

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Agrárias**

**Atividade antioxidante e antimicrobiana de óleos essenciais aplicados na conservação
de linguiça frescal de frango**

**MONTES CLAROS
2017**

Francielly Soares Oliveira

**Atividade antioxidante e antimicrobiana de óleos essenciais aplicados na conservação
de linguiça frescal de frango**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Produção Animal da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em
Produção Animal.

Área de Concentração: Produção Animal

Linha de Pesquisa: Qualidade de Alimentos
de Origem Animal

Orientador: Ernane Ronie Martins

Co-orientadores: Roberta Torres Careli
Rogério Marcos de Souza

MONTES CLAROS

2017

O48a
2017

Oliveira, Francielly Soares.

Atividade antioxidante e antimicrobiana de óleos essenciais aplicados na conservação de linguiça fresca de frango / Francielly Soares Oliveira. Montes Claros, 2017.

61f.: il.

Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Área de concentração: Qualidade de Alimentos de Origem Animal. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Ernane Ronie Martins.

Banca examinadora: Prof.^aAna Claudia Chesca, Prof.^aFrancine Souza Alves da Fonseca, Prof. Rogério Marcos de Souza, Prof. Ernane Ronie Martins.

Inclui referências: f. 27-33, 43-46, 58-60.

1. Óleos essenciais. 2. Análise de alimentos. 3. Tecnologia de alimentos. I. Martins, Ernane Ronie (Orientador). II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 641

Francielly Soares Oliveira

**Atividade antioxidante e antimicrobiana de óleos essenciais aplicados na conservação
de linguiça frescal de frango**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção animal do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Produção Animal.

Área de Concentração: Produção Animal

Linha de Pesquisa: Qualidade de Alimentos de Origem Animal

Orientador: Ernane Ronie Martins

Banca Examinadora

Dra. Ana Claudia Chesca
(UNIUBE)

Dra. Francine Souza Alves da Fonseca
(ICA/UFMG)

Dr. Rogério Marcos de Souza
(Co-orientador/ICA-UFMG)

Dr. Ernane Ronie Martins
(Orientador/ICA – UFMG)

Montes Claros, 30 de junho de 2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por permitir que mais uma etapa seja concluída na minha vida e se fazer presente em todos os momentos.

Aos meus amados pais, João Alberto e Santa, pelo amor incondicional, por todo apoio e dedicação em prol das minhas realizações. Aos meus amados irmãos, Paula, Fernanda e Tiago, por todo apoio, amor e incentivo.

A Ernane Ronie Martins, pela orientação, oportunidades e pela valiosa contribuição para realização deste trabalho e para minha formação.

Aos meus co-orientadores, Roberta Torres Careli e Rogério Marcos de Souza, pelo apoio prestado, carinho e por toda contribuição para realização deste trabalho.

A Renatta e Luana pela amizade, carinho e apoio em todas as horas, obrigada por tornarem essa etapa mais fácil.

A Priscila, Patrícia e Walesska pela valiosa contribuição na realização das análises. Aos técnicos, Carla e Hugo pelo auxílio no desenvolvimento das pesquisas

A Francine, por todo carinho, ensinamentos e valiosa contribuição para realização deste trabalho e para minha formação.

A toda equipe do laboratório de plantas medicinais, em especial a Júlio e Amanda, por toda colaboração na realização das análises.

A professora Anna Cristina e a todos do laboratório de Sanidade Animal, onde foi possível a realização das análises microbiológicas, em especial a Cíntya, por todo carinho, ensinamentos e apoio na realização das análises.

A todos do laboratório de Química Instrumental, à Ane e Erica pela realização das análises cromatográficas. Ao professor Demerson e a todos do laboratório de Biotecnologia pela disponibilidade de materiais e apoio na realização das análises.

A todos, meu sincero agradecimento.

“ Deus é isto: A beleza que se ouve no silêncio.
Daí a importância de saber ouvir os outros: a beleza mora lá também. ”

Rubem Alves

RESUMO

Diante dos possíveis riscos e do crescente número de consumidores que têm exigido a adoção de políticas que visem à segurança dos alimentos, pesquisas têm sido desenvolvidas em busca de compostos alternativos aos conservantes químicos nos produtos cárneos. Os óleos essenciais (OEs) têm sido amplamente estudados devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, e tem se mostrado passíveis de utilização no controle da oxidação lipídica e de patógenos nos alimentos. Objetivou-se avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana de OEs aplicados na conservação de linguiça frescal de frango. A extração dos OEs de pimenta-da-jamaica (*Pimenta dioica*) e erva-baleeira (*Varronia curassavica*) foi realizada por destilação com vapor d'água, utilizando-se um equipamento (Linax D20) em escala piloto e o OE de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) foi extraído por hidrodestilação em *Clevenger* durante 4 horas. A caracterização química dos compostos presentes nos OEs foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). A atividade antioxidante dos óleos foi determinada pelo método do DPPH e a atividade antimicrobiana por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente aos patógenos *Staphylococcus coagulase positiva*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Cholerasuis. A partir dos testes realizados *in vitro*, aplicou-se os OEs de cravo-da-índia e pimenta-da-jamaica em linguiça frescal de frango, nas concentrações de 10 $\mu\text{L g}^{-1}$ e 40 $\mu\text{L g}^{-1}$, e a combinação destes dois OEs na concentração de 10 $\mu\text{L g}^{-1}$. A linguiça frescal de frango foi avaliada aos 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento a 7°C quanto ao crescimento microbiano, pela contagem de coliformes a 45°C, *S. coagulase positiva* e *Salmonella* sp., quanto à oxidação lipídica, pelo método de TBARS, quanto ao pH e quanto à permanência dos OEs na linguiça após o armazenamento. As amostras adicionadas de OEs apresentaram diferenças significativas nos valores de TBARS, em comparação ao controle. Os OEs foram capazes de retardar a oxidação lipídica na linguiça frescal de frango durante os 21 dias de armazenamento. Ocorreu elevação do pH durante todo período de armazenamento em todos os tratamentos e no controle, condizente com a contaminação microbiana. Não houve diferenças entre as amostras adicionadas de OEs e controle nas contagens de coliformes a 45°C. Apenas os tratamentos adicionados de OE de cravo na concentração de 40 $\mu\text{L g}^{-1}$ e da combinação dos dois OEs (10 $\mu\text{L g}^{-1}$) que não apresentaram a presença de *Salmonella* sp. durante os 21 dias de armazenamento. Nenhuma das amostras apresentou contaminação por *S. coagulase positiva* durante o período de armazenamento. A análise de *headspace* confirma a presença dos OEs nas linguiças durante os dias de armazenamento. A adição dos OEs de cravo-da-índia e pimenta-da-jamaica à linguiça frescal de frango como antioxidante pode ser considerada promissora, uma vez que inibiu a oxidação lipídica durante todo período avaliado. Em relação à atividade antimicrobiana, os OEs não foram efetivos nas concentrações testadas.

Palavras-chave: Oxidação lipídica. Pimenta-da-jamaica. Cravo-da-índia. Erva-baleeira.

ABSTRACT

Faced with the potential risks and increasing numbers of consumers who have required the adoption of food safety policies, research have been carried out in search of alternatives to chemical preservatives in meat products. Essential oils (EOs) have been extensively studied because of their antimicrobial and antioxidant properties and have been shown to be useful for the control of lipid oxidation and pathogens in food. The objective was to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of OEs applied in the conservation of fresh chicken sausage. The extraction of the OEs of allspice (*Pimenta dioica*) and erva-baleeira (*Varronia curassavica*) was carried out by distillation with water vapor, using a pilot scale equipment (Linax D20) and clove (*Eugenia caryophyllata*) was extracted by hydrodistillation in Clevenger for 4 hours. The chemical characterization of the compounds present in the EOs was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). The antioxidant activity of the oils was determined by the DPPH method and the antimicrobial activity through Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) against the pathogens *Staphylococcus* coagulase positive *Escherichia coli* and *Salmonella* Cholerasuis. From the in vitro tests, clove EOs and allspice were applied to fresh chicken sausage at concentrations of 10 $\mu\text{L g}^{-1}$ and 40 $\mu\text{L g}^{-1}$, and the combination of these two EOs at the concentration of 10 $\mu\text{L g}^{-1}$. The fresh chicken sausage was evaluated at 1, 7, 14 and 21 days of storage at 7°C for microbial growth, by counting coliforms at 45°C, *Staphylococcus* coagulase positive and *Salmonella* sp., for lipid oxidation by the method of TBARS, pH and the permanence of EOs in sausage after storage. The added samples of EOs presented significant differences in the TBARS values, compared to the control. EOs were able to retard lipid oxidation in fresh chicken sausage during the 21 days of storage. There was a rise in pH throughout the storage period in all treatments and in control, consistent with microbial contamination. There were no differences between the samples added with EOs and control on the coliform counts at 45°C. Only treatments added clove OE at the concentration of 40 $\mu\text{L g}^{-1}$ and the combination of the two EOs (10 $\mu\text{L g}^{-1}$) that did not present the presence of *Salmonella* sp. during 21 days of storage. None of the samples showed contamination by *Staphylococcus* coagulase positive during the storage period. The headspace analysis confirms the presence of EOs in the sausages during storage days. The addition of clove and allspice EOs to fresh chicken sausage as an antioxidant may be considered promising since it inhibited lipid oxidation throughout the evaluated period. In relation to the antimicrobial activity, the EOs were not effective in the tested concentrations, being necessary to carry out further studies.

Keywords: Meat product. Lipid oxidation. Allspice. Clove. Erva-baleeira.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura.....	13
Figura 1 - Componentes fenólicos de óleos essenciais.....	14
Figura 2 - Mecanismos de ação de óleos essenciais na célula bacteriana.....	17
Figura 3 - Auto-oxidação lipídica.....	19
Figura 4 - Reação do teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído.....	20
Artigo 2 - Avaliação da estabilidade oxidativa e microbiológica de linguiça frescal de frango adicionada de óleos essenciais	47
Figura 1 - Valores de pH das linguiças frescas de frango controle e adicionada de óleos essenciais durante o armazenamento refrigerado	56

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura.....	13
Tabela 1 - Padrões microbiológicos máximos para embutidos frescais estabelecidos pela RDC nº 12/01 da ANVISA.....	23
Artigo 1 - Caracterização química e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>Pimenta dioica</i> Lindl., <i>Varronia curassavica</i> Jacq. e <i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.....	35
Tabela 1 - Teor de óleo essencial e compostos identificados (CG-EM) nos óleos essenciais extraídos da <i>Pimenta dioica</i> , <i>Varronia curassavica</i> e <i>Eugenia caryophyllata</i>	39
Tabela 2 - Percentagem de sequestro dos radicais livres dos óleos essenciais de <i>Pimenta dioica</i> , <i>Varronia curassavica</i> e <i>Eugenia caryophyllata</i>	40
Tabela 3 - Concentração efetiva e índice de atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>Pimenta dioica</i> , <i>Varronia curassavica</i> e <i>Eugenia caryophyllata</i>	41
Tabela 4 - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>Pimenta dioica</i> , <i>Varronia curassavica</i> e <i>Eugenia caryophyllata</i> frente a microrganismos patogênicos.....	42
Artigo 2 - Avaliação da estabilidade oxidativa e microbiológica de linguiça frescal de frango adicionada de óleos essenciais	47
Tabela 1 - Ingredientes utilizados (%) na formulação da linguiça frescal de frango.....	50
Tabela 2 - Contagem de coliformes a 45°C em amostras de linguiça frescal de frango controle e adicionada de óleos essenciais durante o período de armazenamento a 7°C.....	53
Tabela 3 - Valores médios de TBARS na linguiça frescal de frango com óleo essencial de <i>Pimenta dioica</i> e <i>Eugenia caryophyllata</i> durante o período de armazenamento a 7°C.....	55
Tabela 4 - Análise cromatográfica do <i>headspace</i> da linguiça frescal de frango acrescida de óleos essenciais de <i>Pimenta dioica</i> e <i>Eugenia caryophyllata</i>	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	Objetivo Geral	12
2.2	Objetivo Específicos.....	12
3	REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1	Plantas Medicinais e Condimentares.....	13
3.1.1	Óleos essenciais	13
3.1.1.1	<i>Eugenia caryophyllata</i>	15
3.1.1.2	<i>Pimenta dioica</i>	15
3.1.1.3	<i>Varronia curassavica</i>	16
3.2	Atividade antimicrobiana de óleos essenciais.....	16
3.3	Atividade antioxidante de óleos essenciais.....	18
3.3.1	Oxidação Lipídica	18
3.3.2	Antioxidantes.....	20
3.4	Carne de frango e linguiça	21
3.4.1	Mercado da carne de frango	21
3.4.2	Linguiça	22
3.5	Parâmetros microbiológicos para linguiças.....	23
3.5.1	<i>Salmonella</i> sp.....	23
3.5.2	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	24
3.5.3	Coliformes a 45°C	24
3.6	Aplicação de óleos essenciais em produtos cárneos	25
	REFERÊNCIAS.....	27
4	ARTIGOS	34
4.1	Artigo 1 - Caracterização química e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>Pimenta dioica</i> Lindl., <i>Varronia curassavica</i> Jacq. e <i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.....	34
4.2	Artigo 2 - Avaliação da estabilidade oxidativa e microbiológica de linguiça frescal de frango adicionada de óleos essenciais.....	47
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	61

1 INTRODUÇÃO

Os produtos cárneos podem se deteriorar rapidamente devido a processos oxidativos e o crescimento microbiano durante as etapas de processamento e armazenamento (KRISHNAN *et al.*, 2014). Portanto, retardar e prevenir esses processos são fatores determinantes na qualidade final do produto.

A oxidação é a principal causa de deterioração dos ácidos graxos insaturados, que conduz à perda de qualidade nutricional e sensorial da carne e de seus produtos, reduzindo sua vida de prateleira, além da formação de compostos potencialmente tóxicos, como o malonaldeído (MARQUES *et al.*, 2009; JAYASENA; JO, 2014). Além do mais, as carnes podem se contaminar durante o abate ou processamento com microrganismos patogênicos e deteriorantes, cujo desenvolvimento pode levar a alterações indesejáveis na carne (KRISHNAN *et al.*, 2014).

Para garantir a segurança destes produtos, aumentar sua vida útil e controlar a oxidação lipídica e crescimento microbiano, a indústria recorre aos conservantes químicos (MOREIRA *et al.*, 2005). No entanto, alguns desses conservantes têm sido considerados prejudiciais à saúde e, frequentemente, associados a problemas como rinite, cefaleia, alergias, asma e diaforese (KRISHNAN *et al.*, 2014).

Diante dos possíveis riscos e pelo crescente número de consumidores que têm exigido a adoção de políticas que visem à segurança alimentar, nos últimos anos, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas com compostos naturais, visando a utilização destes como antioxidantes e antimicrobianos. Dentre os compostos estudados, os óleos essenciais (OEs) têm se mostrado promissores e passíveis de utilização nos alimentos (BURT, 2004; BAKKALI *et al.*, 2008; TRAJANO *et al.*, 2009).

Muitas espécies vegetais possuem propriedades antimicrobiana e antioxidante, dentre estas espécies, destacam-se as plantas medicinais e condimentares que, além de conferir características sensoriais próprias aos alimentos, podem desempenhar uma ação inibitória sobre o crescimento de microrganismos indesejáveis (BURT, 2004) e reduzir os processos oxidativos (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013; JAYASENA; JO, 2014), o que as torna úteis e como alternativas mais saudáveis para as indústrias de alimentos, em comparação aos conservantes químicos.

Muitos estudos *in vitro* relatam a eficácia dos OEs de plantas medicinais e condimentares como antioxidantes e sua ação contra patógenos de origem alimentar e bactérias deteriorantes (TRAJANO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2011; AZERÊDO *et al.*, 2012; ANDRADE *et al.*, 2012; QUEIROZ *et al.*, 2014). No entanto, poucos estudos relatam a eficiência dos OEs aplicados diretamente nos alimentos como conservantes. Assim, são necessários estudos detalhados sobre a efetividade dos OEs, quando empregados individualmente e em combinação com outros extratos, OEs e tecnologias de processamento de alimentos (TAJKARIMI *et al.*, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante de óleos essenciais e sua aplicabilidade sobre a vida de prateleira de linguiça frescal de frango.

2.2 Objetivos específicos

- Obter e determinar a composição química dos OEs de pimenta-da-jamaica (*Pimenta dioica* Lindl.), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) e erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.);
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* dos OEs pelo método de DPPH;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos OEs sobre *Staphylococcus coagulase positiva* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Salmonella Choleraesuis* ATCC 10708;
- Analisar a ação antimicrobiana dos OEs no controle de microrganismos na linguiça frescal de frango durante os tempos de 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento a 7°C;
- Monitorar a evolução do pH e rancificação da linguiça frescal de frango nos tempos de 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento a 7°C;
- Analisar a presença dos OEs na linguiça frescal de frango no 21º dia de armazenamento por análise cromatográfica do *headspace*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Plantas medicinais e condimentares

Historicamente, as plantas medicinais e condimentares são utilizadas pela humanidade, sendo amplamente utilizadas nos alimentos, na fabricação de fitoterápicos e nas indústrias farmacêuticas e de perfumaria (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991).

