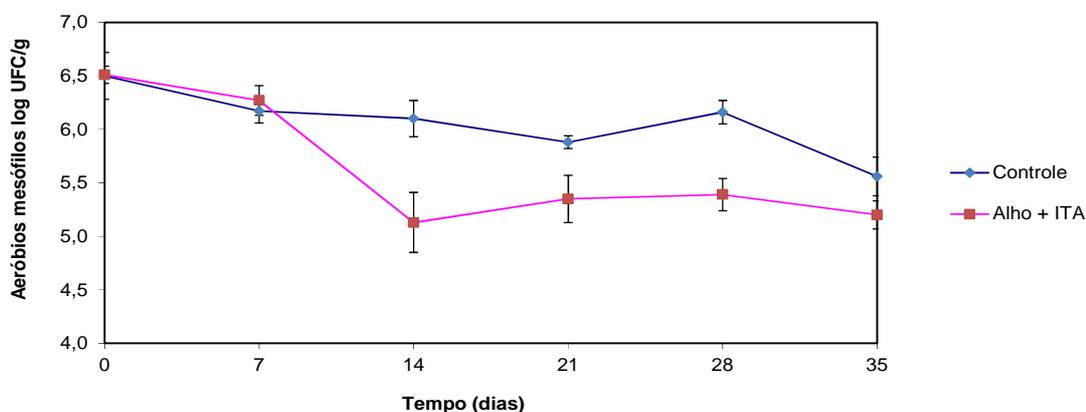


Figura 2. Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos nas linguças frescas controle e tratamento, durante o período de armazenagem.

A contagem inicial de micro-organismos psicotróficos (Figura 3) nas amostras foi de aproximadamente 5 log UFC/g. Neste caso não houve diferença significativa entre os dois grupos ao longo dos dias de estudo, sendo que tanto o grupo controle como o tratado com os óleos apresentou crescimento até 7,5 log UFC/g a partir do 14º dia. Esses resultados evidenciam que ao término desse período o produto já não estaria mais em condições adequadas para consumo, isso considerando que valores acima de 7 log UFC/g seriam limites para avaliação de vida útil de um produto (GEORGANTELIS et al., 2007).

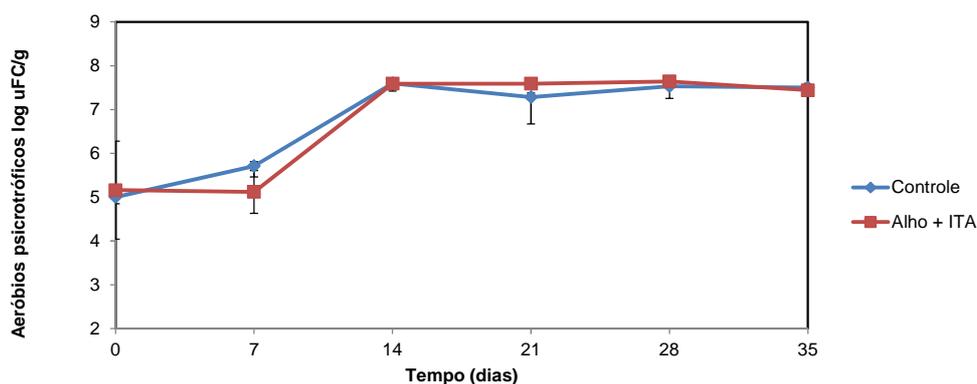


Figura 3. Contagem de micro-organismos psicrotróficos nas linguiças frescas controle e tratamento, durante o período de armazenagem.

4.3.2.2 Análise físico-química

A evolução nos valores de pH nas amostras durante os 35 dias de armazenamento a 7 °C estão representadas na Figura 4. A média dos valores de pH das linguiças foi de 4,97 e 5,08 nas amostras controle e tratadas com os óleos, respectivamente. No decorrer do período de armazenamento, as médias dos valores de pH foram decaindo, chegando em 4,36 ao final dos 35 dias, para ambas as amostras. Houve diferença significativa entre as amostras apenas nos dias 0, 7 e 14, evidenciando menor queda de pH no grupo tratado.

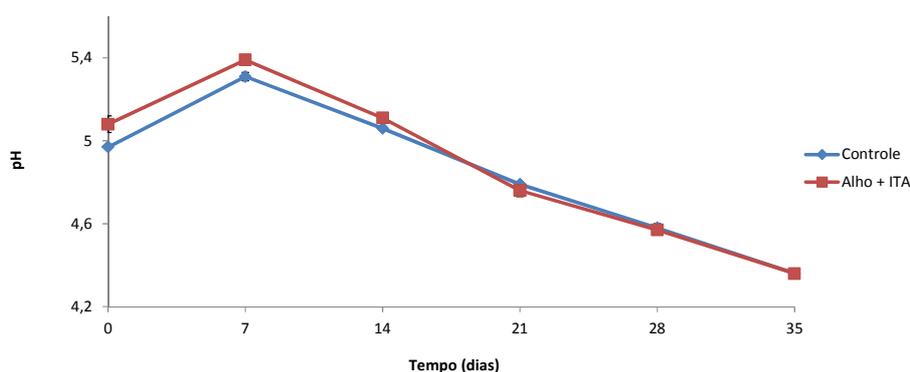


Figura 4. Médias dos valores de pH nas linguiças frescas controle e tratamento, durante o período de armazenagem.

Com relação à análise de cor, houve diferença significativa entre os grupos estudados ao longo dos dias de armazenamento refrigerado em quase todas as análises. Com os resultados apresentados nas Figuras 5 e 6, ficou

evidente a diferença entre os tratamentos, sendo que o tratamento que recebeu a adição dos óleos essenciais manteve mais a cor do produto, ou seja, descoloriu menos, evidenciando dessa forma a potencial ação antioxidante dos óleos.

O valor médio de L^* (Figura 5) tendeu a aumentar em ambos os tratamentos com o tempo de armazenamento. No tempo 0 era de 49,84 para controle e 50,42 para tratamento com adição dos óleos essenciais. Ao final dos 35 dias de armazenamento, os valores subiram para 51,40 para controle e 52,71 para tratado com óleos essenciais.