Planta medicinal pode ser definida como a espécie vegetal, cultivada ou não, que seja utilizada com propósitos terapêuticos (BRASIL, 2014). As plantas condimentares são aquelas usadas para realçar as características sensoriais dos alimentos como sabor, aroma e aspecto, e secundariamente com finalidade de conservação (MENDES; RODRIGUES-DAS-DORES; CAMPIDELI, 2015).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética do mundo, com aproximadamente 55 mil espécies vegetais catalogadas de um total estimado entre 350 mil e 550 mil espécies em todo o mundo (PINTO *et al.*, 2002). Dentre essa diversidade de plantas, as plantas condimentares têm ganhado grande destaque, pois além de realçar o sabor e o aroma dos alimentos, apresentam diversas atividades biológicas como atividades antimicrobiana e antioxidante (BURT, 2004). Tal fato têm despertado o interesse na utilização dessas e dos seus OEs no controle da oxidação lipídica e do crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes nos alimentos, a fim de substituir ou diminuir a utilização dos conservantes químicos (GUPTA; SHARMA, 2006; TRAJANO *et al.*, 2009).

3.1.1 Óleos essenciais

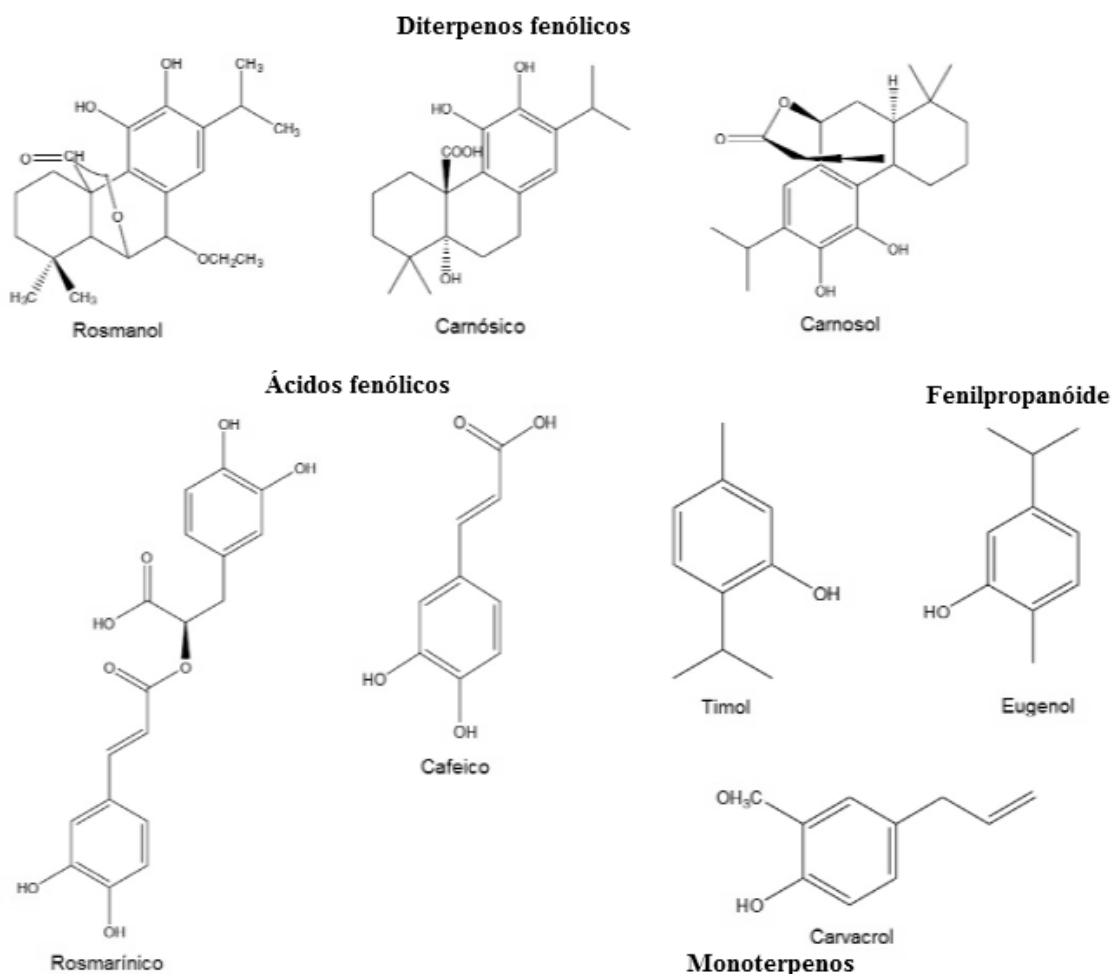
Os OEs são compostos oleosos, voláteis e aromáticos, produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, que podem ser encontrados em diversas partes das plantas como folhas, raízes, rizomas, cascas, caule, flores, frutos e sementes (OUSSALAH; CAILLET; LACROIX, 2007). Existem vários métodos de extração para os OEs, mas geralmente são extraídos mediante destilação por arraste de vapor d'água, hidrodestilação ou a partir do processamento mecânico dos pericarpos de frutos cítricos (BUSATO *et al.*, 2014).

Os OEs são uma mistura complexa de diversas substâncias ativas, entre elas os terpenos, que podem ser formados por duas (monoterpeno), três (sesquiterpenos) ou quatro (diterpenos) unidades de isopreno, e derivados de fenilpropano (ASCENÇÃO; MOUCHREK FILHO, 2013). Tanto os fenilpropanóides quanto os terpenos compreendem o grupo dos compostos fenólicos (AMAROTI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013). Alguns dos componentes fenólicos comuns em alguns OEs estão apresentados na Figura 1.

A composição e a concentração desses compostos podem variar consideravelmente de espécie para espécie e entre plantas de uma mesma espécie vegetal. Essas diferenças podem ocorrer em função do genótipo, localizações geográficas, condições climáticas, período de colheita e tipo de processamento (KERROLA; GALAMBOSI; KALLIO, 1994).

Os efeitos benéficos das plantas estão associados com a constituição desses compostos (LEJA; CZACZYK, 2016). E esses não se encontram na planta em estado puro, mas sob a forma de complexos, cujos diferentes componentes se completam e reforçam a ação no organismo em questão (OETTING, 2005).

Figura 1- Componentes fenólicos de alguns óleos essenciais.



Fonte: Adaptado de DEL RÉ e JORGE, 2012.

Na natureza, os OEs desempenham papel importante na proteção das plantas, pois podem atuar como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também na defesa contra herbívoros. Além de repelir insetos indesejáveis, os OEs podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes, perpetuando a espécie (BAKKALI *et al.*, 2008).

Os OEs têm sido amplamente utilizados nas indústrias farmacêutica, agrônômica, alimentar, sanitária, cosmética e de perfumaria, devido a essas propriedades já observadas na natureza. Atualmente, são conhecidos mais de 3000 OEs, dos quais 300 são comercialmente

importantes, sendo utilizados em perfumes, cremes, sabões, como aditivos e aromatizantes nos alimentos, como fragrâncias para produtos de limpeza domésticos e como remédios naturais (BURT, 2004; BAKKALI *et al.*, 2008).

3.1.1.1 *Eugenia caryophyllata*

Nativo das ilhas Molucas (Arquipélago de Molucas - Indonésia), o cravo-da-índia pertence à família Myrtaceae, conhecido cientificamente pelo nome de *Eugenia caryophyllata* Tumb. No Brasil, é conhecido popularmente como cravo, cravinho, cravo-de-cabecinha, cravogirofle, cravina-de-túnes e rosa-da-índia (CAVALCANTE, 2013).

O craveiro-da-índia é uma planta arbórea de copa alongada, chegando a atingir de 8 a 10 metros de altura. Suas folhas possuem características ovais, aromáticas e tem de 7-11 centímetros de comprimento. Suas flores são pequenas, agrupadas em cachos terminais em um tom verde amarelado seguindo ao tom vermelho, quando apresentam-se melhores para coleta (AFFONSO *et al.*, 2012). O fruto é do tipo drupa, elíptica, semelhante à azeitona com coloração avermelhada, formada por uma parte externa carnosa, em cujo interior se acha um embrião com dois cotilédones (MAEDA *et al.*, 1990).

O cravo-da-índia, constituído pela gema floral seca, é utilizado principalmente como condimento na culinária, devido ao seu marcante aroma e sabor, conferido por um composto fenólico volátil, o eugenol (MAZZAFERA, 2003). É ainda amplamente utilizado para as mais diversas aplicações na produção de alimentos, na indústria farmacêutica, de perfumaria e cosméticos (DANIEL *et al.*, 2009).

Embora os OEs sejam normalmente uma mistura de compostos orgânicos, muitas vezes apresentam um composto majoritário. No extrato bruto do cravo-da-índia, esse componente é o eugenol, possuindo em menores quantidades outros compostos como acetato de eugenila, α -humuleno, β -cariofileno e óxido de cariofileno (AFFONSO *et al.*, 2012).

Além de ser o composto majoritário encontrado no OE de cravo-da-índia, o eugenol é responsável por grande parte das atividades farmacológicas atribuídas à planta, como antiviral, anti-úlceras (MAGAJI *et al.*, 2007), antidiabético e antioxidante (RADHIAH; MOHAMED; MUSTAPHA, 2010), antitumoral (CHAIEB *et al.*, 2007), anestésico e anti-inflamatório (DANEIL *et al.*, 2009), antimicrobiano e inseticida (AFFONSO *et al.*, 2012).

3.1.1.2 *Pimenta dioica*

A pimenta-da-jamaica (*Pimenta dioica* L.) pertence à família Myrtaceae, nativa do Caribe e América Central, é uma árvore aromática de porte médio com folhas pecioladas, elíptico-alongadas, com flores numerosas dispostas em cimeiras axilares. O fruto apresenta-se em forma de baga, globoso, piriforme, contendo uma a duas sementes (PAULA *et al.*, 2010).

O OE da pimenta-da-jamaica pode ser extraído da casca, das folhas e dos frutos (OLIVEIRA *et al.*, 2009). É empregado na aromatização de alimentos e na perfumaria, além de

ser utilizado como fonte de eugenol para produção da vanilina (COSTA, 2000). Segundo Oliveira *et al.* (2009), o composto majoritário encontrado no OE da espécie é o eugenol, com 72,87% a 82,56%. Em trabalho realizado por Padmakumari, Sasidharan e Sreekumar (2011), o composto principal identificado neste OE foi eugenol (74,71%-73,35%), seguido do metil eugenol (4,08%-9,54%) e cariofileno (4,90%-3,30%).

Muitas propriedades biológicas têm sido estudadas e atribuídas à pimenta-da-jamaica, como antigripal (PAULA *et al.*, 2010), analgésica e antipirética (LÓPEZ *et al.*, 1998; ZHANG; LOKESHWAR, 2012), anti-hipertensiva (SUAREZ; ULATE; CICCIO, 2000), antioxidante (PADMAKUMARI, SASIDHARAN E SREEKUMAR, 2011), antimicrobiana e fungicida (ZABKA; PAVELA; SLEZAKOVA, 2009; DIMA *et al.*, 2014).

3.1.1.3 *Varronia curassavica*

A *Varronia curassavica*, anteriormente denominada como *Cordia verbenacea* DC., é uma planta da família Boraginaceae, conhecida popularmente como erva-baleeira. Pode ser encontrada em quase todas as regiões do Brasil, principalmente no litoral brasileiro. É um arbusto perene, ramificado, podendo chegar até 2,5 m de altura, com folhas aromáticas verrucosas, flores pequenas e brancas dispostas em inflorescências terminais, com fruto vermelho quando maduro (ARRIGONI-BLANK *et al.*, 1999).

Os principais componentes da espécie são taninos, mucilagens, flavonoides e OE (CARVALHO JR. *et al.*, 2004). Várias propriedades atribuídas à erva-baleeira vêm dos compostos presentes no OE. Em trabalho realizado por Carvalho Jr. *et al.* (2004), os principais constituintes do OE de erva-baleeira foram α -pineno (29,69%), trans-cariofileno (25,27%) e aloaromadendreno (9,99%). Tendo como compostos minoritários o α -humuleno, espatulenol, β -gurjuneno e o epoxicariofileno.

A erva-baleeira tem sido utilizada na medicina popular há anos como antirreumática, anti-inflamatória, analgésica e por suas propriedades curativas (AKISUE *et al.*, 1983). Com isso, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos com extratos da planta, e esses têm demonstrado a sua diversificada atividade biológica como antiulcerogênica (ROLDÃO *et al.*, 2008), antioxidante (MICHIELIN *et al.*, 2011; SANTI *et al.*, 2014), antimicrobiana (CARVALHO JR. *et al.*, 2004; PIMENTEL *et al.*, 2012) e anti-inflamatória (FERNANDES *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2007; PIMENTEL *et al.*, 2012).

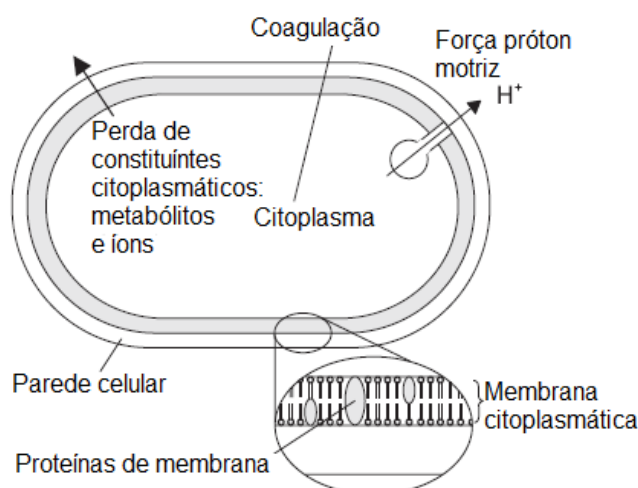
3.2 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

Diversos estudos a respeito das propriedades antimicrobianas dos OEs têm sido realizados, e têm-se demonstrado a capacidade destes no controle de patógenos de origem alimentar (BURT, 2004; TRAJANO *et al.*, 2009; AZERÊDO *et al.*, 2012; QUEIROZ *et al.*, 2014). Além disso, esses estudos têm revelado que a atividade antimicrobiana de OEs pode ser influenciada por vários parâmetros, tais como o tipo, composição, concentração utilizada,

processamento e estocagem do OE. O tipo de microrganismo e meio utilizado para o seu crescimento pode fornecer resultados diferentes quanto às propriedades dos óleos (BURT, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Acredita-se que compostos como timol, eugenol e carvacrol podem causar distorções na estrutura física da célula bacteriana, devido ao seu efeito contra a membrana plasmática. Modificando a sua permeabilidade, o que desestabiliza a força motriz, o fluxo de elétrons e do transporte ativo, a coagulação do conteúdo celular, causando perda de metabólitos e íons (BURT, 2004). Os locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para ação de OEs na célula bacteriana estão ilustrados na Figura 2.

Figura 2- Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para ação de óleos essenciais na célula bacteriana.



Fonte: Adaptado de BURT, 2004.

Os métodos normalmente utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana dos OEs são o método de difusão em disco, difusão utilizando cavidades feitas no ágar, diluição em ágar e diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima, CBM (BURT, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2007; OSTROSKY *et al.*, 2008). Os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados pela NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), no entanto, a metodologia proposta pelo NCCLS não pode ser seguida à risca, devido às diferentes propriedades químicas que os OEs apresentam (BURT, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Diversos trabalhos têm avaliado essa ação *in vitro* dos OEs frente a microrganismos patogênicos (ROCHA *et al.*, 2014; TRAJANO *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2008). Rocha *et al.* (2014), utilizando o método de macrodiluição em caldo, testaram a atividade antimicrobiana do OE de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) sobre cepas patogênicas. Observaram que o óleo apresentou efeito bactericida sobre todas as estirpes testadas, sendo necessárias concentrações de 15 $\mu\text{L mL}^{-1}$, 120 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 120 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para eliminar totalmente células de

Staphylococcus aureus, *Salmonella Choleraesuis* e *Escherichia coli*, respectivamente. Trajano *et al.* (2009), verificaram eficiência dos OEs de cravo (*Eugenia caryophyllata*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*) na inibição dez diferentes cepas bacterianas pelo método de difusão em meio sólido.

Pereira *et al.* (2008) avaliando o efeito inibitório de alguns óleos vegetais pelo método de difusão em ágar, verificaram que os OEs de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Origanum vulgare* (orégano) e *Eugenia caryophyllata* (cravo) apresentaram efeito inibitório frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, no entanto, *Eugenia caryophyllata* apresentou melhor formação de halo de inibição nas menores concentrações testadas. Oussalah, Caillet e Lacroix (2007), utilizando o método de difusão em ágar, avaliaram a atividade antibacteriana de vinte e oito OEs sobre as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*. Verificaram que os óleos mais ativos frente às bactérias testadas foram *Coridothymus capitatus* (orégano espanhol), *Cinnamomum cassia* (canela cássia), *Origanum heracleoticum* (orégano verde), *Satureja montana* (segurelha), e *Cinnamomum verum* (canela).