Os valores médios de b^* (Figura 5) apresentaram declínio ao longo do estudo, variando de 13,61 para 12,46 no controle e 12,80 para 11,87 no tratado. Houve diferença significativa entre os tratamento apenas no início e no fim do experimento, tempos 0 e 35. O atributo b^* indica coloração amarelada do produto, sendo preferível que seus valores se mantenham iguais ou reduzam ao longo da estocagem em produtos cárneos.

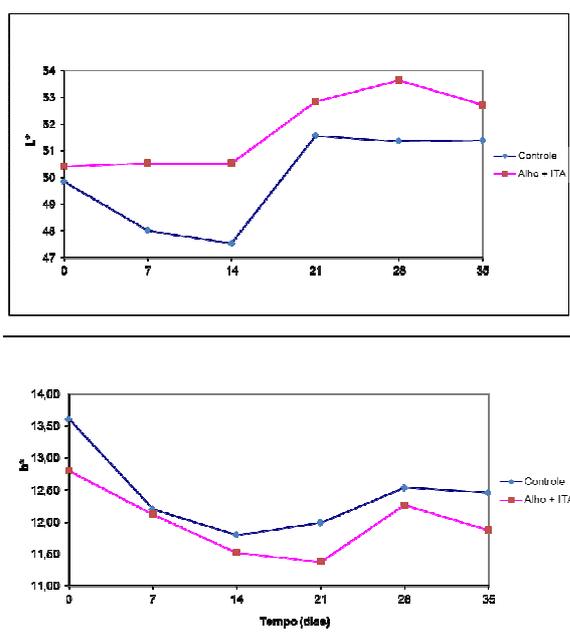


Figura 5. Evolução das coordenadas de cor L^* e b^* nas linguças frescas ao longo de 35 dias de estocagem sob refrigeração.

Os valores médios de a^* (Figura 6) apresentaram declínio ao longo do período de estudo, saindo de 23,41 para 17,49 no controle e de 24,06 para 20,48 para tratamento. Houve diferença significativa entre os tratamentos nos

tempos 14, 28 e 35. A coordenada a^* indica coloração vermelha do produto, que tende a reduzir com o passar do tempo de armazenamento, pois a cor vermelha torna-se menos estável nos produtos cárneos. O grupo tratado apresentou maior estabilidade de cor vermelha, pois mostrou menor queda nos valores de a^* ao longo da estocagem.

Os valores de C^* (Figura 6) mostraram decréscimo ao longo do estudo, partindo-se de 27,08 a 21,48 no controle, e de 27,26 a 23,56 no tratamento, havendo diferença significativa entre os grupos nos tempos finais de estocagem, com maiores valores para o grupo tratado ($p < 0,05$).

Os valores de h (Figura 6) revelaram aumento dos índices, partindo de 30,17 e finalizando em 35,47 para controle, e de 28,01 a 30,25 para tratado. Houve diferença significativa entre os grupos em todos os tempos, com exceção do tempo 7. Essa coordenada indica descoloração do produto, indicando que quanto maior for seu valor, maior será a perda da coloração avermelhada do produto. Nesse sentido, a adição dos óleos essenciais de alho e ITA mostraram efeito positivo na estabilidade da cor vermelha da linguiça frescal, atributo de decisão do consumidor no momento da escolha e compra do produto.

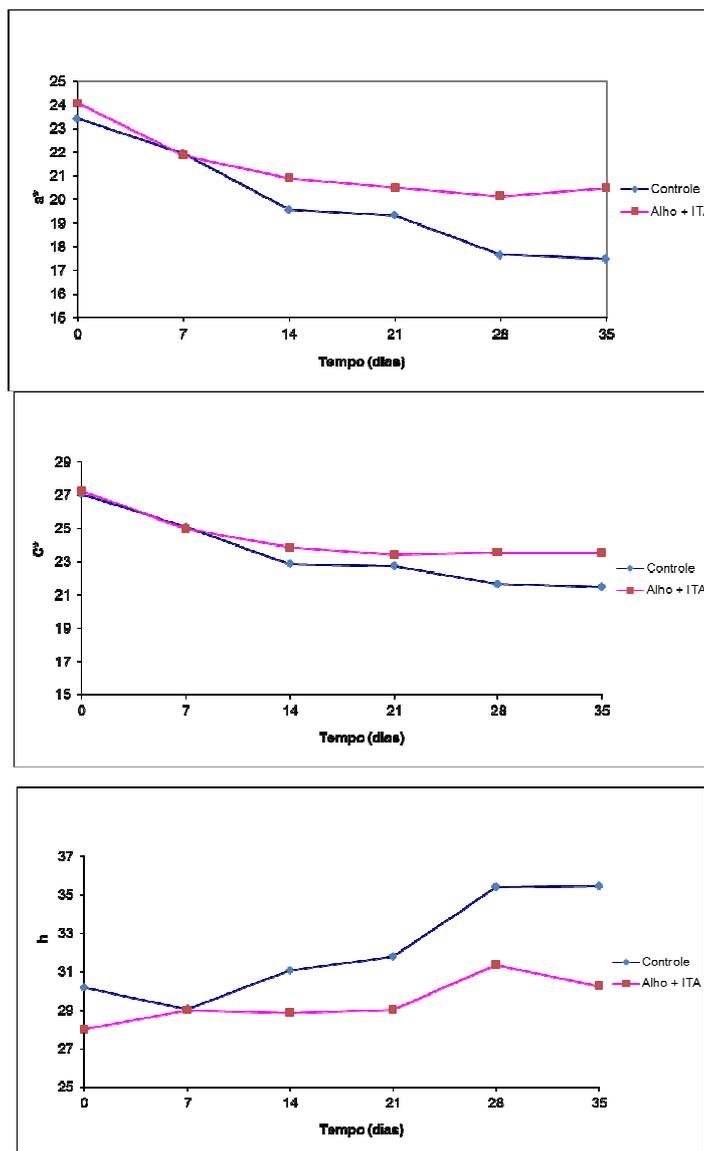


Figura 6. Evolução das coordenadas de cor a^* , C^* e h nas linguças frescas ao longo de 35 dias de estocagem sob refrigeração.