3.3 Atividade antioxidante de óleos essenciais

3.3.1 Oxidação Lipídica

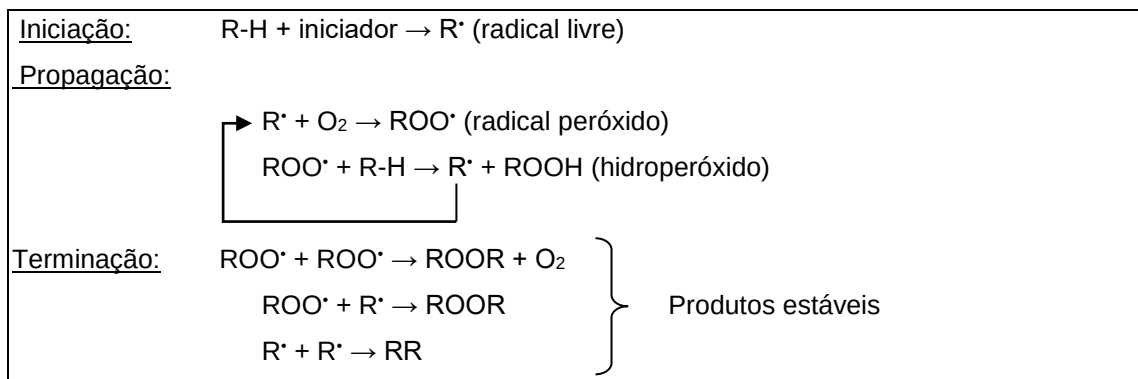
A oxidação lipídica é uma das principais causas de deterioração dos alimentos, responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, pode provocar alterações que afetam não só a qualidade nutricional, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de substâncias tóxicas (OSAWA *et al.*, 2005).

A oxidação de lipídios pode ocorrer por meio de vários processos, como reações hidrolíticas, oxidação enzimática, fotoxidação e auto-oxidação. A auto-oxidação é o principal mecanismo que acometem as carnes e derivados, em razão da composição rica em ácidos graxos insaturados e íons ferro, de processamentos utilizados como cocção e moagem, além do uso de cloreto de sódio, reconhecido catalisador desta reação (ROCHA GARCIA *et al.*, 2002).

A auto-oxidação é uma reação complexa induzida por oxigênio na presença de catalisadores tais como calor, radicais livres, luz, pigmentos e íons metálicos (LAGUERRE *et al.*, 2007) e ocorre através de três etapas início, propagação e término (Figura 3) (RAMALHO; JORGE, 2006). A oxidação inicia-se quando um átomo de hidrogênio é retirado da instauração da molécula de ácido graxo (R-H), formando um radical livre, R[•] (Figura 3). Os radicais livres que são prontamente susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico, são convertidos em outros radicais (ROO[•]), que atraem átomos de hidrogênio a partir de outra molécula lipídica produzindo outro radical livre (formando os peróxidos e hidroperóxidos). Esse processo é chamado de propagação de cadeia. A reação em cadeia termina quando dois radicais livres se combinam, formando produtos estáveis (ROOR) (VENKATARAMAN; SCHAFER; BUETTNER,

2004; RAMALHO; JORGE, 2006). Outras substâncias podem ser geradas durante o processo de auto-oxidação como álcoois, ácidos, hidrocarbonetos e cetonas (ARAÚJO, 1999).

Figura 3- Mecanismo da auto-oxidação lipídica.



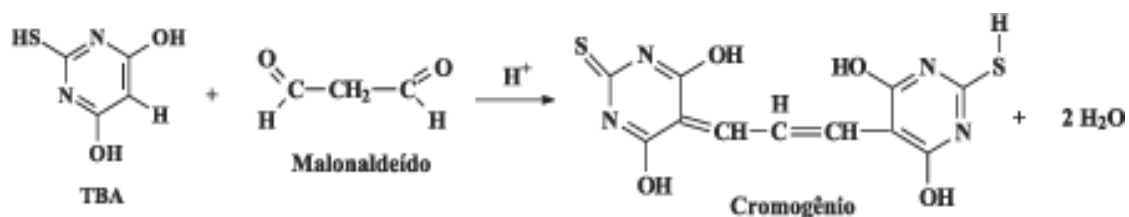
Fonte: adaptado de RAMALHO e JORGE, 2006.

Esse mecanismo de oxidação pode ocorrer tanto nos tecidos animais quanto vegetais e nos produtos obtidos a partir destes como óleos e gorduras (DEL RÉ; JORGE, 2012). Nos produtos cárneos, a oxidação lipídica e dos pigmentos inicia-se após o abate, quando a ação antioxidante do tecido cárneo se encontra limitada pelo término do fluxo sanguíneo. Dessa forma, os lipídeos tornam-se mais susceptíveis à ação dos radicais livres e das espécies reativas do oxigênio. As alterações bioquímicas que acompanham a conversão do músculo em carne favorecem o processo de oxidação na fração mais insaturada de fosfolipídios nas membranas subcelulares, onde o balanço entre os fatores pró-oxidativos e a capacidade antioxidativa não está controlado, favorecendo a oxidação lipídica (MORRISSEY *et al.*, 1998).

Atualmente, o método mais utilizado na avaliação da oxidação lipídica em carnes e derivados é o teste de TBARS (substâncias reativas ao ácido 2- tiobarbitúrico). Esse teste quantifica o malonaldeído (MDA), um dialdeído de três átomos de carbono, com grupos carbonilas nos carbonos um e três. O MDA é um dos principais produtos da decomposição dos hidroperóxidos, que são formados a partir da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (LIMA JR. *et al*, 2013). A reação ocorre a partir da interação do ácido 2-tiobarbitúrico com o malonaldeído presente na amostra (Figura 4), produzindo um complexo de cor vermelha, que é medido espectrofotometricamente no comprimento de onda de 500 a 550 nm. Os resultados normalmente são expressos em mg de MDA por kg de amostra (OSAWA *et al.*, 2005).

Para reduzir ou retardar a oxidação lipídica e aumentar a vida de prateleira de produtos cárneos, várias tecnologias vêm sendo desenvolvidas e utilizadas como embalagens a vácuo, atmosfera modificada e os antioxidantes (LIMA JR. *et al*, 2013).

Figura 4- Reação do teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído.



Fonte: OSAWA *et al.*, 2005.

3.3.2 Antioxidantes

Os antioxidantes podem ser definidos como compostos que, presentes em baixas concentrações, podem atrasar ou inibir a oxidação dos lipídios, proteínas e nucleotídeos por suprimir a iniciação de reações em cadeia de oxidação (GUPTA; SHARMA, 2006; TACHAKITTIRUNGROD; OKONOJI; CHOWWANAPHOONPOHN, 2007).

A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres e são empregados tanto nas indústrias de alimentos, cosméticos e bebidas, como também na medicina (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os antioxidantes podem ser classificados em sintéticos ou naturais. Dentre os antioxidantes sintéticos mais utilizados podemos citar o Butil-hidroxianisol (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT), Terc-butilhidroquinona (TBHQ) e o Propil Galato (PG) (HUANG *et al.*, 2011). Os antioxidantes naturais são substâncias bioativas que podem ser extraídas de vegetais e plantas e apresentam baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos (SADGHI *et al.*, 2015). Como exemplo de antioxidantes naturais podem ser citados os organosulfurados, compostos fenólicos e terpenos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes sintéticos são muito utilizados para o processamento industrial de alimentos, a fim de prolongar a estabilidade de armazenamento desses produtos. No Brasil, a Portaria nº 1004 de 11 de dezembro de 1998 regula a utilização de aditivos como antioxidantes nos produtos cárneos. Essa portaria permite a utilização dos antioxidantes sintéticos como o BHA, BHT e PG em alguns produtos cárneos industrializados na quantidade de 0,01 g/100g de produto. Não sendo autorizada a adição destes em carnes frescas e congeladas *in natura* (BRASIL, 1998).

Porém, aspectos toxicológicos e efeitos carcinogênicos tem sido uma preocupação ao empregar estes componentes (GHARAVI *et al.*, 2007; HONORATO *et al.*, 2013). Além disso, ultimamente a rejeição dos consumidores em geral por aditivos alimentares sintéticos tem aumentado. Assim, a procura de compostos naturais eficazes, com atividade antioxidante e não tóxicos tem sido intensificada nos últimos anos (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007).

A procura por antioxidantes naturais, em geral contidos em óleos ou extratos de plantas tem caracterizado a pesquisa de alternativas aos antioxidantes sintéticos. Dentre os vários tipos de antioxidantes naturais podem ser citados os polifenóis, constituídos de ácidos fenólicos

e flavonoides, substâncias bioativas de grande ocorrência em vegetais. Essas substâncias podem apresentar diferentes compostos, em quantidades variadas e com diferentes atividades antioxidantes, podendo ser encontradas nos frutos, sementes, folhas e raízes de plantas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SOUSA, *et al.*, 2007).

A determinação da atividade antioxidante desses extratos e substâncias isoladas é realizada por meio de vários métodos, mas o método mais utilizado consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), de coloração púrpura, que absorve no comprimento de onda de 515-517 nm. Contudo, a percentagem da atividade antioxidante equivale à quantidade de consumo do DPPH^{*} pelo antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

Vários autores têm demonstrado as atividades antioxidantes de diversas ervas e especiarias como alecrim e louro (OLMEDO; ASENSIO; GROSSO, 2015), com propriedades atribuídas aos compostos fenólicos; orégano (SARIKURKCU *et al.*, 2015; OLMEDO; ASENSIO; GROSSO, 2015), rico em antioxidantes fenólicos, tendo como principais componentes o carvacrol, timol, e γ -terpineno; manjerição, caracterizado principalmente pela presença de linalol e 1.8-cineol (LUZ *et al.*, 2009; CICHOSKI *et al.*, 2011) e erva mate, que possui compostos como polifenóis, flavonoides, saponinas e xantinas (BRACESCO *et al.*, 2010).

3.4 Carne de frango e linguiça

3.4.1 Mercado da carne de frango

A carne de frango é uma importante fonte de proteínas de alto valor biológico, presente na dieta alimentar de quase todos os países, em razão do constante crescimento na produção e do baixo custo (VOILA; TRICHES, 2015). No Brasil, o consumo de carne de aves é consideravelmente maior do que o de carne bovina e suína, sendo que no ano de 2015 esse consumo foi de 43,25 kg por pessoa (ABPA, 2016).

Devido aos investimentos em qualidade e os grandes avanços da pesquisa no desenvolvimento de novas tecnologias, a avicultura brasileira vem desempenhando importante papel na economia (VOILA; TRICHES, 2015). Em 2015, a segunda maior produção de carne de frango foi a brasileira, com 13,1 milhões de toneladas, ficando atrás apenas dos EUA, com produção de 17,9 milhões de toneladas. O Brasil mantém-se, desde 2004, na posição de maior exportador de carne frango. No ano de 2015 as exportações renderam US\$ 7,2 bilhões e foram embarcadas 4,3 milhões de toneladas. Essa produção está concentrada na região sul do País, sendo o Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul responsáveis, em 2015, por 62,83% da produção e 76,66% das exportações nacionais (ABPA, 2016).

Nos últimos anos, a avicultura brasileira tem-se destacado também pelo aumento na exportação de produtos embalados e prontos para o consumo, ou seja, com alto valor agregado. Esses produtos são vendidos com um conceito de alimentos saudáveis e de rápido

preparo, o que faz com que sejam mais atraentes e cada vez mais procurados no exterior (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2009).

3.4.2 Linguiça

Para manter a qualidade e provisão dos alimentos por um tempo maior, desde a antiguidade, os homens desenvolveram várias técnicas de conservação (OLIVEIRA; ARAÚJO; BORG, 2005), sendo a linguiça uma das formas mais antigas de conservação das carnes (MILANI *et al.*, 2003).

A Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define linguiça como o 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 ao processo tecnológico adequado (BRASIL, 2000).

Ainda de acordo com a IN nº 4, as linguiças podem ser classificadas, de acordo com a tecnologia de fabricação, em produto fresco, seco, curado e/ou maturado e cozido. Os ingredientes obrigatórios na formulação são carnes de diferentes espécies de animais de açougue e sal. Como ingredientes opcionais podem ser adicionados gordura, água, proteína vegetal e, ou, animal; açúcares, plasma, aditivos, aromas, especiarias e condimentos (BRASIL, 2000). Dentre os produtos cárneos embutidos, a linguiça do tipo frescal se destaca por sua grande aceitação e comercialização (OLIVEIRA; ARAÚJO; BORG, 2005).

A fabricação da linguiça frescal de frango apresenta grandes desafios, uma vez que a carne utilizada é moída, o que favorece o desenvolvimento de microrganismos e da oxidação lipídica, já que a superfície de exposição é aumentada, além de apresentar elevada atividade de água e não passar por nenhum tratamento térmico, fatores os quais acarretam em uma vida-útil curta (MILANI *et al.*, 2003).

A contaminação de carcaças de frango tem importantes implicações na vida de prateleira dos produtos e para a segurança do consumidor. Mesmo com os avanços tecnológicos e métodos de conservação, a carne de frango ainda é passível de contaminação bacteriana (CARVALHO; CORTEZ, 2005). Além disso, por possuir elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, a carne de frango é altamente susceptível à oxidação lipídica durante o processamento e armazenamento, o que desencadeia a formação de sabores e odores desagradáveis, com perda de qualidade (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2009).

Devido a esses fatores, a fabricação desses produtos cárneos requer a adição de conservantes, como os antioxidantes e sais de cura, que têm como função retardar a degradação lipídica e o crescimento de microrganismos, auxiliando na conservação da textura, sabor e cor por período maior, garantindo qualidade durante o armazenamento.

3.5. Parâmetros microbiológicos para linguiças

A elaboração dos embutidos frescais requer uma série de etapas de manipulação, o que aumenta as possibilidades de contaminação do produto por microrganismos deteriorantes e patogênicos (MARQUES *et al.*, 2006). Diversas podem ser as fontes desses microrganismos, como condições inadequadas de abate e evisceração, equipamentos/utensílios contaminados e higiene deficiente por parte dos manipuladores (CHEVALLIER *et al.*, 2006). Além de procedimentos higiênicos adequados na fabricação desses produtos, a condição microbiológica inicial da carne utilizada é de grande importância para garantir qualidade do produto final.

Segundo Forsythe (1999), os patógenos envolvidos na maioria das toxinfecções alimentares, tais como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, Clostrídio Sulfito Redutor e *Staphylococcus* coagulase positivo estão entre os principais microrganismos encontrados em produtos cárneos e de aves. A presença desses agentes nos produtos cárneos pode constituir sérios riscos à saúde dos consumidores, se tornando um grande problema de saúde pública.

Embora diversos microrganismos patogênicos possam ser veiculados por linguiças tipo frescal, a Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), prevê para embutidos frescais (linguiça crua e similares) apenas a análise de *Salmonella* sp., *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes a 45°C e Clostrídios sulfito redutores. Os padrões microbiológicos para embutidos frescais estabelecidos pela RDC nº 12/01 da ANVISA podem ser visualizados na Tabela 1 (BRASIL, 2001).

Tabela 1- Padrões microbiológicos máximos para embutidos frescais estabelecidos pela RDC nº 12/01 da ANVISA.

Microrganismos	Parâmetro
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência em 25 g
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	5 x 10 ³ UFC/g
Coliformes a 45°C	5 x 10 ³ NMP/g
Clostrídios sulfito redutores	3 x 10 ³ NMP/g

3. 5.1 Salmonella sp.

Salmonella sp. são bactérias entéricas que pertencem à família *Enterobacteriaceae* e tem como principal hábitat o trato intestinal de homens e animais. São bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos e multiplicam-se bem em pH próximo à neutralidade, atividade de água (Aw) mínima de 0,94 e temperatura na faixa de 35°C a 43°C (JAY, 2005; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

O gênero *Salmonella* agrupa atualmente apenas duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A maioria dos sorovares de importância médica integra a espécie *S. enterica* (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008), que é subdividida em seis subespécies: *enterica*,

salamae, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (JAY, 2005). A *Salmonella* é frequentemente associada a surtos de toxinfecções alimentares, veiculadas principalmente por ovos e carnes de aves, sendo que a presença dessa bactéria na carne depende das condições de manejo dos animais durante a criação e das práticas higiênicas adotadas durante o abate e manipulação das carcaças (CARVALHO; CORTEZ, 2005).