Quanto aos indicadores de oxidação lipídica, nas amostras do grupo controle verificou-se maior amplitude nos valores de malonaldeído ao longo do período de estocagem (variação de 0,02 a 0,15 mg MDA/kg). Por sua vez, as amostras adicionadas de óleos essenciais apresentaram valores de malonaldeído próximos a 0,08 mg MDA/kg ao longo de todo o período de estocagem (Figura 7). Houve diferença significativa nos tempos 0 e 35 dias, sendo que o grupo tratado com os óleos iniciou experimento com valores superiores aos do controle, revelando que o ITA pode ser pró-oxidante, reagindo com agentes redutores naturais da carne, como a glutathione,

aumentando os valores de MDA/Kg, para depois o poder antioxidante do alho ser notado com a manutenção dos mesmos valores.

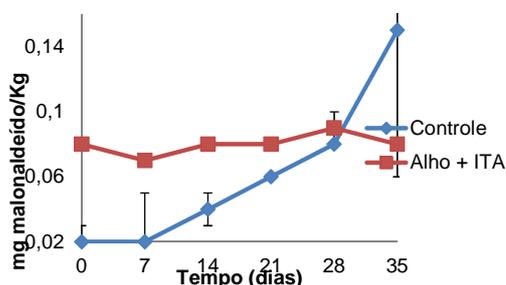


Figura 7. Médias dos valores de TBARS (mg MDA/kg) nas linguças frescas controle e tratamento, durante o período de armazenagem.

4.4 DISCUSSÃO

Sallam et al. (2004) trabalhando com linguça frescal de frango adicionada de alho fresco, alho em pó e óleo de alho, compararam efeito deste agente antimicrobiano sobre comportamento de bactérias mesófilas aeróbicas ao longo de 21 dias de estocagem sobre refrigeração. Nesse estudo ao longo dos 21 dias de pesquisa, as contagens das bactérias mesófilas aumentaram, partindo de população inicial de 4 log UFC/g, chegando ao final de experimento com contagens entre 5,5 a 7,5 log UFC/g. Em ordem decrescente da maior para a menor atividade antimicrobiana estão alho fresco, alho em pó e óleo de alho. Os autores sugerem que o óleo de alho, ao passar pelo processo de destilação durante sua fabricação, acaba perdendo parte de seus compostos sulfurosos por volatilização, tendo assim sua atividade antimicrobiana reduzida quando comparado principalmente ao alho fresco.

Kamdem et al. (2007), verificaram aumento de 1,5 log UFC/g na contagem de aeróbios mesófilos em linguça suína frescal adicionada de 2,5% de uma mistura contendo extrato de alho, canela, cravo e pimenta adicionados em conjunto e estocada por 15 dias, comparando com a mesma linguça sem adição de extratos naturais, mas com aditivos sintéticos. Nesse estudo puderam observar que no grupo sem adição dos extratos naturais, esses

micro-organismos apresentaram aumento em mais de 2,5 log UFC/g, confirmando assim o poder antimicrobiano dos agentes naturais, como o alho que foi um dos agentes testados na mistura por eles realizada.

No presente experimento houve redução nas contagens totais de micro-organismos mesófilos aeróbicos, divergindo dos trabalhos acima citados que tiveram aumento ao longo dos experimentos da população do referido grupo bacteriano. Essa diferença pode ser atribuída a potente ação antimicrobiana atestada ao óleo de alho e ao ITA. Devido em suas composições apresentarem compostos sulfurosos, estes causam danos em nível de membrana celular bacteriana e ocorrendo perda de compostos intracelulares.

Lemay et al. (2002), testando o efeito do óleo essencial de mostarda (1 e 1,5%) e outros compostos comerciais (lactato de sódio, nisina) em linguiça frescal de frango mantida sob refrigeração, constatou um decréscimo inferior ao da presente pesquisa em relação à contagem de *E. coli*. Em seu estudo, de uma população inicial na ordem de 5 log UFC/g, ao final de 14 dias de experimento, houve redução para 2 log UFC/g.

Rounds et al. (2012), testaram a eficácia de alguns extratos de plantas na forma de pó adicionados em hambúrgueres inoculados com *E. coli* O157:H7 e submetidos a tratamento térmico. Nesse estudo eles comprovaram que hambúrgueres adicionados de 0,5% de extrato de mostarda em pó obtiveram aumento de 0,6 log UFC/g na população de *E. coli* O157:H7. Nesse mesmo estudo extrato de alho e orégano em pó, adicionados em 0,5% no produto, aumentaram em menos de 0,5 log UFC/g da população de *E. coli* O157:H7. Resultados estes divergem com encontrados por Nadarajah et al. (2005), que comprovaram a eficiência do ITA em reduzir contagem de *E. coli* O157:H7 em hambúrguer cru, e por Chacon et al. (2006), que testaram a viabilidade de *E. coli* O157:H7 inoculada em hambúrgueres tratados com ITA microencapsulado mantidos sob refrigeração por 18 dias. Nesse último trabalho, a população de *E. coli* O157:H7 sofreu significativa redução a partir de doses de 1481ppm ou mais, ao longo do estudo.

Sung et al. (2014), testaram a aplicação de óleo de alho em membranas plásticas de sistemas de embalagens nas concentrações de 2, 4, 6 e 8%, sobre o crescimento de *E. coli*. A concentração de 8% inibiu totalmente a referida

bactéria, sendo uma alternativa para futuras aplicações em embalagens, pois desta forma o agente antimicrobiano combinado com polímeros da embalagem seria lentamente liberado ao produto ali contido, trazendo menor impacto sensorial ao mesmo.

No presente estudo houve redução da população de *E. coli* O157 na ordem de 4,5 log UFC/g, revelando uma boa interação entre o óleo de alho e o ITA no controle do crescimento da referida bactéria. Diferenças nos resultados podem ser explicadas pelo tipo de óleo utilizado, forma como foi extraído, bem como pelo método de aplicação deste ao produto testado, evidenciando maior ou menor espectro de ação antibacteriana.