3.5.2 *Staphylococcus* coagulase positiva

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Microcacea*, são cocos Gram-positivos, aeróbias ou anaeróbias facultativas e não formadoras de esporos, com diâmetro variando de 0,5 a 1,5 μm (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008). O gênero *Staphylococcus* inclui mais de 30 espécies, mas somente 18 delas apresentam real e potencial interesse em alimentos (JAY, 2005). Entre essas espécies, *Staphylococcus aureus* é a mais prevalente em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

S. aureus é uma das espécies de maior interesse para saúde pública, devido à sua alta prevalência e risco de produção, nos alimentos contaminados, de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares (ZECCONI; HAHN, 2000; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008), sendo geralmente, encontrada na pele e mucosas de homens e animais (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

De acordo com Marques, Martins e Cunha Neto (2006), *S. aureus* produz uma série de enzimas, tais como a coagulase, catalase, sedoxirribonuclease (DNase), lipase e termonuclease (TNase) que podem contribuir para a sua patogenicidade, bem como uma toxina hemolítica, cuja produção está associada com sua virulência. *Staphylococcus* são divididos em *Staphylococcus* coagulase positiva (CPS) e *Staphylococcus* coagulase-negativos (CNS) com base na capacidade para coagular plasma de coelho.

Staphylococcus aureus, geralmente é coagulase-positivo embora as estirpes coagulase-negativos de *S. aureus* possam ocorrer (Pereira *et al.* 2011). A enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva tem por objetivo substituir a determinação de *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2001).

3.5.3 Coliformes a 45°C

O grupo de bactérias denominadas coliformes termotolerantes é formado pelo gênero *Escherichia*, juntamente com os gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (SILVA; JUNQUEIRA, 1995). Possui como principal habitat o trato intestinal de homens e animais de sangue quente, no entanto, *Klebsiella* e *Enterobacter* podem ser encontradas em outros ambientes, como vegetais e solo (SOUZA, 2006).

Os coliformes podem ser divididos em dois grupos: coliformes totais e coliformes a 45°C. Coliformes a 45°C são os coliformes capazes de se desenvolver e fermentar a lactose com produção de gás à temperatura de 45 °C em 24 a 48h. O principal representante desse grupo é

Escherichia coli, sendo que alguns coliformes do gênero *Klebsiella* e *Enterobacter* também podem apresentar essa característica (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006). Assim, não é correta a relação direta da presença de coliformes a 45°C em alimentos e água com contaminação de origem fecal, o que levou à alteração da denominação de coliformes fecais para coliformes a 45°C na legislação brasileira (BRASIL, 2001).

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, não formadora de esporos, aeróbia ou anaeróbia facultativa, pertencente ao grupo dos coliformes termotolerantes, capaz de fermentar a lactose, com produção de ácido e gás quando incubadas a 45 °C (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008). É um microrganismo mesófilo, que cresce em temperaturas variando de 7 °C a 10°C até 50°C e Aw mínima de 0,95 (ADAMS; MOSS, 1997).

São reconhecidos cinco grupos virulentos de *E. coli*, classificados com base nas características das doenças, no mecanismo de patogenicidade e nos grupos sorológicos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) – comumente conhecida como causadora da diarreia dos viajantes; *E. coli* enteropatogênica (EPEC) – causadora da diarreia aquosa em crianças; *E. coli* êntero-hemorrágica (EHEC) – causa diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica e púrpura trombótica e pode evoluir para sintomas clínicos com risco de morte. Como representante desse grupo temos a *E. coli* O157:H7; *E. coli* enteroagregativa (EAEC) – causa diarreia aquosa persistente durante mais de 14 dias; *E.coli* enteroinvasiva (EIEC) – causadora de febre e diarreia profusa contendo muco e sangue (JAY, 2005; LEE *et al.*, 2009).

E. coli têm como hábitat natural o trato intestinal de homens e de animais. Sua presença nos alimentos indica contaminação direta ou indireta de origem fecal e está relacionada principalmente a condições higiênicas deficientes no processamento dos alimentos (JAY, 2005).

3.6 Aplicação de óleos essenciais em produtos cárneos

Recentemente, muitas pesquisas têm sido realizadas com a utilização de OEs para prolongar a vida útil da carne e dos produtos à base de carne. Tem-se comprovado que são passíveis de utilização nestes alimentos (GAIO *et al.*, 2015; SHARAFATI-CHALESHTORI *et al.*, 2015; ZENGİN; BAYSAL, 2015).

Vários compostos presentes nos OEs foram aprovados pela Comissão Europeia para utilização nos alimentos, por não apresentarem qualquer risco à saúde do consumidor. Dentre eles temos o carvacrol, carvona, cinamaldeído, citral, p-cimeno, eugenol, mentol, limoneno e timol. A *Food Drug and Administration* (FDA) classificou essas substâncias como seguras (GRAS, *Generally Recognized As Safe*), ou como aditivo alimentar aprovado (BURT, 2004).

Um dos grandes problemas da utilização dos OEs nos alimentos é a alteração nas características sensoriais. A maioria dos óleos apresenta compostos com aroma extremamente acentuado, como eugenol, timol e carvacrol, o que dificulta sua adição em grandes concentrações no alimento (MADSEN; BERTELSEN; SKIBSTED, 1997), limitando seu uso

(OETTING, 2005). Em alguns casos, é necessária a aplicação de altas concentrações do óleo no alimento para atingir o efeito antimicrobiano e antioxidante desejado (SMITH *et al.*, 2005), visto que, em alguns estudos tem-se registrado baixos efeitos antimicrobianos nos alimentos se comparado aos resultados obtidos nos testes *in vitro* (SHARAFATI-CHALESHTORI *et al.*, 2015). Isso ocorre porque muitos componentes presentes nos alimentos, tais como lipídeos, proteínas, carboidratos e água, reduzem a eficiência dos OEs (WEISS *et al.*, 2015).

Segundo Lemay *et al.* (2002), a aplicação dos OEs nos produtos cárneos não seria tão limitante quanto para outros tipos de alimentos, uma vez que ervas e especiarias são frequentemente utilizadas para conferir sabores típicos a esses produtos.

Gaio *et al.* (2015) avaliaram o efeito antibacteriano do OE de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) em salsicha tipo italiana durante 28 dias de armazenamento e verificaram que o óleo apresentou influência positiva na redução ($0,4 \text{ Log}_{10} \text{ UFC g}^{-1}$) da contagem de *Staphylococcus aureus* até o 14º dia de armazenamento, sendo o valor da CIM de $0,75 \text{ mg g}^{-1}$. Em outro trabalho, a aplicação do OE de manjerição em hambúrguer de carne bovino também resultou na redução da taxa de crescimento de *S. aureus*, porém, não apresentou capacidade em reduzir a oxidação lipídica no produto. Além disso, o hambúrguer adicionado de 0,125% de OE de manjerição apresentou boa aceitação sensorial (SHARAFATI-CHALESHTORI *et al.*, 2015).

Zengin e Baysal (2015), estudando a aplicação dos OEs de tomilho e cravo em carne picada armazenada a 4 °C, verificaram que os tratamentos com os óleos restringiram o crescimento de *Salmonella typhimurium* inoculada artificialmente e apresentaram notável atividade antioxidante, sendo o óleo de cravo o mais eficiente.

Pirbalouti, Rahimi e Moosavi (2010) avaliaram o efeito antimicrobiano dos OEs de tomilho (*Thymus daenensis*), timbra (*Thymbra spicata*) e satureja (*Satureja bachtiarica*) contra *Listeria monocytogenes* em salsichas de frango armazenadas a 4 °C durante 14 dias. Verificaram que as aplicações de 1% dos OEs reduziram significativamente as contagens de *L. monocytogenes* após sete e 14 dias de armazenamento quando comparado ao controle.

Fратиanni *et al.* (2010) estudaram o efeito dos OEs de tomilho e bálsamo em carne de peito frango armazenadas a 4 °C durante três semanas. Os resultados mostraram que os dois OEs apresentaram efeito antioxidante, ajudando a preservar a carne mesmo após duas semanas de armazenamento. Além disso, diminuíram a microflora natural presente na carne, reduzindo pela metade o conteúdo microbiano total em comparação com as amostras controle. O óleo de bálsamo limitou significativamente o crescimento de *Salmonella* sp. e o óleo de tomilho o crescimento de *Escherichia coli*. Demonstrando que os dois óleos foram eficazes na inibição microbiana e na redução dos processos oxidativos, prolongando a vida de prateleira da carne de frango.

REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual 2016**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2016>>. Acesso em: 07 de março de 2017.
- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1997. 464 p.
- AFFONSO, R. S. *et al.* Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.
- AKISUE, M. K. *et al.* Caracterização farmacognóstica da droga e da tintura se *Cordia verbenácea* D.C.—Boraginacea. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 5, p. 69–82, 1983.
- AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI. Antioxidant Activity of Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 10835–10847, 2013.
- ANDRADE, M. A. *et al.* Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- ARRIGONI-BLANK, M. F. *et al.* Adubação química e calagem em erva-baleeira. **Horticultura Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 211-215, 1999.
- ASCENÇÃO, V. L.; MOUCHREK FILHO, V. E. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Caderno de Pesquisa**, v. 20, n. especial, 2013.
- ARAÚJO, J. M. A. Química de alimentos: teoria e prática. 2a.ed. Viçosa: UFV; 1999.
- AZERÊDO, G. A. *et al.* The cytotoxic effect of essential oils from *Origanum vulgare* L. and/or *Rosmarinus officinalis* L. on *Aeromonas hydrophila*. **Food Borne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 4, p. 298-304, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiça. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998. Regulamento Técnico: Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 02, p. 446-475, 2008.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

- BOTTERWECK, A. A. M. *et al.* Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food Chemistry and Toxicology**, v.38, n.7, p.599-605, 2000.
- BRACESCO, N. *et al.* Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378- 384, 2010.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- BUSATO, N. V. *et al.* Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1574-1582, 2014.
- CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L. Salmonella spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1465-1468, 2005.
- CARVALHO JR., P. M. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 297–301, 2004.
- CAVALCANTE, R. **Fitodontologia**. Rio Branco, AC: Ed. Do autor, 2013. 269 p.
- CHAIEB, K. *et al.* The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 6, p. 501–506, 2007.
- CHEVALLIER, I. *et al.* Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. **Food Control**, v. 17, n. 6, p. 446-53, 2006.
- CICHOSKI, A. *et al.* Lipid and protein oxidation in the internal part of Italian type salami containing basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 436-442, 2011.
- COSTA, P. R. R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**, v. 23, p. 357-369, 2000.
- DANIEL, A. N. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities A of eugenol essential oil in experimental animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1b, 2009.
- DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.
- DIMA, C. *et al.* Microencapsulation of essential oil of pimento [*Pimenta dioica* (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 22, p. 203-211, 2014.
- FERNANDES, E. S. *et al.* Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–236, 2007.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.
- FRATIANNI, F. *et al.* Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 8, p. 528-535, 2010.
- GAIO, I. *et al.* Antibacterial activity of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) in Italian-type sausage. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 10, n. 4, p. 323-329, 2015.

- GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos**: Princípios e aplicações. São Paulo: Nobel, 2008. 511 p.
- GHARAVI, N.; HAGGARTY, S.; EL-KADI, A. O. Chemo protective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. **Current Drug Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2007.
- GUPTA, V. K.; SHARMA, S. K. Plant as natural antioxidants. **Natural Product Radiance**, v. 5, n. 4, p. 326-334, 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed.; Oxford University Press: Oxford, 2007.
- HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.
- HONORATO, T. C. et al. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde**, v. 8, n. 5, p. 01 - 11, 2013.
- HUANG, B. et al. Antioxidant activity of bovine and porcine meat treated with extracts from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot and leaf. **Meat Science**, Barking, v. 87, n. 1, p. 43-56, 2011.
- JAYASENA, D. D.; JO, C. Potential application of essential oils as natural antioxidants in meat and meat products: a review. **Food Reviews International**, v. 30, n. 1, p. 71–90, 2014.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 668 p.
- KERROLA, K.; GALAMBOSI, B.; KALLIO, H. Volatile components and odor intensity of four phenotypes of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 776-781, 1994.
- KRISHNAN, K. R. et al. Bio protection and preservation of raw beef meat using pungent aromatic plant substances. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2456–2463, 2014.
- LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, n. 5, p. 244-282, 2007.
- LEE, G. Y. et al. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. **International Journal of Food Microbiology**. v.134, n. 3, p.196-200, 2009.
- LEJA, K. B.; CZACZYK, K. The industrial potential of herbs and spices - a mini review. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 15, n. 4, p. 353-365, 2016.
- LIMA JÚNIOR, D. M. et al. Oxidação Lipídica e qualidade da carne ovina. **Acta Veterinária Brasilica**, v.7, n.1 p.14-28, 2013.
- LÓPEZ, A. B.; CAPÓ, J. T.; GONZÁLEZ, Y. C. Actividad analgésica y antipirética de un extracto fluido de *Pimenta dioica* L. y evaluación de su toxicidad aguda oral. **Revista Cubana Farmacia**, v. 32, n. 3, p. 198-203, 1998.
- LUZ, J. M. Q. et al. Teor, rendimento e composição química do óleo essencial de manjerição sob doses de cama de frango. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 349-353, 2009.
- MAEDA, J. A. et al. Craveiro-da-índia: características físicas das sementes e seus efeitos na germinação e desenvolvimento vegetativo. **Bragantia**, v. 49, n. 1, p. 23-36, 1990.

- MAGAJI, R. A. *et al.* Anti-ulcerogenic and anti-secretory activity of the N-butanol portion of *Syzygium aromaticum* in rat. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 119 – 126, 2007.
- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Revista Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.
- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.68, n.1, p. 1-11, 2009.
- MARQUES, A. C. *et al.* Formação de toxinas durante o processamento de alimentos e as possíveis consequências para o organismo humano. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 2, p. 283-293, 2009.
- MARQUES, S.; *et al.* Avaliação higiênico-sanitária de linguiças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1120-1123, 2006.
- MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 231-238, 2003.
- MENDES, G. M.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; CAMPIDELI, L. C. Avaliação do teor de antioxidantes, flavonoides e compostos fenólicos em preparações condimentares. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 2, 297-304, 2015.
- MICHIELIN, E. M. Z. *et al.* Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by different methods. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 1, p. 89–96, 2011.
- MILANI, L. I. G. *et al.* Bioproteção de linguiça de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 161-166, 2003.
- MOREIRA, M. R. *et al.* Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 5, p. 565 – 570, 2005.
- MORRISSEY, P. A. *et al.* Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, v. 49, n. 1, p. 73-86, 1998.
- NASCIMENTO, P. F. C. *et al.* Antimicrobial activity of the essentials oils: a multifactor approach of the methods. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 1, p.108-113, 2007.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**: Norma Aprovada. 6ª ed. Norma NCCLS M7-A6; 2003.
- OETTING, L. L. **Extratos vegetais como promotores do crescimento de leitões recém-desmamados**. 2005. 66 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- OLIVEIRA, M. J.; ARAÚJO, W. M. C.; BORGIO, L. A. Quantificação de nitrato e nitrito em linguiças do tipo frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 736-742, 2005.
- OLIVEIRA, R. A. *et al.* Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

OLMEDO, R. H.; ASENSIO, C. M.; GROSSO, N. R. Thermal stability and antioxidant activity of essential oils from aromatic plants farmed in Argentina. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 21-28, 2015.

OSAWA, C. C. *et al.* Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

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

PADMAKUMARI, K. P.; SASIDHARAN, I.; SREEKUMAR, M. M. Composition and antioxidant activity of essential oil of pimento (*Pimenta dioica* (L) Merr.) from Jamaica. **Natural Product Research**, v. 25, n. 2, p. 152-160, 2011.

PASSOS, G. F. *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 323–333, 2007.

PAULA, J. A. M. *et al.* Gênero *Pimenta*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.12, n.3, p.363-379, 2010.

PEREIRA, A. A. *et al.* Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 887-893, 2008.

PEREIRA, U. P. *et al.* Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. *Veterinary Microbiology*, v. 148, p. 117-124, 2011.

PIMENTEL, S. P. *et al.* Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 224, 2012.

PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, Supl.1, p. 45-61, 2002.

PIRBALOUTI, A.; RAHIMI, E.; MOOSAVI, S. Antimicrobial activity of essential oils of three herbs against *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Acta Agriculturae Slovenica**, v. 95, n. 3, p. 219-223, 2010.

QUEIROZ, M. R. A. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, supl. I, p. 737-743, 2014

RADHIAH, S.; MOHAMED, S.; MUSTAPHA, N. M. Cloves protect the heart, liver and lens of diabetic rats. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1116–1121, 2010.

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

ROCHA, C. R. *et al.* Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. como sanitizante natural para controle de bactérias sésseis em superfície utilizada para corte de alimentos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 4, p. 338-344, 2014.

ROCHA GARCIA, C. E. *et al.* Antioxidantes utilizados na indústria cárnea: quais são os aditivos inibidores da rancidez nos produtos cárneos. **Revista Nacional da Carne**, v. 26, n. 299, p. 36-51, 2002.

ROLDÃO, E. F. *et al.* Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 94-98, 2008.

SADGHI, Z. *et al.* Antioxidant activity and total phenolic content of *Boerhavia elegans* (choisy) grown in Baluchestan, Iran. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2015.

SANTI, M. M. *et al.* Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.16, n.2, p.256-261, 2014.

SANTOS, J. C. *et al.* Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1557-1564, 2011.

SARIKURKCU, C. *et al.* Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 178-184, 2015.

SHARAFATI-CHALESHTORI, R. *et al.* Antioxidant and antibacterial activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil in beef burger. **Journal of Agricultural Science & Technology**, v. 17, n. 4, p. 817-826, 2015.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C em comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Food Science Technology**, v. 26, n. 2, p. 352-359, 2006.

SMITH, R. L. *et al.* A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food; essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 245-363, 2005.

SOUSA, C. M. M. *et al.* Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

SOUSA, C. P. Food security and food-borne diseases: utilization of the coliform group as one indicator of food quality. **Revista APS**, v.9, p. 83-88, 2006.

SUAREZ, A.; ULATE, G.; CICCIO, J. F. Hypotensive action of an aqueous extract of *Pimenta dioica* (Myrtaceae) in rats. **Revista de Biologia Tropical**, v. 48, n. 1, p. 53-58, 2000.

TAJKARIMI, M. M. *et al.* Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, 2010.

TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOGI, S.; CHOWWANAPONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 381-388, 2007.

TRAJANO, V. N. *et al.* Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

VENKATARAMAN, S.; SCHAFER, R. Q.; BUETTNER, G. R. Detection of lipid radicals using EPR. **Antioxid Redox Signaling**, v. 6, p. 631-638, 2004.

VOILA, M.; TRICHES, D. A cadeia de carne de frango: uma análise dos mercados brasileiro e mundial de 2002 a 2012. **Teoria e Evidência Econômica - Ano 21**, n. 44, p. 126-148, 2015.

WEISS, J. *et al.* The antimicrobial paradox: Why preservatives lose activity in food. **Current Opinion in Food Science**, v. 4, p. 69-75, 2015.

ZABKA, M.; PAVELA, R.; SLEZAKOVA, L. Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 2, p. 250-253, 2009.

ZHANG, L.; LOKESHWAR, B. L. Medicinal Properties of the Jamaican Pepper Plant *Pimenta dioica* and Allspice. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 14, p. 1900-1906, 2012.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. Bulletin of **International Dairy Federation**, v. 345, p. 15-18, 2000.

ZENGİN, H. BAYSAL, A. H. Antioxidant and antimicrobial activities of thyme and clove essential oils and application in minced beef. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, N. 6 p. 1261-1271, 2015.

4 ARTIGOS

4.1 Artigo 1 - Caracterização química e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de *Pimenta dioica* Lindl., *Varronia curassavica* Jacq. e *Eugenia caryophyllata* Thunb.

Este artigo foi elaborado conforme normas da revista Ciência e Agrotecnologia.

CHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ESSENTIAL OILS OF *Pimenta dioica* Lindl., *Varronia curassavica* Jacq. AND *Eugenia caryophyllata* Thunb.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Pimenta dioica* Lindl., *Varronia curassavica* Jacq. e *Eugenia caryophyllata* Thunb.

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils (OEs) of *Pimenta dioica*, *Varronia curassavica* and *Eugenia caryophyllata*. The chemical components of the EOs were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and the antioxidant activity evaluated by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) method. The antimicrobial activity of the oils against the standard strains of *Salmonella Choleraesuis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus coagulase positive* oils was determined by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) by the broth dilution method. The major constituents in *P. dioica* EO were eugenol (44,9%), α -pinene (21,0%), limonene (10,1%) and chavicol (7,5%), in the EO of *V. curassavica* were identified α -pinene (56,1%), β -caryophyllene (13,5%), eucalyptol (3,3%) and α -tujene (3,2%) and *E. caryophyllata* the majorities were eugenol (85,5%), eugenyl acetate (8,9%) and β -caryophyllene (3,1%). The EOs of *P. dioica* and *E. caryophyllata* presented a strong antioxidant activity and expressive antimicrobial activity against *S. Choleraesuis*, *E. coli*, with MBC of 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, and against *S. aureus*, *E. caryophyllata* OE exhibited MBC of 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and *P. dioica* MIC of 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The EO of *V. curassavica* presented weak antioxidant activity and showed no antimicrobial activity at the tested concentrations. The results demonstrate that the EOs of *E. caryophyllata* and *P. dioica* may be considered a natural antimicrobial and antioxidant source for the food industry.

Index terms: Oils volatile, DPPH, allspice, erva-baleeira, clove.

RESUMO: Objetivou-se avaliar a composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais (OEs) de *Pimenta dioica* L., *Varronia curassavica* J. e *Eugenia caryophyllata* T. Os componentes químicos dos OEs foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massas (CG-EM) e a atividade antioxidante avaliada pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). A atividade antimicrobiana dos óleos frente às cepas padrão de *Salmonella Choleraesuis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi determinada por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) pelo método de diluição em caldo. Os constituintes majoritários no OE de *P. dioica* foram eugenol (44,9%), α -pineno (21,0%), limoneno (10,1%) e chavicol (7,5%), no OE de *V. curassavica* foram identificados α -pineno (56,1%), β -cariofileno (13,5%), eucaliptol (3,3%) e o α -tujeno (3,2%) e para *E. caryophyllata* os majoritários foram o eugenol (85,5%), acetato de eugenila (8,9%) e β -cariofileno (3,1%). Os OEs de *P. dioica* e *E. caryophyllata* apresentaram

forte atividade antioxidante e expressiva atividade antimicrobiana frente a *S. Cholerasuis*, *E. coli*, com CBM de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, e frente ao *S. aureus*, o OE de *E. caryophyllata* exibiu CBM de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a *P. dioica* CIM de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O OE de *V. curassavica* apresentou fraca atividade antioxidante e não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas. Os resultados demonstram que os OEs de *E. caryophyllata* e *P. dioica* podem ser considerados como fonte natural antimicrobiana e antioxidante para indústria de alimentos.

Termos para indexação: Óleos voláteis, DPPH, pimenta-da-jamaica, erva-baleeira, cravo-da-índia.

INTRODUÇÃO

Os alimentos, quando processados de maneira inadequada e em condições higiênicas insatisfatórias, podem ser veículos de agentes patogênicos ao ser humano e o seu consumo pode acarretar riscos à saúde (Oliveira et al., 2010). Apesar do desenvolvimento de diversos métodos e tecnologias para a conservação dos alimentos, as doenças de origem alimentar ainda constituem um sério problema de saúde pública. A degradação oxidativa de lipídeos em produtos alimentares também é considerada um dos fatores importantes que limitam a qualidade e aceitação do produto e pode ter efeitos nocivos à saúde (Laguerre; Lecomte; Villeneuve, 2007).

Um dos grandes desafios encontrados pela indústria de alimentos é o controle de alterações químicas e o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos nos alimentos, visto que os produtos de degradação gerados podem afetar a sua vida de prateleira e apresentar riscos para saúde dos consumidores (Calo et al., 2015; Krishnan et al., 2014). Assim, os antioxidantes sintéticos e conservantes químicos são utilizados há anos como tecnologia complementar aos processamentos nos alimentos para melhorar as condições de armazenagem e garantir a segurança destes (Honorato et al., 2013). No entanto, estudos apontam controvérsias quanto à utilização de alguns aditivos nos alimentos, uma vez que a utilização inadequada ou o consumo a longo prazo pode levar ao desenvolvimento de várias doenças como câncer, alergias e outras complicações (Botterweck et al., 2000; Polônio; Peres, 2009; Sindelar; Milkowski, 2012; Bryan et al., 2012).

Como os aditivos sintéticos têm sido considerados tóxicos e de baixa aceitação pelos consumidores, a procura por compostos naturais e mais saudáveis têm aumentado cada vez mais (Calo et al., 2015). Nos últimos anos, várias pesquisas têm sido realizadas com óleos essenciais (OEs) de diversas plantas medicinais e condimentares, devido às suas reconhecidas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, e estes têm-se tornado uma alternativa promissora aos aditivos comumente utilizados na indústria de alimentos (Calo et al., 2015; Leja; Czaczyk, 2016). Ricos em diferentes compostos, como terpenos e fenilpropanoides, os OEs de plantas condimentares podem melhorar a qualidade dos alimentos através de diminuição na degradação lipídica e no crescimento de microrganismos (Kin; Cho; Han, 2013), além de conferir propriedades sensoriais e apresentarem baixa toxicidade em

relação aos conservantes sintéticos (Sadeghi et al., 2015). Diversas espécies vegetais de uso medicinal também são fontes importantes de compostos com tais atividades (Ortega-Ramirez et al., 2014), sendo relatadas na literatura por possuírem atividades antibacteriana (Trajano et al., 2009; Andrade et al., 2012; Millezi et al., 2014), antifúngica (Abdollahi et al., 2011; Onaran et al., 2014), anti-inflamatória e analgésica (Daniel et al., 2009), antioxidante (Andrade et al., 2012; Del ré; Jorge, 2012; Patel Chirag et al., 2013), entre outras.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana de OEs de *Pimenta dioica*, *Varronia curassavica* e *Eugenia caryophyllata*.

MATERIAL E MÉTODO

As folhas de *Pimenta dioica* Lindl. (pimenta-da-jamaica) e *Varronia curassavica* Jacq. (erva-baleeira) foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), Montes Claros, MG, no período da manhã, em janeiro de 2016. Os botões florais secos de *Eugenia caryophyllata* Thunb. (cravo-da-índia) foram adquiridos diretamente de produtores rurais da região de Itabuna, BA. Os OEs de *P. dioica* e *V. curassavica* foram extraídos das folhas frescas pelo processo de destilação a vapor, utilizando-se um equipamento (Linax D20) em escala piloto fabricado em aço inoxidável e o OE dos botões florais secos do *E. caryophyllata* foi extraído pelo processo de hidrodestilação, utilizando o aparelho *Clevenger* durante 4 horas. Os OEs obtidos foram armazenados em vidros âmbar sob refrigeração a -4°C.

A composição química dos OEs foi determinada no Laboratório de Química Instrumental do ICA/UFMG em um cromatógrafo a gás da *Agilent Technologies* (GC 7890A) acoplado a um detector espectrômetro de massas (MS 5975C). Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida DB5-MS (30 m x 250 μ m x 0,25 μ m) e o hélio (99,9999% de pureza) como gás de arraste (1 mL min⁻¹). A amostra foi injetada (1 μ L) no modo *split* 1:5 com injetor mantido a 220°C. A programação da temperatura iniciou a 60°C até 240°C a uma taxa de 3°C min⁻¹, com um gradiente de temperatura de 10°C min⁻¹ até 270°C, permanecendo por 7 minutos. A temperatura da interface foi mantida em 240°C com sistema operado no modo *full scan* com impacto de elétrons (70 eV) e varredura na faixa de 40-550 (*m/z*). O índice de retenção de todos os compostos foi calculado a partir do tempo de retenção de uma mistura de *n*-alcanos (C₈-C₃₂, Sigma USA) 20 ppm, *split* 1:100.

Os dados gerados foram analisados utilizando-se o software MSD Chemstation juntamente com a biblioteca NIST 2009 (*National Institute of Standards and Technology*). A abundância relativa (%) dos constituintes foi calculada a partir da área de pico do cromatograma de íons totais (TIC) e organizada de acordo com a ordem de eluição. A identificação dos compostos dos OEs foi realizada por comparação dos espectros de massa com dados da biblioteca NIST 2.0, 2009. O índice de retenção relativo das substâncias (IR) foi calculado aplicando a equação proposta por Van den Dool e Kratz (1963) e comparado com os dados obtidos da literatura (Adams, 2007).

A atividade antioxidante dos OEs foi realizada no Laboratório de Plantas Medicinais do ICA/UFMG, pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) seguindo metodologia descrita por Singh et al. (2009), com modificações. Os OEs foram diluídos em metanol em cinco concentrações (1, 5, 10, 20 e 40 µg mL⁻¹). Para o OE de cravo também foram utilizadas as concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2 e 3 µg mL⁻¹, devido sua alta atividade antioxidante. As amostras (3 mL) foram misturadas com solução metanólica de DPPH (1 mL, 40 µg mL⁻¹) e foram mantidas no escuro por 60 minutos e a absorbância medida em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC) a 515 nm. O controle negativo continha metanol (3,0 mL) e DPPH (1 mL, 40 µg mL⁻¹) e o controle positivo (BHT, butil hidroxitolueno) foi testado nas mesmas concentrações utilizadas para os OEs. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A percentagem de sequestro de radicais livres (%SRL) foi determinada de acordo com a seguinte equação (1):

$$\text{SRL}(\%) = \frac{\text{Abs. controle negativo} - \text{Abs. amostra}}{\text{Abs. controle negativo}} \times 100 \quad (1)$$

A concentração eficiente (CE₅₀), concentração da amostra capaz de reduzir 50% dos radicais livres DPPH, foi calculada a partir da regressão linear obtida do gráfico da concentração das amostras *versus* %SRL em cada amostra de OE testado. O índice de atividade antioxidante (IAA) foi determinado de acordo com Scherer et al. (2009), pela equação 2:

$$\text{IAA}(\%) = \frac{\text{Concentração de DPPH (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)}}{\text{CE}_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})} \quad (2)$$

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos OEs de *P. dioica*, *V. curassavica* e *E. caryophyllata* foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do ICA/UFMG, pelo método de macrodiluição em caldo, de acordo com a norma dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbio (NCCLS, 2003). Os microrganismos avaliados foram *Salmonella* Choleraesuis (ATCC 10708), *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus* coagulase positiva (ATCC 25923). As cepas bacterianas foram repicadas em caldo BHI por dois dias consecutivos e foram incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, foram inoculados em Ágar Padrão de Contagem (PCA) e incubados a 37°C por 24 horas, em seguida, os microrganismos foram suspensos em solução de NaCl a 0,85% estéril. As soluções, em triplicata, foram preparadas em tubos com 2,5 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI), Tween 80 (0,8 % v/v) e os OEs nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 40 µL mL⁻¹. Posteriormente, 12,5 µL da suspensão dos microrganismos padronizada para 0,5 na escala McFarland (10⁸ UFC mL⁻¹) foram inoculados em cada tubo com as concentrações testadas. Em seguida, foi realizada homogeneização e os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas. Após o período de

incubação, uma alçada de todas as diluições dos OEs foi transferida para placas contendo Ágar Padrão de Contagem (PCA), sendo estas incubadas a 37°C por 24 horas para observação de crescimento microbiano. A CIM foi definida como a menor concentração do OE em $\mu\text{L mL}^{-1}$ capaz de inibir o crescimento microbiano. A CBM foi considerada como a menor concentração em estudo capaz de causar a morte do microrganismo.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados dos teores de OEs de *P. dioica*, *V. curassavica* e *E. caryophyllata* e da análise cromatográfica (CG-EM) podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1 – Teor de óleo essencial e compostos identificados (CG-EM) nos óleos essenciais extraídos da *Pimenta dioica*, *Varronia curassavica* e *Eugenia caryophyllata*.

Compostos	TR (min)	IR _{lit.}	IR _{cal.}	PD (%)	VC (%)	EC (%)
α -Tujeno	5.4	924	926	-	3,2	-
α -Pino	5.6	932	933	1,50	56,1	-
Sabineno	6.6	969	972	-	1,6	-
β -Pino	6.8	974	978	21,0	1,8	-
1-Octen-3-ol	6.8	974	980	0,9	-	-
3-Octanol	7.4	988	999	1,0	-	-
α -Felandreno	7.7	1002	1009	2,8	-	-
o-Cimeno	8.3	1022	1025	2,0	-	-
Limoneno	8.5	1024	1031	10,1	-	-
Eucaliptol	8.5	1026	1032	-	3,3	-
β -Linalol	11.0	1095	1100	1,1	-	-
Salicilato de metila	14.7	1198	1190	-	-	0,1
Chavicol	17.4	1247	1252	7,5	-	-
δ -Elemeno	20.8	1335	1333	-	1,7	-
Eugenol	22.0	1356	1361	44,9	-	85,5
β -Cariofileno	24.3	1417	1416	-	13,5	3,1
α -Humuleno	25.7	1452	1451	-	2,8	0,4
Aromadendreno	25.9	1458	1455	-	2,3	-
α -Bisaboleno	27.9	1506	1505	-	1,8	-
Acetato de eugenila	28.2	1521	1512	-	-	8,9
Espatuleno	30.5	1577	1571	-	-	0,6
Óxido de cariofileno	30.7	1582	1576	-	-	0,2
Total				92,8	88,1	98,8
Desconhecidos				7,2	11,9	1,2
Teor de óleo (%)				0,49	0,33	1,93

TR: tempo de retenção; IR_{cal.}: índice de retenção calculado; IR_{lit.}: índice de retenção da literatura; PD: *Pimenta dioica*; VC: *Varronia curassavica*; EC: *Eugenia caryophyllata*.

O teor de OE encontrado nas folhas de *P. dioica* foi de 0,49% e os principais componentes detectados foram o eugenol (44,9%), o β -pineno (21,0%), limoneno (10,1%) e o chavicol (7,5%). No entanto, percentuais diferentes de eugenol foram encontrados por alguns autores como Oliveira et al. (2009) que observaram em suas análises 82,56%, e Monteiro et al. (2011) que encontraram percentual de 76,98%. Nas folhas da *V. curassavica* o teor de OE observado foi de 0,33% e os componentes majoritários identificados na análise cromatográfica foram o α -pineno (56,1%), α -santaleno (13,5%), eucaliptol (3,3%), α -tujeno (3,2%) e o α -humuleno (2,8%). Queiroz et al. (2016) encontraram no OE de erva-baleeira o β -cariofileno (22,6% a 27,4%), elixeno (14,9% a 17,2%) e o γ -muuroleno (9,1% a 9,8%).