Segundo Leitão (2003), o início de deterioração pode ser detectado pela descoloração superficial da carne ou derivado frescal quando a contagem microbiana atinge cerca de 6 log UFC/g, sendo que as alterações em relação ao odor podem ser evidenciadas a partir de valores de 7 log UFC/g; em relação ao sabor, 8 log UFC/g e a limosidade superficial pode ser observada a uma população microbiana de 9 log UFC/g de amostra. No presente estudo os valores para micro-organismos psicrótrópicos iniciaram já bem altos, com médias de 5 log UFC/g, chegando ao final do experimento com contagens próximas a 7,5 log UFC/g, tanto no grupo controle como no grupo tratado. As linguiças a partir do 14^o dia já demonstravam certo grau de descoloração, e a partir do 21^o dia já apresentavam odor mais acentuado. No último dia do experimento (35^o dia), havia presença de considerável limosidade superficial nas amostras. Pode-se concluir dessa forma que a qualidade inicial da matéria-prima é fundamental para se conseguir manter o produto com suas características por mais tempo. Partindo-se de uma matéria-prima já com menores contagens desses micro-organismos, seu aspecto geral (cor e odor) se apresentaria melhor ao término do experimento.

Georgantelis et al. (2007), na avaliação de linguiça de carne suína frescal tratada com extrato de alecrim (260mg/Kg), quitosana (10g/Kg) e alfa-tocoferol (115mg/Kg), mantida em refrigeração, avaliaram a evolução do desenvolvimento de *Pseudomonas sp.* e bactérias lácticas. Ao longo de 20 dias de armazenagem sob refrigeração, as contagens de *Pseudomonas spp.* aumentaram de 6 log UFC/g para 7,5 log UFC/g no grupo controle e

permaneceram na ordem de 6 log UFC/g no grupo tratado com quitosana. Já em relação à bactérias lácticas, as contagens iniciaram em 5,5 log UFC/g e terminaram em 8,2 log UFC/g no grupo controle e 5,8 log UFC/g no grupo tratado com quitosana. Grupo tratado com a interação quitosana e extrato de alecrim revelou contagens ainda um pouco menores ao final do experimento, 6,1 log UFC/g para *Pseudomonas spp.* e 5,9 log UFC/g para bactérias lácticas. Aquele estudo evidenciou o poder antimicrobiano da quitosana no controle desses micro-organismos, comprovando que esta substância interage com a membrana celular bacteriana, aumentando sua permeabilidade, resultando na perda de material intracelular (HELANDER, et al., 1998), ação que pode ser exercida pelo ITA e pelo óleo de alho. Bem como, efeito sinérgico entre quitosana e extrato de alecrim.

Bórnez et al. (2009) descrevem que a deterioração microbiana, assim como a oxidação lipídica, são um dos principais fatores que determinam a vida de prateleira de carnes e derivados refrigerados. Quando se utiliza uma matéria-prima com carga microbiana elevada, o prazo de vida de prateleira do produto é reduzido. Em contra partida, partindo-se de uma matéria-prima com baixas contagens de micro-organismos, tem-se um produto com melhores características e prazo de validade estendido (TAJKARIMI, 2010).

De um modo geral, a interação entre dois ou mais componentes antimicrobianos mostra melhores resultados do que quando utilizados isoladamente em matrizes alimentares, pois efeitos isolados se somam e até mesmo se potencializam (HYLDGAARD et al., 2012). Esse fato pode ter ocorrido no presente estudo, pois a interação alicina e isotiocianato de alila em linguiça frescal apresentou resultados satisfatórios no controle da população de alguns micro-organismos no produto. Para comprovação disso, os dois compostos poderiam ser testados isolados na linguiça, a fim de comprovar se efeitos se somam ou se potencializam.

O pH da carne é importante não apenas por influenciar a microbiota que pode se desenvolver no produto, implicando diretamente no estado de conservação da mesma, como também está relacionado com a cor e o sabor que a linguiça apresentará (ALMEIDA, 2005). Durante o tempo de armazenamento avaliado nesta pesquisa, a linguiça suína frescal apresentou

redução de pH, o que pode ser justificado pelo desenvolvimento de bactérias lácticas, cujos produtos metabólicos têm capacidade de aumentar a acidez do produto.

Resultados semelhantes a este foram observados por Chiavaro et al. (2008) ao avaliarem a eficácia de diferentes formas de acondicionamento (permeáveis ao oxigênio, vácuo, atmosfera modificada) em relação às propriedades da linguiça suína frescal, verificaram que a redução no pH em embalagens permeáveis ao oxigênio, como foi o caso do presente estudo, foi devida ao desenvolvimento de bactérias lácticas durante o período de armazenamento.

Já Georgantelis (2007), avaliando linguiça suína frescal adicionada de extrato de alecrim e embalada em isopor com filme plástico de PVC (alta taxa de transmissão de oxigênio), observou resultados diferentes do presente estudo. Esse autor verificou um aumento crescente nos valores de pH de 5,8 para 6,2 no decorrer de 20 dias de armazenamento, que foi associado ao desenvolvimento de micro-organismos das famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae. Tais micro-organismos utilizam aminoácidos livres e compostos nitrogenados simples como fonte de energia, com produção de amônia, levando à elevação do pH do meio (JAY, 2005). Dessa forma, pode-se supor que o óleo de alho em conjunto com o ITA poderiam ter inibido o crescimento de bactérias deteriorantes como *Pseudomonas spp.*, e por isso a partir do 7º dia de estudo as amostras tiveram valores de pH reduzidos e não aumentados como citam autores acima.

De acordo com Miltenburg et al. (1992), maiores os valores de L* indicam maior palidez da carne e maiores valores de a* e b* indicam maior intensidade das cores vermelha e amarela, respectivamente. A luminosidade da carne está relacionada com a capacidade de retenção de água e com o pH.

Os resultados para a coordenada L* indicam que as amostras tenderam a se apresentarem mais claras ao longo da estocagem, revelando um aumento em seu brilho superficial. A menor capacidade de retenção de água resulta na exsudação e aumento da luminosidade superficial da carne (PARDI, 1996).

O decréscimo dos valores a* verificados ao longo do tempo de estocagem das linguiças indicou que a coloração desses produtos tornou-se menos

vermelha, estando normalmente associada à formação gradual de metamioglobina e conseqüentemente, à descoloração da carne (JEREMIAH, 2001). O grupo tratado com os óleos essenciais manteve mais a cor vermelha do produto, pois apresentou menor queda no valor de a^* .

A derivada de cor h indica descoloração do produto, sendo que maiores valores coincidem com maior perda da coloração avermelhada nas linguiças. Neste estudo, ficou evidente a ação dos óleos essenciais de alho e ITA na manutenção da cor vermelha da carne suína na linguiça frescal, atributo este muito apreciado pelo consumidor no momento da escolha e compra do produto.

Chiavaro et al. (2008) observou valores de L^* variando de 62,8 para 52,9 ao final de 15 dias de estudo de linguiça suína frescal armazenada sob diferentes condições de embalagens. Já Figueiró (2013), obteve como resultados de L^* em linguiça frescal suína testada com diferentes concentrações de nitrito de sódio, valores entre 58 no início do tratamento e até 60 ao final de 15 dias. Na presente pesquisa os valores de L^* se mostram semelhantes ao verificado por esses e outros autores, revelando ainda que além do uso de óleos essenciais que atuam na conservação da cor, o uso de diferentes sistemas de embalagem, como atmosfera modificada, podem interferir positivamente na manutenção da cor de produtos cárneos.

Os valores de b^* encontrados nesta pesquisa também foram semelhantes aos obtidos por autores que trabalharam com linguiça suína frescal. Valores encontrados por Figueiró (2013) variaram entre 13 e 15 e por Martinez (2006) de 13 a 14. Aumento nos valores de b^* está relacionado à maior oxidação do produto, favorecida pela exposição à luz durante o armazenamento. Embalagens a vácuo e baixa temperatura de armazenamento auxiliam na manutenção de cor do produto.

Os valores de a^* encontrados neste trabalho foram superiores aos encontrados por Figueiró (2013), inferiores a 11,5. Chiavaro et al. (2008) obtiveram valores médios de a^* de 10,7 em linguiças frescas armazenadas a vácuo. Nesse mesmo estudo, o autor concluiu que linguiça frescal sofre descoloração ao longo de seu período de armazenamento, relacionada à

formação de metamioglobina, devido à baixa difusão de oxigênio na embalagem.

A estocagem em baixas temperaturas, associada à propriedade antioxidante dos óleos essenciais (LIU et al., 2009) auxiliaram na manutenção da cor das linguiças frescas ao longo do período de estocagem.

De acordo com Kamdem et al. (2007), o uso de especiarias aromáticas pode contribuir para a redução do uso de nitrato e nitrito na formulação de linguiça fresca, conferindo além de atividade antimicrobiana efetiva, manutenção de cor adequada e retardo nos processos de oxidação lipídica.

No presente estudo, o baixo teor de gordura na formulação da linguiça fresca, além da adição de níveis permitidos pela legislação brasileira de nitrito de sódio (conservador) e eritorbato de sódio (antioxidante) também contribuiu para o baixo teor de malonaldeído nas amostras, que se manteve abaixo de 0,5 mg MDA/kg, valor apontado como limite para a detecção de rancidez em produtos cárneos (SHEARD, 2000).

Valores mais elevados de TBARS (0,49 para 0,82 mg/kg) em linguiça suína fresca foram encontrados por Georgantelis (2007). O aumento verificado por este autor pode estar associado ao modo de acondicionamento do produto, que foi realizado em bandejas de isopor revestidas com filme plástico PVC. Nessa forma de acondicionamento, a presença de oxigênio pode ter contribuído para o aumento da oxidação lipídica. Contudo, nas linguiças adicionadas de extrato de alecrim testadas pelo autor, observou-se menor oxidação lipídica, evidenciando o poder antioxidante dos extratos vegetais.

Kamdem et al. (2007) avaliaram a oxidação lipídica em linguiça Toscana fresca adicionada de uma mistura de ervas, entre elas alho, cravo, canela e pimenta e compararam-na a um lote controle. Os autores verificaram valores de TBARS próximos a 0,05 mg/kg no grupo tratado em relação ao controle, que apresentou ligeiro aumento de TBARS (0,05 a 0,09 mg/kg), ao longo de 14 dias de armazenamento.

Sallam et al. (2004) testaram a atividade antioxidante do alho em linguiça fresca de frango, testando esse agente sob três diferentes formas: alho fresco, alho em pó e óleo de alho. Valores iniciais de TBARS encontravam-se em 0,14 mg de MDA/Kg de produto, chegando ao término de experimento com 21 dias

de estocagem sob refrigeração com os seguintes valores: tratamento contendo 50 g/Kg de alho fresco aumentou valor para 0,15mg de MDA/Kg; tratamento com 15 g/Kg de alho em pó aumentou valor para 0,16 mg de MDA/Kg; e tratamento com 0,015 g/Kg de óleo de alho aumentou valor para 0,18 mg de MDA/Kg. Em contra partida, o grupo controle sem adição de alho teve elevação dos valores de TBARS para 0,28 mg de MDA/Kg. Com esse estudo os autores chegaram a conclusão de que o óleo de alho teve atividade antioxidante menor se comparado com a atividade do alho fresco e do alho em pó, muito provavelmente devido perda de compostos sulfurados voláteis durante seu processo de fabricação e durante sua utilização. Também afirmaram que atividade antioxidante do alho é dependente de sua concentração, pois valores de oxidação lipídica, representada pelos valores de TBARS, são reduzidas com o aumento da concentração do alho.

Dessa forma, ficou evidenciada a atividade antioxidante dos óleos essenciais de alho, composto principalmente por alicina, e de isotiocianato de alila em lingüiça frescal, além de sua ação antimicrobiana. A ação antioxidante desses óleos é atribuída principalmente à sua capacidade de sequestrar radicais livres, além de inibir enzimas hidrolíticas e oxidativas, preservando a cor dos produtos tratados e mantendo estáveis ou com poucas alterações os valores de TBARS. (TAJKARIMI et al., 2010; BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004).

4.5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos com o presente estudo, pode-se verificar que a aplicação combinada do óleo essencial de alho e de ITA nas concentrações estudadas em lingüiça suína frescal representa uma alternativa como agente conservante e antioxidante. A redução da população aeróbia mesófila, além da inibição do crescimento de *E. coli* O157, comprova que o uso combinado de ITA e óleo de alho em lingüiça frescal pode proporcionar maior segurança ao produto e prolongar sua vida de prateleira. Adicionalmente, os óleos essenciais incorporados à lingüiça frescal promoveram efeito antioxidante tanto sobre os lipídeos quanto sobre os pigmentos da carne, demonstrado

pelos menores valores de TBARS e maior estabilidade de cor vermelha ao longo do período de estocagem do produto.