O teor de OE encontrado em *E. caryophyllata* foi de 1,93% e foram identificados sete compostos, perfazendo a maior parte da composição deste OE (98,8%), destacando-se como componentes majoritários o eugenol (85,5%), acetato de eugenila (8,9%) e o β -cariofileno (3,1%). Resultado semelhante foi encontrado por Pereira et al. (2008), onde três compostos foram considerados majoritários, destacando-se o eugenol (86,3%), β -cariofileno (8,2%) e o acetato de eugenila (3,6%). Dados semelhantes foram observados por Scherer et al. (2009) para o percentual de eugenol (83,75%).

A composição química do OE de uma planta é determinada por fatores genéticos e fisiológicos, mas pode sofrer variações significativas em consequência de fatores ambientais como clima e local de cultivo (Oliveira et al., 2009). Segundo Scherer et al. (2009) essa variação pode influenciar diretamente nas propriedades funcionais dos OEs, como a atividade antioxidante e antimicrobiana.

A determinação da ação antioxidante consiste na capacidade de eliminação do radical livre DPPH pela amostra. Na Tabela 2 podem ser visualizados a percentagem de sequestro dos radicais livres pelos OEs de *P. dioica*, *V. curassavica* e *E. caryophyllata* e do padrão BHT.

Tabela 2. Percentagem de sequestro dos radicais livres dos óleos essenciais de *Pimenta dioica*, *Varronia curassavica* e *Eugenia caryophyllata*.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%SRL			
	<i>P. dioica</i>	<i>V. curassavica</i>	<i>E. caryophyllata</i>	BHT
0,25	-	-	29,37	-
0,5	-	-	30,79	-
1	26,91	1,87	53,95	10,96
2	-	-	66,03	-
3	-	-	72,22	-
5	57,56	6,96	81,26	28,61
10	78,18	7,50	90,63	66,20
20	86,08	8,70	90,50	85,34
40	89,16	13,39	90,63	88,84

%SRL: percentagem de sequestro de radicais livres; BHT: antioxidante padrão.

A CE_{50} , calculada a partir da regressão entre as concentrações e a %SRL, está diretamente relacionada à percentagem de sequestro do DPPH, sendo inversamente proporcional, ou seja, quanto maior o índice de sequestro de DPPH por uma amostra, menor será o CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante (Sousa et al., 2007). As equações geradas, CE_{50} e o IAA estão apresentados na Tabela 3.

Considerou-se ação antioxidante fraca quando o IAA < 0,5, ação moderada quando o IAA estiver entre 0,5 e 1,0, ação antioxidante forte quando o IAA for de 1,0 a 2,0 e ação muito forte para valor de IAA > 2,0 (Scherer et al., 2009).

Tabela 3. Concentração efetiva e índice de atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Pimenta dioica*, *Varronia curassavica* e *Eugenia caryophyllata*.

	Equações	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	IAA	Ação
<i>Pimenta dioica</i>	$y = 1,2860x + 48,029$	1,53	26,14	Muito forte
<i>Varronia curassavica</i>	$y = 0,2443x + 3,9708$	188,41	0,21	Fraca
<i>Eugenia caryophyllata</i>	$y = 16,293x + 28,477$	1,32	30,30	Muito Forte
BHT	$y = 1,8759x + 27,477$	12,01	3,33	Muito Forte

CE_{50} : concentração efetiva; IAA: índice de atividade antioxidante; BHT: antioxidante padrão.

Os OEs de *P. dioica* e *E. caryophyllata* apresentaram ação antioxidante muito forte, com IAA maior do que o antioxidante sintético BHT (Tabela 3). Essa atividade pode ser atribuída ao eugenol, composto majoritário presente nestes OEs, o qual possui atividade antioxidante reconhecida (Lee et al., 2005).

Outros trabalhos também comprovaram a alta atividade antioxidante destes OEs. Dima et al. (2014) encontraram relevante atividade sequestradora de radicais livres DPPH do OE de *P. dioica*, apresentando CE_{50} de $2,36 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em estudo realizado por Chaieb et al. (2007), o OE de *E. caryophyllata* obteve CE_{50} de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Gülçin et al. (2012) verificaram atividade antioxidante do OE de *E. caryophyllata* em ensaios *in vitro*, mostrando que esse óleo pode ser usado para minimizar ou impedir a oxidação lipídica em produtos alimentares e farmacêuticos, retardando a formação de compostos tóxicos pela oxidação, mantendo a qualidade nutricional e prolongando a vida de prateleira desses produtos.

O OE de *V. curassavica* apresentou CE_{50} muito alta ($188,34 \mu\text{g mL}^{-1}$) e consequentemente fraca atividade antioxidante (IAA < 0,5). Michielin et al. (2011) avaliaram a capacidade de eliminação do radical DPPH de extratos da *V. curassavica* obtidos por diferentes métodos e verificaram que o OE obtido por hidrodestilação apresentou a menor atividade antioxidante, com %SRL de 6,9%, sendo o extrato obtido por extração clássica de solventes orgânicos com acetato de etila o mais eficiente, com inibição de 95,97% da atividade sequestradora de radicais livres. Ainda segundo o autor, este baixo desempenho do OE é provavelmente causado pela alta temperatura de extração utilizada (100°C), que pode promover a degradação dos componentes antioxidantes, compostos fenólicos, presente neste OE.

Na avaliação dos resultados da atividade antimicrobiana (Tabela 4), o OE de *P. dioica* apresentou alta atividade antimicrobiana frente às três bactérias patogênicas testadas, com CBM de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. coli* e *S. Choleraesuis*, respectivamente, e CIM de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. coagulase positiva*. O OE de *E. caryophyllata* apresentou os melhores resultados de inibição, apresentando efeito bactericida sobre todas as estirpes testadas, sendo necessárias concentrações de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para provocar a morte das cepas de *E. coli*, *S. coagulase positiva* e *S. Choleraesuis*, respectivamente. Esse resultado possivelmente se justifica pelo maior teor de eugenol encontrado no OE de *E. caryophyllata* (85,5%) em relação a *P. dioica* (44,9%). Segundo Devi et al. (2010), o eugenol, composto ativo presente nos OEs de *P. dioica* e *E. caryophyllata*, apresenta a capacidade de provocar danos à estrutura da membrana citoplasmática bacteriana, o que causa perda do conteúdo celular, com posterior morte da bactéria.

Tabela 4. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Pimenta dioica*, *Varronia curassavica* e *Eugenia caryophyllata* frente a microrganismos patogênicos.

Microrganismos	Atividade antimicrobiana					
	CIM ($\mu\text{L mL}^{-1}$)			CBM ($\mu\text{L mL}^{-1}$)		
	PD	VC	EC	PD	VC	EC
<i>Salmonella Choleraesuis</i>	40	-	20	40	-	40
<i>Escherichia coli</i>	5	-	5	5	-	5
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	20	-	5	-	-	10

CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Concentração bactericida mínima; PD: *Pimenta dioica*; VC: *Varronia curassavica*; EC: *Eugenia caryophyllata*.

Excelentes resultados também foram encontrados por Beraldo et al. (2013) em que o OE de *E. caryophyllata* foi efetivo na inibição das espécies em estudo, apresentando CIM de 0,04% para *Salmonella* sp., 0,06% para *E. coli* e *S. aureus* e 0,08% para *L. monocytogenes*, com CBM de 0,18% para *L. monocytogenes*, e por Pereira et al. (2008), onde constataram que o OE de *E. caryophyllata* teve efeito bactericida sobre *E. coli* e *S. aureus*, atribuindo essa propriedade ao componente majoritário encontrado em 80 a 90% no OE dessa espécie, o eugenol.

Oussalah et al. (2006; 2007) relataram atividade bactericida do OE de *P. dioica* frente a vários microrganismos, como *Pseudomonas putida*, *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*. Tais resultados corroboram o estudo realizado por Costa Sobrinho (2007), no qual a atividade antibacteriana do OE de *P. dioica* sobre cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* sp., *E. coli* e *Pseudomonas* sp. foi atribuída ao eugenol.

O OE de *V. curassavica* não apresentou atividade antimicrobiana contra as três estirpes em nenhuma das concentrações testadas. No entanto, Rodrigues et al. (2012) mostraram que o OE desta espécie apresentou atividade antimicrobiana relevante frente aos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, apresentando CIM de 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S.*

aureus, *Bacillus cereus* e *E. coli*. Esta divergência de atividade antimicrobiana entre os estudos pode ser decorrente de vários fatores, como o método de extração utilizado, uma vez que neste estudo utilizou-se o processo de destilação a vapor, enquanto Rodrigues et al. (2012) utilizaram hidrodestilação, e também as concentrações utilizadas, composição química dos OEs e as linhagens microbianas testadas, que podem apresentar perfis diferentes de sensibilidade (Rios; Recio, 2005; Scherer et al., 2009).

CONCLUSÕES

O componente majoritário encontrado nos OEs de *P. dioica* e *E. caryophyllata* foi o eugenol e no OE de *V. curassavica* o α -Pineno. Os OEs de *P. dioica* e *E. caryophyllata* apresentaram atividade antioxidante muito forte e boa ação antimicrobiana, sendo o OE de *E. caryophyllata* mais eficiente na inibição das bactérias avaliadas. Os dois OEs apresentam boas perspectivas no sentido de desenvolver antimicrobiano natural eficaz e ser utilizados como potenciais substitutos dos antioxidantes sintéticos, uma vez que apresentaram atividade antioxidante superior ao antioxidante sintético BHT. O OE de *V. curassavica* apresentou fraca atividade antioxidante nas concentrações testadas e não apresentou atividade antibacteriana frente às cepas avaliadas.

REFERÊNCIA

- ABDOLLAHI, A. et al. Screening of antifungal properties of essential oils extracted from sweet basil, fennel, summer savory and thyme against postharvest phytopathogenic fungi. **Journal of Food Safety**, v. 31, n. 3, p. 350-356, 2011.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4th edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007. 803 p.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- BERALDO, C. et al. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 4, p. 436-440, 2013.
- BOTTERWECK, A. A. et al. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 1, 599-605, 2000.
- BRYAN, N. S. et al. Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: An updated review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 10, p. 3646-3665, 2012.
- CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.
- CHAIKIB, K. et al. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. **Mycoses**, v. 50, n. 5, p. 403-406, 2007.

- COSTA SOBRINHO, J. R. S. 2007. 84 f. **Estudo analítico e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído das folhas da *Pimenta dioica* L.** Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís.
- DANIEL, A. N. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities A of eugenol essential oil in experimental animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1b, 2009.
- DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.
- DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107-115, 2010.
- DIMA, C. et al. Microencapsulation of essential oil of pimento [*Pimenta dioica* (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 22, p. 203-211, 2014.
- GÜLÇİN, I. et al. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n.4, p. 489-499, 2012.
- HONORATO, T. C. et al. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde**, v. 8, n. 5, p. 01 - 11, 2013.
- KIM, S. J.; CHO, A. R.; HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 112-120, 2013.
- KRISHNAN, K. R. et al. Bio protection and preservation of raw beef meat using pungent aromatic plant substances. **Journal of the Science of Food and agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2456-2463, 2014.
- LAGUERRE, M., LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, n. 5, p. 244-282, 2007.
- LEE, S. J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.
- LEJA, K. B.; CZACZYK, K. The industrial potential of herbs and spices - a mini review. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 15, n. 4, p. 353-365, 2016.
- MICHIELIN, E. M. Z. et al. Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by different methods. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 1, p. 89–96, 2011.
- MILLEZI, A. F. et al. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira plantas medicinais**, v. 16, n. 1, p. 18-24, 2014.
- MONTEIRO, O. S. et al. Chemical evaluation and thermal analysis of the essential oil from the fruits of the vegetable species *Pimenta dioica* Lindl. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, n. 2, p. 595-600, 2011.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**: Norma Aprovada. 6ª ed. Norma NCCLS M7-A6, 2003.

OLIVEIRA, A. B. A. et al. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, v. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.

OLIVEIRA, R. A. et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

ONARAN, A. et al. Antifungal and bioherbicidal properties of essential oils of *Thymus fallax* Fish & Mey., *Origanum vulgare* L. and *Mentha dumetorum* Schult. **Journal of Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 5159-5164, 2014.

ORTEGA-RAMIREZ, L. A. et al. Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: a hypothesis. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 2, p. 129-137, 2014.

OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, v. 73, n. 2, p. 236-44, 2006.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

PATEL CHIRAG, J. et al. Antioxidant activity of herbal plants: a recent review. **Journal of Drug Discovery and Therapeutics**, v. 1, n. 8, p. 01-08, 2013.

PEREIRA, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 887-893, 2008.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p. 1653-1666, 2009.

QUEIROZ, T. B. et al. Teor e composição química do óleo essencial de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) em função dos horários de coleta. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 356-362, 2016.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 80-84, 2005.

RODRIGUES, F. F. et al. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research**, v. 4, n. 3, p. 161-165, 2012.

SADGHI, Z. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of *Boerhavia elegans* (choisy) grown in Baluchestan, Iran. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2015.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SINDELAR, J. J.; MILKOWSKI, A. L. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. **Nitric Oxide**, v. 26, n. 4, p. 259-266, 2012.

SINGH, H. P. et al. Characterization and antioxidant activity of essential oils from fresh and decaying leaves of *Eucalyptus tereticornis*. **Journal of Agricultural and Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 6962-6966, 2009.

SOUSA, C. M. de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

4.2 Artigo 2 - Avaliação da estabilidade oxidativa e microbiológica de linguiça frescal de frango adicionada de óleos essenciais

Este artigo foi elaborado conforme normas da revista Ciência e Agrotecnologia

EVALUATION OF THE OXIDATIVE AND MICROBIOLOGICAL STABILITY OF FRESH CHICKEN SAUSAGE ADDED WITH ESSENTIAL OILS

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA E MICROBIOLÓGICA DE LINGUIÇA FRESCAL DE FRANGO ADICIONADA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the action of essential oils (EOs) of *Pimenta dioica* and *Eugenia caryophyllata* on the oxidative and microbiological stability of fresh chicken sausages during storage at 7 °C. The EOs of *P. dioica* and *E. caryophyllata* were added to fresh chicken sausage at concentrations of 10 $\mu\text{L g}^{-1}$ and 40 $\mu\text{L g}^{-1}$, and the combination of the two EOs at the concentration of 10 $\mu\text{L g}^{-1}$. Analyzes of pH, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), microbiological analyzes of *Staphylococcus* coagulase positive, *Salmonella* sp. and thermotolerant coliforms were performed on days 1, 7, 14 and 21 of storage and the *headspace* chromatographic analysis were performed on the 21st day of storage. The data were submitted to analysis of variance and the differences between means determined by the Tukey test. The results showed that EOs, under the conditions of this study, were not as effective in inhibiting bacterial growth. However, they were effective in delaying the lipid oxidation of fresh chicken sausages during the 21 days of storage at 7 °C and could be used as a natural antioxidant source in meat products.

Index terms: meat product, lipid oxidation, chemical preservatives, clove, allspice.

RESUMO: Objetivou-se avaliar a ação dos óleos essenciais (OEs) de *Pimenta dioica* e *Eugenia caryophyllata* sobre a estabilidade oxidativa e microbiológica de linguiças frescas de frango durante o armazenamento a 7°C. Os OEs de *P. dioica* e *E. caryophyllata* foram adicionados à linguiça frescal de frango nas concentrações de 10 $\mu\text{L g}^{-1}$ e 40 $\mu\text{L g}^{-1}$, e a combinação dos dois OEs na concentração de 10 $\mu\text{L g}^{-1}$. Foram realizadas análises de pH, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), análises microbiológicas de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* sp. e coliformes a 45 °C após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento. O *headspace* da linguiça com 21 dias de armazenamento foi analisado a fim de determinar a presença do óleo essencial. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as diferenças entre médias determinadas pelo teste de Tukey. Os resultados mostraram que os OEs, nas condições deste estudo, foram pouco efetivos na inibição de *Salmonella* sp. e coliformes a 45°C. No entanto, foram efetivos em retardar a oxidação lipídica das linguiças frescas de frango durante os 21 dias de armazenamento a 7°C, podendo ser utilizados como fonte antioxidante natural em produtos cárneos.

Termos para indexação: produto cárneo, oxidação lipídica, conservantes químicos, cravo, pimenta-da-jamaica.

INTRODUÇÃO

A oxidação lipídica e a deterioração microbiana são os principais problemas que diminuem a vida de prateleira das carnes e dos produtos cárneos (Shan et al., 2009; Krishnan et al., 2014). Estes processos podem gerar grandes perdas para a indústria devido à formação de compostos tóxicos que degradam o alimento, diminuem a vida de prateleira e qualidade nutricional (Mariutti; Bragagnolo, 2009).

A oxidação lipídica nos produtos cárneos é influenciada principalmente pela composição e teor de ácidos graxos poli-insaturados, pela presença de elementos pró-oxidantes, tais como ferro e cobre metálico (Min et al., 2008), e pelas condições de processamento e armazenamento (Lima Jr. et al., 2013). Esse processo oxidativo pode causar alterações de cor, sabor, levar a formação de odores desagradáveis e de compostos potencialmente tóxicos que reduzem a qualidade nutricional do produto (Soares et al., 2009). As carnes, quando expostas as condições propícias, podem ser facilmente contaminadas por microrganismos patogênicos e deteriorantes durante o processamento e armazenamento (Alcantara et al., 2012). Estes microrganismos podem causar alterações indesejáveis na qualidade das carnes e transmitir doenças ao ser humano (Krishnan et al., 2014).

Para minimizar esses processos e aumentar a vida útil desses produtos durante o processamento e armazenamento, a indústria recorre ao emprego de conservantes químicos (Lima Júnior et al., 2013). Vários antioxidantes sintéticos, tais como hidroxianisol butilato (BHA), hidroxibutil tolueno (BHT), propil galato (PG) e terqbutil hidroquinona, TBHQ (Ramalho; Jorge, 2006) e os conservantes nitritos e nitratos, na forma de sais de potássio e sódio são comumente utilizados para proteger os alimentos da deterioração (Honikel, 2008). Porém, estudos toxicológicos em animais têm mostrado que altas concentrações e o uso contínuo de alguns antioxidantes podem apresentar efeitos tóxicos e/ou carcinogênicos (Botterweck et al., 2000; Li et al., 2002; Gharavi et al., 2007). Os nitritos e nitratos além de ser utilizados para obtenção de cor, sabor e textura em embutidos e carnes curadas, são utilizados como antioxidantes e inibidores do crescimento de alguns microrganismos como o *Clostridium botulinum* (Honikel, 2008). No entanto, a utilização destes compostos é limitada devido à possível reação com amidas e aminas presentes no produto, formando as nitrosaminas, que são agentes altamente carcinógenos, mutagênicos e teratogênicos (Dutra; Rath; Reyes, 2007; Bryan et al., 2012; Sindelar; Milkowski, 2012).

Existe crescente preocupação quanto aos problemas que esses conservantes podem trazer para a saúde humana, assim, vários estudos têm sido realizados com óleos essenciais (OEs) e extratos de plantas como possível alternativa para substituir e, ou, diminuir os conservantes comumente utilizados (Amorati et al., 2013). Os condimentos e especiarias são utilizados há anos para realçar sabor e aroma dos alimentos. Além das características sensoriais, muitos condimentos são fonte de compostos ativos, que apresentam várias funções biológicas, incluindo atividade antioxidante e antimicrobiana (Opara; Chohan, 2014).

O cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) e a pimenta-da-jamaica (*Pimenta dioica*) são amplamente utilizados como condimento e especiarias em todo o mundo, devido ao marcante

sabor e aroma (Oliveira, 2009). Os OEs destas espécies são muito utilizados como aromatizantes nos alimentos, como fonte de eugenol para produção de vanilina, na indústria de perfumaria e outros cosméticos (Oliveira, 2009; Zhang et al., 2012). Além disso, o OE de cravo é utilizado na odontologia como componente de seladores, anestésicos e antissépticos (Affonso et al., 2012). Vários estudos têm reportado a atividade antioxidante e antimicrobiana dos OEs de cravo e pimenta-da-jamaica em testes *in vitro* (Chaieb et al., 2007; Oussalah et al., 2007; Padmakumari et al., 2011; Beraldo et al., 2013; Dima et al., 2014). No entanto, poucos são os trabalhos com aplicação destes compostos diretamente nos produtos cárneos.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação dos OEs de *Pimenta dioica* e *Eugenia caryophyllata* sobre a estabilidade oxidativa e microbiológica de linguiça frescal de frango durante o armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Elaboração das linguiças frescas de frango

A elaboração das linguiças frescas de frango foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG). Mediante resultados obtidos na avaliação antioxidante e antimicrobiana *in vitro* de OEs (dados não publicados) foram selecionados os OEs de pimenta-da-jamaica e cravo-da-índia para aplicação na linguiça frescal de frango. Além dos ingredientes utilizados na formulação controle (Tabela 1), os tratamentos foram adicionados dos OEs de *Pimenta dioica* e *Eugenia caryophyllata*, conforme seguinte descrição: T1 – adição 10 $\mu\text{L g}^{-1}$ de OE de *Pimenta dioica*; T2 - adição 40 $\mu\text{L g}^{-1}$ de OE de *Pimenta dioica*; T3 - adição 10 $\mu\text{L g}^{-1}$ de OE de *Eugenia caryophyllata*; T4 - adição 40 $\mu\text{L g}^{-1}$ de OE de *Eugenia caryophyllata*; T5 - adição 10 $\mu\text{L g}^{-1}$ de OE de *Eugenia caryophyllata* combinado com o OE de *Pimenta dioica*. O controle foi realizado sem adição dos OEs.

Tabela 1. Ingredientes utilizados (%) na formulação da linguiça frescal de frango.

Ingredientes	% (m/m)
Carne de peito de frango	88,5
Toucinho	10
Sal (NaCl)	1,5

A carne e o toucinho foram triturados em moedor de carne inox (marca SKYMSEN / modelo PSEE-98THD) utilizando-se disco de 8 mm de diâmetro e, após essa etapa, a massa cárnea foi dividida em seis porções de 900 g e foram misturados manualmente ao OE e o sal da formulação. A massa cárnea resultante foi embutida em tripa natural suína, em embutideira manual. As linguiças foram acondicionadas em saquinhos plásticos de policloreto de vinila (PVC), identificadas e armazenadas sob refrigeração a 7°C por período de 21 dias.

Análises microbiológicas

As análises microbiológicas das linguças frescas de frango foram realizadas no Laboratório de Sanidade Animal do ICA/UFMG. As amostras, em triplicata, foram submetidas às análises de coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* sp. nos tempos de 1, 7, 14 e 21 dias de fabricação do produto, seguindo metodologias preconizadas pela *American Public Health Association* (APHA, 2001). Para contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes a 45°C 25 g das amostras foram transferidas para frascos de vidro (300 mL) esterilizados e, estes foram homogeneizadas manualmente por um minuto com 225 mL de água peptonada a 0,1%. A partir desta diluição, foram preparadas diluições decimais seriadas, utilizando-se água peptonada a 0,1%.

A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada inoculando-se 0,1 mL de cada diluição preparada em placas contendo ágar Baird Parker suplementado com gema de ovo e telurito de potássio. As placas foram invertidas e incubadas a 37°C por 48 horas e, após esse período, foram realizadas contagem e identificação das colônias com características típicas e atípicas de *Staphylococcus* sp. (colônias negras, pequenas e brilhantes, com a presença de halo). Cinco colônias de cada placa foram transferidas para tubos contendo o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), incubados a 37°C e, após 24 horas foram transferidos 0,2 mL de cada tubo de cultivo para tubos esterilizados contendo 0,5 mL de plasma de coelho liofilizado (Laborelin®) reconstituído de acordo com instruções do fabricante. Os tubos foram incubados a 37°C e foi observada a formação dos coágulos após 6 a 24 horas. A contagem de coliformes a 45 °C foi realizada pela Técnica de Número Mais Provável (NMP). Alíquotas de 1,0 mL de cada diluição foram transferidas para séries de três tubos contendo o caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com tubos de Durham invertidos, incubados a 37°C durante 24 horas. Após esse período, uma alçada de cada tubo apresentando crescimento e produção de gás foi inoculada em tubos contendo 10 mL de caldo *Escherichia coli* (EC), com tubos de Durham invertidos, e incubados a 45°C por 48 horas. Os tubos registrados como positivos foram comparados na tabela do número mais provável (NMP), os resultados foram adequados às diluições utilizadas e o resultado expresso em NMP/g.

A contagem de *Salmonella* sp. foi realizada transferindo 25 g de cada amostra para frascos de vidro estéreis contendo 225 mL de caldo de pré-enriquecimento (água peptonada 1% tamponada). Em seguida, foram homogeneizados e incubados a 37°C e, após 24 horas foram transferidos 1 mL para tubos contendo 10 mL de Caldo Tetrationato (TT) e 0,1 mL para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vasiliadis (RV), e estes foram incubados a 37°C e 42°C, respectivamente, por 24 horas. Após esse período, foram estriados separadamente em Ágar Hectoen-enteric (HE), Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar Bismuto Sulfito (BS). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Colônias características foram confirmadas em tubos contendo o meio Rugai modificado como prova bioquímica e os resultados expressos em presença ou ausência de *Salmonella* sp. em 25 g do alimento.

Teste de TBARS e pH

As análises de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pH foram realizadas em triplicata nos tempos de 1, 7, 14 e 21 dias de fabricação do produto.

A avaliação da oxidação lipídica foi realizada no Laboratório de Plantas Medicinais do ICA/UFMG, pelo método de TBARS seguindo metodologia descrita por Raharjo, Sofos e Schmidt (1992), com modificações. Foram pesados 5 g das amostras e, estas foram transferidas para béqueres contendo 18 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 5% diluído em água destilada, 0,5 mL de solução alcoólica de butilhidroxitolueno (BHT) e 2,0 mL de sulfanilamida a 1,5%. A mistura foi homogeneizada com bastão de vidro durante um minuto e mantida em repouso e, após 10 minutos, foi filtrada com auxílio de papel filtro em balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com TCA (5%). Uma alíquota de 2,0 mL desta solução foi transferida para tubo de ensaio e, posteriormente, foram adicionados 2,0 mL da solução de TBARS (0,08 M) em ácido acético (50%) e os tubos foram mantidos em banho-maria à temperatura de 80°C por 30 minutos. Os tubos foram resfriados à temperatura ambiente em banho de água fria e a absorbância medida em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC) a 531 nm. Para o cálculo dos valores de TBARS foi utilizado o fator de conversão de 7,8 e os resultados expressos em mg de malonaldeído (MDA)/kg de amostra (Yildiz-turp; Serdaroglu, 2010).

A avaliação de pH foi realizada em pHmetro (LUCA-210) calibrado com soluções tampão pH 7 e 4. Pesou-se 10 g de cada amostra em um béquer e, em seguida, foram adicionados 100 mL de água destilada. As amostras foram homogeneizadas com o auxílio de bastão de vidro, mantidas em repouso por 10 minutos e a leitura do pH foi realizada com a imersão dos eletrodos diretamente na amostra (Terra; Brum, 1988).

Análise de voláteis da linguiça por HS-CG/EM

A análise cromatográfica do *headspace* da linguiça acrescida de óleo foi realizada no Laboratório de Química Instrumental do ICA/UFMG, seguindo método de Aguiar et al. (2014). As amostras (1 g) foram transferidas para frascos *headspace* de vidro (20 mL), que foram vedados e acoplados ao amostrador automático (HS combi-PAL). O sistema foi homogeneizado (500 rpm) e incubados a 75°C por 5 min, com volume de injeção definido (1000 µL) e seringa previamente aquecida (75°C). Os compostos voláteis foram analisados e identificados em cromatógrafo a gás (Agilent Technologies, GC 7890A), acoplado a um espectrômetro de massas (MS 5975C), equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As condições utilizadas foram: aquecimento programado de 60°C até 240°C, a uma taxa de 3°C min⁻¹, com gradiente de temperatura de 10°C min⁻¹ até 270°C durante 7 min. A temperatura da interface foi mantida em 240°C. O hélio (fluxo 1 mL min⁻¹) foi utilizado como gás de arraste. O sistema foi operado no modo *full scan* com impacto eletrônico a 70 eV, em uma faixa de 45 a 550 (*m/z*). Os dados gerados foram analisados utilizando o software MSD Chemstation juntamente com a biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology, 2009). Os íons característicos de cada composto detectado foram

utilizados para identificar e comparar os espectros com dados da literatura (Adams, 2007) e da biblioteca NIST (2.0, 2009).

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre médias determinadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, utilizando-se o programa estatístico R, versão 2.12.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises microbiológicas

Os valores médios de coliformes a 45°C podem ser visualizados na Tabela 2. As contagens iniciais (dia 1) variaram de 0,48 a 2,08 Log NMP/g, indicando qualidade aceitável, de acordo com o permitido pela legislação vigente, que estabelece limite de até 3,70 Log NMP/g de coliformes a 45°C (Brasil, 2001). A linguiça frescal de frango adicionada de OE de cravo, na concentração de 10 µg mL⁻¹ (T3), apresentou a menor contagem, não diferindo, no entanto do controle (p<0,05).

Tabela 2- Contagem de coliformes a 45°C em amostras de linguiça frescal de frango controle e adicionada de óleos essenciais durante o período de armazenamento a 7°C.

Tratamentos	Contagem coliformes a 45 °C (Log NMP/g)			
	1º Dia	7ºDia	14º Dia	21º Dia
Controle	1,04±0,00 ^{bcA}	>3,04±0,00 ^{aB}	>3,04±0,00 ^{aB}	>3,04±0,00 ^{aB}
T1	1,36±0,00 ^{abA}	>3,04±0,00 ^{aB}	>3,04±0,00 ^{aB}	2,82±0,38 ^{aB}
T2	2,08±0,00 ^{abA}	>3,04±0,00 ^{aB}	>3,04±0,00 ^{aB}	2,28±0,38 ^{aB}
T3	0,48±0,00 ^{abA}	>3,04±0,00 ^{aB}	>3,04±0,00 ^{aB}	2,92±0,20 ^{aB}
T4	1,36±0,00 ^{abA}	1,33±1,48 ^{bA}	>3,04±0,00 ^{aB}	>3,04±0,00 ^{aB}
T5	0,96±0,00 ^{bcA}	>3,04±0,00 ^{aB}	>3,04±0,00 ^{aB}	2,22±0,75 ^{aB}

NMP: número mais provável; ^aMédias na mesma coluna seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (p<0,05). ^AMédias na mesma linha seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (p<0,05). Médias ± desvio padrão de análises em triplicata. T1: *Pimenta dioica* [10 µL g⁻¹]; T2: *Pimenta dioica* [40 µL g⁻¹]; T3: *Eugenia caryophyllata* [10 µL g⁻¹]; T4: *Eugenia caryophyllata* [40 µL g⁻¹]; T5: combinação dos óleos de *Pimenta dioica* e *Eugenia caryophyllata* [10 µL g⁻¹].

Os resultados apresentados no sétimo dia mostram que apenas o tratamento T4 (Tabela 2) foi estatisticamente diferente (p<0,05) das outras amostras, apresentando valor de contagem de coliformes a 45°C inferior (1,33 Log NMP/g) aos outros tratamentos, que apresentaram valores superiores a 3,04 NMP/g. Nos dias 14 e 21 de armazenamento das linguiças frescas de frango não foram encontradas diferenças estatísticas significativas (p<0,05) entre o controle e os demais tratamentos na contagem de coliformes a 45°C. Embora

não estatisticamente significativa ($p < 0,05$), os tratamentos T1, T2, T3 e T5 no 21º dia de armazenamento apresentaram contagens (2,22 a 2,92 Log NMP/g) inferiores ao controle ($> 3,04$ Log NMP/g) e ao estabelecido pela legislação vigente de máximo 3,70 Log NMP/g de coliformes a 45°C (Brasil, 2001).

A presença de coliformes a 45°C pode indicar contaminação das linguças por patógenos de origem entérica, revelando também condições higiênico-sanitárias insatisfatórias (Cardoso et al., 2005). Essa contaminação também poder ser oriunda da matéria prima utilizada. Em estudo realizado por Cardoso et al. (2009) com peito de frango obtido comercialmente, das 112 amostras analisadas 54,5% apresentaram coliformes a 45°C, em níveis acima do permitido pela legislação.

Neste estudo não foi detectada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras de linguça frescas de frango controle e adicionadas de OEs durante os 21 dias de armazenamento a 7°C, sendo os resultados expressos como < 2 Log UFC/g, atendendo os padrões estabelecidos pela legislação (Brasil, 2001), que estabelece a tolerância de até 3,70 Log UFC/g de amostra. Apesar de não ter sido detectada presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, sabe-se que os OEs de cravo e pimenta-da-jamaica apresentam atividade antibacteriana frente a esta bactéria (Oussalah et al., 2007; Beraldo et al., 2013).

Salmonella sp. são um dos principais patógenos veiculados por produtos de origem avícola e devido à sua alta patogenicidade, a legislação nacional vigente estabelece a ausência de *Salmonella* sp. em 25 g de amostra (Brasil, 2001). Neste estudo, apenas nos tratamentos adicionados do OE de cravo na concentração de $40 \mu\text{L g}^{-1}$ (T4) e o tratamento com a combinação dos dois OEs (T5) não foi detectada a presença de *Salmonella* sp. durante os 21 dias de armazenamento a 7°C. Nos demais tratamentos e no controle foi detectada a presença de *Salmonella* sp. em todas as análises realizadas (dias 1, 7, 14 e 21).

Zengin e Baysal (2015) observaram em seu estudo com carne picada armazenada a 4°C por 9 dias, que o OE de cravo restringiu o crescimento de coliformes e *Salmonella typhimurium*, apresentando propriedades bacteriostáticas e inibidoras significativas, no entanto, não tão eficazes quanto os conservantes de alimentos.