CAPÍTULO 5

5 CONCLUSÃO GERAL

Plantas aromáticas e ervas, ricas em óleos essenciais com notória atividade antimicrobiana, podem ser estudadas como potenciais conservantes em alimentos. Entre essas plantas, a mostarda, o alho, o orégano e a canela têm sido pesquisadas para uso em alimentos. Contudo, por serem voláteis, os óleos essenciais podem alterar as características sensoriais dos alimentos onde são adicionados.

Em produtos cárneos frescos, como as linguiças, manter a segurança e prolongar o tempo de comercialização pela extensão da vida de prateleira, com o uso de substâncias naturais, mas mantendo as características sensoriais tradicionais do produto é um objetivo bastante vislumbrado atualmente pela indústria. Dessa forma, a pesquisa de efeito conservante em compostos naturais, comumente usados como especiarias na formulação de linguiça fresca, pode ser uma estratégia para minimizar os efeitos sensoriais indesejáveis dos óleos essenciais e promover a saudabilidade desses produtos junto ao consumidor.

Nesse sentido, este estudo mostrou a possibilidade do emprego da combinação de óleos essenciais na formulação de linguiça fresca para tentativa de extensão de vida de prateleira, pois conseguiu reduzir populações de micro-organismos testados, como *E. coli* O157 e aeróbios mesófilos.

Na continuidade desse estudo, deve-se avaliar o perfil e a aceitação sensorial do produto em testes de consumidores, propondo-se ainda, a pesquisa de novas formas de aplicação dos óleos essenciais na linguiça, tais como microencapsulação ou ainda definição de sistemas de embalagens contendo os agentes antimicrobianos, que causariam ainda menos interferência sensorial no produto e que poderiam ter sua ação conservante potencializada pela liberação contínua na atmosfera que envolve o produto.

REFERÊNCIAS

Abipecs, Relatório Abipecs 2012. Disponível em www.abipecs.org.br/pt/relatorios/html. Acesso em 29/05/2014.

Almeida, C. O. Avaliação físico-química e microbiológica de linguiça toscana porcionada e armazenada em diferentes embalagens, sob condições de estocagem similares às praticadas em supermercados (Dissertação de mestrado). Campinas, SP. Universidade Estadual de Campinas, 2005.

Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P. Chemical composition, seasonal variability and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. spp. essential oils from stem/ leaves and flowers. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 2006. 54: 4364-4370.

Apha. American Public Health Association. *Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods*, 4ed. Washington, D.C. 2001.

Araujo, J., M., A. Química dos alimentos: Teoria e prática. 5ª edição, Viçosa, Mg, UFV, 2011.

Araújo, P.F., Rodrigues, R.S. Nitratos, nitritos, nitrosaminas e seus efeitos sobre o organismo humano. *Higiene Alimentar*. 2008, 22: 54-58.

ASTM International. American Society for Testing and Material. *Standard practice for computing the colors of objects by using the CIE system*. Pennsylvania: ASTM International, 2001.

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, 46: 446 – 475.

Bórnez, R.; Linares, M. B.; Vergara, H. Effect of different gas stunning methods on Manchega suckling lamb meat packed under different modified atmospheres. *Meat Science*. 2010, 84: 727-73.

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.

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, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. Estatística de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil no período de 1999 a 2008. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_doencas_transmitidas_alimentos. 2008.

Bromberg, R. Microbiologia de produtos embutidos. In: Lemos, A.L.S.C.; Yamada, E.A. Princípios do Processamento de Embutidos Cárneos. Campinas: CTC/ ITAL, 2002. 164p. p. 121-135.

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

Campagnol, P. C. B., Fries, L. L. M., Terra, N. N., Santos, B. A., Furtado, A. S., Toneto, E. R. L., Campos, R. M. L. Influência do extrato de marcela (*Achyrocline satureioides*) na oxidação lipídica de salames. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2011, 31: 101-115.

Cardoso, L., Araujo, W. M. C. Parâmetros de qualidade em carnes comercializadas no Distrito Federal no período de 1997 – 2001. *Higiene Alimentar*. 2003, 17: 12-19.

Carson, C. F., Mee, B.J., Riley, T.V. Mechanism of action of *Malaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *S. aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002. 46: 1914-1920.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 2013. Disponível em: www.cdc.gov/foodnet/data/trends/trends-2013.html.

Chacon, P. A., Buffo, R.A., Holley, R.A. Inhibitory effects of microencapsulated allyl isothiocyanate (AIT) against *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated, nitrogen packed, finely chopped beef. *International Journal of Food Microbiology*. 2006, 107:231-237.

Chiavaro, E., Zanardi, E., Bottari, E., Ianieri, A. Efficacy of different storage practices in maintaining the physicochemical and microbiological properties of fresh pork sausage. *Journal of Muscle Foods*. 2008, 19: 157-174.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI document. 2009.

Cordeiro, R. P., Luciano, F. B., Holley, R. A. Evaluation of deodorized yellow mustard concentrations for control of *E. coli* O157:H7 viability in dry fermented sausage. *Food Control*. 2013, 33, 20-24.

Correia, L. M. M. Multiplicação de microbiota autóctone e de *S. aureus* inoculado em linguiças frescas produzidas com diferentes concentrações de sais de cura (Dissertação de mestrado). Curitiba, Pr. Universidade Federal do Paraná, 2008.

Daguer, H. A. A cura da carne e a formação de nitrosaminas. *Higiene Alimentar*. 2005, 19: 15-20.

Dontorou, C., Papadopoulou, C., Filioussis, G., Economou, V., Apostolou, I., Zakkas, G., Salamoura, A., Kansouzidou, A., Levidiotou, S. Isolation of *E. coli* O157:H7 from foods in Greece. *International Journal of Food Microbiology*. 2003. 82: 273-279.

Dorman, H.J.D., Deans, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2000. 88: 308-316.

Dourou, D., Porto-Fett, A.C.S., Shoyer, B., Call, J.E., nychas, g.J.E. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in teewurst, a raw spreadable sausage. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, 130: 245-250

Federici, G., Shaw, B. J., Handy, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*. 2007, 84:415-430.

Figueiró, L. M. Influência da redução do teor de nitrito de sódio na estabilidade oxidativa e avaliação microbiológica de linguiça suína frescal (Dissertação de Mestrado). Alegre, Es. Universidade Federal do Espírito Santo, 2013.

Germano, M. L.; Germano, M.I. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. São Paulo, SP: Editora Varela, 2001.

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

Getty, K. J. K., Phebus, R. K., Marsden, J. L., Fung, D. Y. C., Kastner, C. L. *Escherichia coli* O157:H7 and fermented sausages: a review. Department of Animal Sciences and Industry, Kansas State University. 2000, 18:141-169.

Gill, A. O., Holley, R. A. Inhibition of membrane bound ATPases of *E. coli* and *L. monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*. 2006, 94:170-174.

Goni, P., Lopez, P., Sanchez, C., Gomez-Luz, R., Becerril, R., Nerin, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*. 2009, 116: 982-989.

Gou, P.; Comaposada, J.; Amau, J. Meat pH and meat fiber direction effects on moisture diffusivity in salted ham muscles dried at 5 °C. *Meat Science*. 2002, 61: 25-31.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, 124: 91-97.

Hayes, J. E.; Stepanyan, V.; Allen, P.; O'Grady, M. N.; Kerry, J. P. Evaluation of the effects of selected plant-derived nutraceuticals on the quality and shelf-life stability of raw and cooked pork sausages. *Food Science and Technology*. 2011, 44:164-172.

Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I. Characterization of the action of selected essential oils components on gram-negative bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1998, 46: 3590-3595.

Holley, R. A. Impact of slicing hygiene upon shelf life and distribution of spoilage bacteria in vacuum packed cured meat. *Food Microbiology*. 1997, 14:201-211.

Hyltdgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*. 2012, 3: 1-24.

IAL, Instituto Adolf Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos – Carnes e produtos cárneos. 4ª ed. São Paulo, 2008.

Jay, J. M. Microbiologia de Alimentos, 6ª edição, Porto Alegre, Artmed, 2005.

Jeremiah, L.E. Packaging alternatives to deliver fresh meat using short or long-term distribution. Food Research International. 2001, 34: 749-772.

Juneja, V. K.; Friedman, M. Carvacrol, Cinnamaldehyde, Oregano oil and thymol inhibit *Clostridium perfringens* spore germination and outgrowth in ground turkey during chilling. Journal of Food Protection. 2007, 70: 218-222.

Kanatt, S. R., Chander, R., Sharma, A. Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. Food Chemistry. 2008, 107: 845-852.

Kandem, S.S., Patrignani, F., Guerzoni, M. E. Shelf-life and safety characteristics of Italian Toscana traditional fresh sausage (Salsiccia) combining two commercial ready-to-use additives and spices. Food Control. 2007, 18, 421-429.

Kasnowski, M. C. *Listeria* spp., *E. coli*: isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina, inteira e moída (Dissertação de Mestrado). Niterói, Rj. Universidade Federal Fluminense, 2004.

Kennedy, C.; Buckley, D.J.; Kerry, J.P. Display life of sheep meats retail packaged under atmospheres of various volumes and compositions. Meat Science. 2004, 68: 649-658.

Kim, J., Marshall M. R., Wei, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. Journal of Agriculture Food Chemistry. 1995, 43: 2839-2845.

Kyung, K. H., Park, K. K., Kim, Y. S. Isolation and characterization of bacteria resistance to the antimicrobial activity of garlic. *Journal of Food Science*. 1996, 61:226-229.

Lahucky, R., Nuernberg, K., Kovac, L., Bucko, O., Nuernberg, G. Assessment of the antioxidante potential of selected plants extracts – in vitro and in vivo experiments on pork. *Meat Science*. 2010, 85: 779-784.

Leitão, M.F.F. Aspectos microbiológicos das carnes. In: Contreras, C.J. Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados. São Paulo: Varela, cap. 1, p. 1-5, 2003.

Lemay, M. J.; Choquette, J.; Delaquis, P.J.; Gariépy, C.; Rodrigue, N.; Saucier, L. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *International Journal of Food Microbiology*. 2002, 78: 217-226.

Liu, D. C., Tsau, R. T., Lin, Y. C., Jan, S. S., Tan, F. J. Effect of various levels of rosemary or Chinese mahogany on the quality of fresh chicken sausage during refrigerated storage. *Food Chemistry*. 2009, 117: 106-113.

Lopez, P., Sanchez, C., Batle, R., Nerin, C. Solid and vapor phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53: 6939-6946.

Luciano, F. B., Belland, J., Holley, R. A. Microbial and chemical origins of the bactericidal activity of thermally treated yellow mustard powder toward *Escherichia coli* O157:H7 during dry sausage ripening. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, 145: 69-74.

Luciano, F. B., Holley, R. A. Enzymatic inhibition by allyl isothiocyanate and factors affecting its antimicrobial action against *E. coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, 131:240-245.

Marino, M., Bersani, C., Comi, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiacea* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, 67: 187-195.

Marques, S; Boari, C; Brcko, C; Nascimento, A.; Piccoli, R. Avaliação higiênico-sanitária de linguiças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras, MG. *Ciências Agrotécnicas*. 2006, 30:1120-1123.

Martinez, L. Effect of varying oxygen concentrations on the shelf-life of fresh pork sausages packed in modified atmosphere. *Food Chemistry*. 2006, 94:219-225.

Martins, H. H. A., Simões, L. A., Nunes, C. A. Alcântara, E.M.C., Piccoli, R. H. Antimicrobial activity of different combinations of essential oils on *E. coli* and *C. perfringens*. *Higiene Alimentar*. 2013, 27:218-222.

Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A.J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., Parker, M. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 2006, 107:180-185.

Mathenjwa, S.A.; Hugo, C.J.; Hugo, C.B. Effect of alternative preservatives on the microbial quality, lipid stability and sensory evaluation of boerewors. *Meat Science*. 2012, 91:165-172.

McCarthy, T. L., Kerry, J. P., Kerry, J. F., Lynch, P. B., Buckley, D. J. Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Science*. 2001, 57: 177-184.

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

Miltenburg, G. A. J., Wensing T.H., Smulders, F.J.M., Breukink, H.J. Relationship between Blood Hemoglobin, Plasma and Tissue Iron, Muscle Heme Pigment, and Carcass Color of Veal. *Journal of Animal Science*. 1992, 70, 2766-2772.

Mittelstaeldt, S.; Carvalho, V. M. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 – revisão. *Revista do Instituto Ciência e Saúde*. 2006, 24:175-182.

Mytle, N., Anderson, G. L., Doyle, M.P., Smith, M.A. Antimicrobial activity o clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *L. monocytogenes* on chicken frankfurtres. *Food Control*. 2006, 17:102-107.

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

Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek, J. Antimicrobial properties of selected essencial oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*. 2009, 20: 157-160.

Negi, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, 156: 7-17.

Njoroge, S. M. C., Riley, M. B., Keinath, A. P. Effect of incorporation of Brassica spp. Residues on population densities of soilborne microorganisms and on damping-off and *Fusarium* wilt of watermelon. *Plant Disease*. 2008, 92: 287-294.

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

Ordóñez, J. A. Tecnologia de Alimentos - Volume 1. 1ª Edição, Editora Artmed, Porto Alegre, RS, 2005.

Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, R., Azizi, M., Bassami, M. R. Phytochemical composition of the essential oils from three *Apiaceae* species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food Chemistry. 2010, 120: 765-770.

Oussalah, M. et al. Inhibitory effects of selected plants essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control. 2007, 18: 414-420.

Padhye, N. V., Doyle, M. P. *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. Journal of Food Protection. 1992, 55: 555-565.

Palanichany, A., Jayas, D.S.; Holley, R.A. Predicting survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausage using artificial neural networks. Journal of Food Protection. 2008, 1: 6-12.

Pardi, M. C., et al. Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne. 2ª edição, Editora UFG, Goiânia, 1996.

Pei, R. S., Zhou, F., Ji P. B., Xu, J. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. Journal of Food Science. 2009, 74: 379-383.

Pereira, A. A., Cardoso, M. G., Abreu, L.R., Morais, A. R., Guimarães, L.G.L., Salgado, A.P.S.P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*. Ciência e Agrotecnologia. 2006, 32: 887-893.

Peter, K. V. Handbook of herbs and spices. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2004.

Rounds, L., Havens, M. C., Feinstein, Y., Friedman, M., Ravishankar, S. Plant extracts, spices, and essential oils inactivate *E. coli* O157:H7 and reduce formation of potentially carcinogenic heterocyclic amines in cooked beef patties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012, 60:3792-3799.

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

Sanchez, E., Garcia, S., Heredia, N. Extract of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. Application Environment Microbiology. 2010, 76: 6888-6894.

Santos, F. S., Novales, M. G.M. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. Current Opinion in Biotechnology. 2012, 23:136-141.

Santos, J. C., Filho, C. D. C., Barros, T. F., Guimaraes, A. G. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. Semina: Ciências Agrárias. 2011, 32: 1557-1564.

Sartz, L., De Jong, B., Hjertqvist, M., Plym-Forsell, L., Alsterlund, R., Löfdahl, S., Osterman, B., Ståhl, A., Eriksson, E., Hansson, H.B., Karpman, D. 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. 2008, 136: 370-380.

Sasaki, J. L., Kita, T., Ishita, H. Antibacterial activity of garlic essential oil against *E. coli* O157:H7. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 1999, 45: 785-790.

Sheard, P.R. Shelf life and quality of pork products with raised n-3 PUFA. *Meat Science*. 2000, 55: 213-221.

Sebranek, J. G.; Bacus, J. N. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science*. 2007, 77: 136-147.

Sebranek, J. G., Sewalt, V. J. H., Robbins, K. L., Houser, T. A. Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Science*. 2005, 69: 289-296.

Silva Jr, E. A. *Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos*. 5ª edição, Editora Varela, São Paulo, Sp, 2002.

Silva, M. T. N., Ushimaru, P.I., Barbosa, L.N., Cunha, M.L.R.S., Fernandes J. A. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2009, 11: 257-262.

Silveira, S. M. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de louro como agente conservador natural em embutido cárneo fresco (Tese Doutorado). Florianópolis, Sc: Universidade Federal de Santa Catarina; 2012.

Silveira, S. M., Júnior, A. C., Scheuermann, G. N., Secchi, F., Vieira, C. R. W. 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*. 2012, 42:1300-1306.

Sofos, J. N. Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat Science*. 2008, 78:3-13.

Souza, E. L., Oliveira, C. E. V., Stamford, M. L., Conceição, N. J., Neto, N. J. G. Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013, 44: 29-36.

Sung, S.Y., Sin, L.T., Tee, T.T., Bee, S.T., Rahmat, A.R. Effects of *Allium sativum* essence oil as antimicrobial agent for food packaging plastic film. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2014 (accepted manuscript).

Tajkarimi, M. M., Ibrahim S. A., Cliver D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 2010, 21: 1199-1218.

Terra, N. N. Apontamentos de Tecnologia de Carnes. São Leopoldo: Ed. Unisinos, 1998.

Tiwari, B. K.; Valdramidis, V.P.; O'Donnell, C. P. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, 57: 5987-6000.

Tompkin, R.B. Nitrite. In: *Antimicrobials in Food* (3 ed). Davidson, P.M.; Sofos, J.N.; Branen, A.L. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Frances Group, 2005. Trajano, V. N., Lima E. O., Souza, E. L., Travassos, A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2009, 29: 542-545.

Trajano, V. N.; Lima, E. de O.; Souza, E. L.; Travassos, A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias

contaminantes de alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2009, 29: 542-545.

Valencia, I., O'Grady, M. N., Ansorena, D., Astiasaran, I., Kerry, J. P. Enhancement of the nutritional status and quality of fresh pork sausages following the addition of linseed oil, fish oil and natural antioxidants. *Meat Science*. 2008, 80: 1046-1054.

Wilkinson, J.M., Hipwell, M., Ryan, T., Cavanagh, H.M.A. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003. 51: 76-81.

Yin, M. C., Cheng, W. S. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Science*. 2003, 63: 23-28.

Zanardi, E., Ghidini, S., Battaglia, A., Chizzolini, R. Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. *Meat Science*. 2004, 66: 415-423.