A atividade antimicrobiana *in vitro* dos OEs de *Pimenta dioica* e *Eugenia caryophyllata* foi estudada, a qual foi comprovada efetiva nos testes *in vitro*. No entanto, aplicados à linguça fresca de frango, pôde-se observar que não obtiveram a mesma efetividade. A atividade antimicrobiana dos OEs pode ser reduzida quando aplicados a matrizes alimentares, devido à interação do OE com os componentes dos alimentos, tais como lipídios e proteínas, o que diminui a quantidade disponível para a inibição das bactérias (Firouzi et al., 2007; Weiss et al., 2015). Essa interação pode exigir a aplicação de uma concentração maior para que se consiga os mesmos efeitos antibacterianos do teste *in vitro*. No entanto, altas concentrações dos OEs podem originar efeitos organolépticos negativos ao alimento, ultrapassando o limite aceitável pelo consumidor (Firouzi et al., 2007; Lv et al., 2011).

Teste de TBARS e pH

O teste de TBARS quantifica o malonaldeído (MDA), um dos principais produtos da decomposição dos hidroperóxidos, que são formados a partir da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (Lima Jr. et al., 2013). Os valores de TBARS, expressos em mg de MDA por kg de amostra podem ser visualizados na Tabela 3.

Neste estudo, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores de TBARS entre os dias de análise, para todos os tratamentos. No entanto, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e os demais tratamentos (Tabela 3) e, nota-se que os tratamentos adicionados de OEs de *Pimenta dioica* e *Eugenia caryophyllata* apresentaram valores de TBARS (0,134 a 0,224) inferiores ao controle (1,291) e com baixo nível de oxidação ($< 0,5$ mg de MDA/kg), o que indica elevada proteção dos OEs contra a oxidação lipídica nas amostras de linguiça frescal de frango.

Tabela 3- Valores médios de TBARS na linguiça frescal de frango com óleo essencial de *Pimenta dioica* e *Eugenia caryophyllata* durante o período de armazenamento a 7°C.

	TBARS (mg MDA/kg)*
Controle	1,29±0,25 ^a
T1	0,13±0,04 ^b
T2	0,22±0,05 ^b
T3	0,17±0,02 ^b
T4	0,21±0,07 ^b
T5	0,18±0,02 ^b

*mg de malonaldeído por kg de amostra; ^aMédias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). Médias $\pm$ desvio padrão de análises em triplicata. T1: *Pimenta dioica* [10 $\mu\text{L g}^{-1}$]; T2: *Pimenta dioica* [40 $\mu\text{L g}^{-1}$]; T3: *Eugenia caryophyllata* [10 $\mu\text{L g}^{-1}$]; T4: *Eugenia caryophyllata* [40 $\mu\text{L g}^{-1}$]; T5: combinação dos óleos de *Pimenta dioica* e *Eugenia caryophyllata* [10 $\mu\text{L g}^{-1}$].

Segundo Sheard et al. (2000), a partir de 0,5 mg de MDA/kg os consumidores são capazes de detectar rancidez na carne, ainda que esta não apresente aparentemente um estado de oxidação. Entretanto, outros autores relataram que a detecção sensorial de degradação lipídica se inicia a partir de valores de TBARS entre 1,0 e 2,0 mg de MDA/kg de amostra (Ahmad; Srivastava, 2007). Os resultados mostram que os OEs de pimenta-da-jamaica e cravo foram capazes de retardar a oxidação lipídica nas linguiças frescas de frango durante os 21 dias de armazenamento. Este estudo reporta aos resultados obtidos nos testes *in vitro* para os OEs, apresentando forte atividade antioxidante e papel protetor na linguiça frescal de frango. Esta atividade pode ser atribuída à estrutura fenólica do eugenol, composto majoritário presente nos dois OEs, que interfere no processo de propagação dos radicais livres (Gülçin, 2011).

Em estudo realizado por Sharma et al. (2017), o OE de cravo também foi efetivo na inibição da oxidação lipídica em linguiça fresca de frango embaladas a vácuo e armazenadas sob congelamento (-18°C) durante 45 dias. Os valores de TBARS nas amostras adicionadas de 0,25% OE de cravo foram significativamente ($p < 0,05$) menores ($0,21 \pm 0,03$ a $0,34 \pm 0,08$ mg de MDA/kg) que o controle, que apresentaram valores iniciais e após 45 dias de $0,22 \pm 0,03$ e $0,61 \pm 0,03$ mg de MDA/kg, respectivamente. Os resultados mostraram que a linguiça fresca de frango incorporada com OE de cravo foi efetivamente protegida contra a oxidação lipídica durante os 45 dias de armazenamento congelado.

Os resultados obtidos de pH para as linguiças frescas de frango (controle e adicionadas dos OEs) durante o armazenamento a 7°C são apresentados na Figura 1.

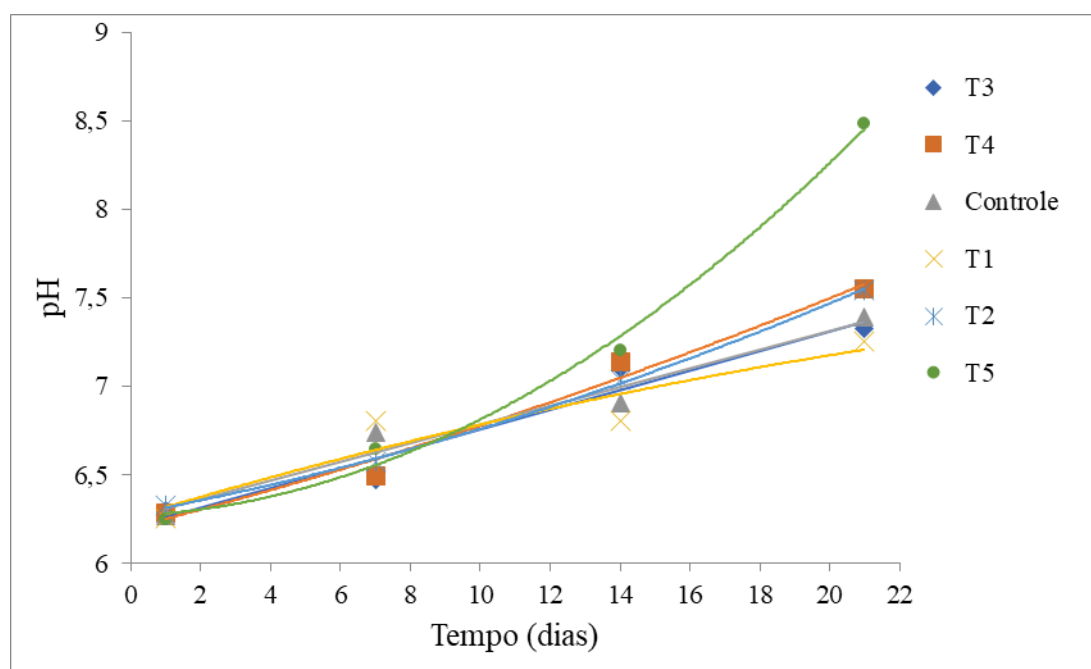


Figura 1- Valores de pH das linguiças frescas de frango controle e adicionada de óleos essenciais durante o armazenamento refrigerado. T1: *Pimenta dioica* [$10 \mu\text{L g}^{-1}$]; T2: *Pimenta dioica* [$40 \mu\text{L g}^{-1}$]; T3: *Eugenia caryophyllata* [$10 \mu\text{L g}^{-1}$]; T4: *Eugenia caryophyllata* [$40 \mu\text{L g}^{-1}$]; T5: combinação dos óleos de *Pimenta dioica* e *Eugenia caryophyllata* [$10 \mu\text{L g}^{-1}$].

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle no primeiro dia de análise, no entanto, a partir do dia 7, as amostras ($p < 0,05$) diferiram estatisticamente entre si. Observa-se o tratamento T5, com a combinação dos dois óleos essenciais, foi o que apresentou os maiores valores de pH nos dias 14 e 21, diferindo ($p < 0,05$) dos outros tratamentos.

O pH variou de 6,2 a 6,3 nas linguiças frescas de frango controle e adicionadas dos OEs na fase inicial, e no decorrer do período de armazenamento ocorreu aumento, atingindo valores de 7,3 a 8,5 ao final dos 21 dias. Em carne adequada para o consumo, o valor de pH normalmente é cerca de 5,8 a 6,2; quando maior que 6,4 indica início da decomposição da carne (Brasil, 1981). O aumento do pH reflete o grau de deterioração das amostras, e pode ser

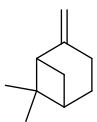
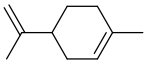
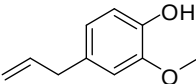
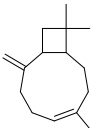
atribuído ao aumento da população microbiana, pois ao se multiplicarem produzem amônia, o que eleva o pH do meio (Krishnan et al., 2014).

Silveira et al. (2014) também observaram aumento no valor de pH de 6,1-6,2 até 6,4-6,6 em linguiça fresca toscana adicionada de OE de louro (*Laurus nobilis*) durante 14 dias de armazenamento, sendo esta variação de pH atribuída ao crescimento microbiano.

Análise de voláteis da linguiça por HS-CG/EM

Na análise do *headspace* por HS-CG/EM das linguiças frescas de frango foi possível detectar o β -pineno, limoneno, eugenol e o β -cariofileno (Tabela 4). Esses compostos são marcadores químicos do essencial de *Pimenta dioica* e *Eugenia caryophyllata* (Misharina; Alinkina; Medvedev, 2015; Xie et al., 2015). Nos tratamentos T1 e T2, adicionados do OE de *Pimenta dioica*, foi detectada a presença do β -pineno, limoneno e eugenol. Nos tratamentos adicionados do OE de *Eugenia caryophyllata* (T3 e T4), os compostos detectados foram o eugenol e β -cariofileno. Na amostra adicionada dos dois OEs (T5), foi possível detectar a presença dos quatro compostos. Assim, este resultado confirma que os OEs se mantiveram presentes na linguiça fresca de frango durante os 21 dias de armazenamento.

Tabela 4. Análise cromatográfica do *headspace* da linguiça fresca de frango acrescida de óleos essenciais de *Pimenta dioica* e *Eugenia caryophyllata*.

Nº	TR ^a (min)	Compostos	^b Estrutura molecular	^b Fórmula molecular	Íons característicos (<i>m/z</i>)	Amostras detectadas
1	7,1	β -Pineno		C ₁₀ H ₁₆	136(<i>M</i> ⁺ 5), 93(100), 92(26), 79(17), 77(17), 69(60), 67(12), 65(6), 55(3), 53(11), 136(<i>M</i> ⁺ 36), 121(34), 107(30), 105(11), 95(11), 94(34), 93(95), 92(30), 91(38), 68(100)	T1, T2, T5
2	8,4	Limoneno		C ₁₀ H ₁₆	164 (<i>M</i> ⁺ 100), 149(36), 137(20), 133(19), 131(19), 104(20), 103(32), 91(27), 77(30), 55(12), 204(<i>M</i> ⁺ 20), 189(43), 175(15), 121(35), 120(46), 119(50), 109(20), 107(53), 106(35), 105(72)	T1, T2, T5
3	21,5	Eugenol		C ₁₀ H ₁₂ O ₂		T1, T2, T3, T4, T5
4	24,3	β -Cariofileno		C ₁₅ H ₂₄		T3, T4, T5

^aTempo de retenção em minutos. ^bEstrutura molecular e ^bFórmula molecular, informações retiradas na biblioteca NITS 2.0; T1: *Pimenta dioica* [10 μ L g⁻¹]; T2: *Pimenta dioica* [40 μ L g⁻¹]; T3: *Eugenia caryophyllata* [10 μ L g⁻¹]; T4: *Eugenia caryophyllata* [40 μ L g⁻¹]; T5: combinação dos óleos de *Pimenta dioica* e *Eugenia caryophyllata* [10 μ L g⁻¹]. Crédito de imagens: Francine Souza Alves da Fonseca.

CONCLUSÕES

Os OEs de cravo e pimenta-da-jamaica mostraram-se efetivos sobre a estabilidade oxidativa da linguiça, permanecendo na linguiça frescal de frango durante o armazenamento. No entanto, eles não foram efetivos em relação à atividade antimicrobiana, uma vez que a contagem de coliformes aumentou progressivamente durante o período de armazenamento. Os OEs de cravo e pimenta-da-jamaica apresentam potencial para serem utilizados no controle da oxidação lipídica em produtos cárneos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4th edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007. 803 p.
- AFFONSO, R. S. et al. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.
- AGUIAR, M. C. S. A. et al. Volatile compounds from fruits of *Butia capitata* at different stages of maturity and storage. **Food Research International**, v.62, p.1095- 1099, 2014.
- AHMAD, S.; SRIVASTAVA, P. K. Quality and shelf life evaluation of fermented sausages of buffalo meat with different levels of heart and fat. **Meat Science**, v. 75, n. 4, p. 603-609, 2007.
- ALCANTARA, M. et al. Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.6, n.1, p. 1-20, 2012.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 2001. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: APHA. 676 p.
- AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10835-10847, 2013.
- BERALDO, C. et al. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 4, p. 436-440, 2013.
- BOTTERWECK, A. A. et al. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 1, 599-605, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Portaria nº 01, de 07 de outubro de 1981. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF.
- BRYAN, N. S. et al. Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: An updated review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 10, p. 3646-3665, 2012.
- CARDOSO, A. L. S. P. et al. Pesquisa de *Salmonella* spp, coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. **Higiene Alimentar**, v. 19, p. 144-150, 2005.

CARDOSO, K. F. G. et al. Pesquisa de Salmonella e coliformes termotolerantes em cortes de frango obtidos no comércio de Botucatu/SP. **Higiene Alimentar**, v. 23, n. 178/179, p. 165-168, 2009.

CHAIKIN, K. et al. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida species*. **Mycoses**, v. 50, n. 5, p. 403–406, 2007.

DIMA, C. et al. Microencapsulation of essential oil of pimento [*Pimenta dioica* (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 22, p. 203-211, 2014.

DUTRA, C. B.; RATH, S.; REYES, F. G. R. Nitrosaminas voláteis em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 1, p. 111-120, 2007.

FIROUZI, R. et al. Effects of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in barbecued chicken. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 11, p. 2626-2630, 2007.

GHARAVI, N.; HAGGARTY, S.; EL-KADI, A. O. Chemo protective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. **Current Drug Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2007.

GÜLÇİN, I. Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure–Activity Relationship Study. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 9, p. 975-985, 2011.

HONIKEL, K.-O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, v. 78, n. 1-2, p. 68–76, 2008.

KRISHNAN, K. R. et al. Bio protection and preservation of raw beef meat using pungent aromatic plant substances. **Journal of the Science of Food and agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2456-2463, 2014.

LI, Y. et al. Copper redox-dependent activation of 2-tert-butyl(1,4)hydroquinone: formation of reactive oxygen species and induction of oxidative DNA damage in isolated DNA and cultured rat hepatocytes. **Mutation Research**, v. 518, n. 2, p. 123-133, 2002.

LIMA JÚNIOR, D. M. et al. Oxidação Lipídica e qualidade da carne ovina. **Acta Veterinária Brasileira**, v.7, n.1 p.14-28, 2013.

LV, F. et al. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 3057-3064, 2011.

MARIUTTI, L. R.; BRAGAGNOLO, N. Lipid oxidation of chicken meat and the impact of the addition of sage (*Salvia officinalis*, L.) and garlic (*Allium sativum*, L.) as natural antioxidants. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 1-11, 2009.

MIN, B. et al. Endogenous factors affecting oxidative stability of beef loin, pork loin, and chicken breast and thigh meats. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 6, p. 439-446, 2008.

MISHARINA, T. A.; ALINKINA, E. S.; MEDVEDEVA, I. B. Antiradical properties of essential oils and extracts from clove bud and pimento. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 119–124, 2015.

OLIVEIRA, R. A. et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

OPARA, E. I.; CHOCHAN, M. Culinary Herbs and Spices: Their Bioactive Properties, the Contribution of Polyphenols and the Challenges in Deducing Their True Health Benefits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 10, p. 19183-19202, 2014.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

PADMAKUMARI, K. P.; SASIDHARAN, I.; SREEKUMAR, M. M. Composition and antioxidant activity of essential oil of pimento (*Pimenta dioica* (L) Merr.) from Jamaica. **Natural Product Research**, v. 25, n. 2, p. 152-160, 2011.

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

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

SHAN, B. et al. Antibacterial and antioxidant effects of five spice and herb extracts as natural preservatives of raw pork. **Journal of the Science of Food and agriculture**, v. 89, n. 11, p. 1879-1885, 2009.

SHARMA, H. et al. Use of various essential oils as bio preservatives and their effect on the quality of vacuum packaged fresh chicken sausages under frozen conditions. **Food Science and Technology**, v. 81, p. 118-127, 2017.

SHEARD, P. R. et al. Shelf life and quality of pork products with raised n-3 PUFA. **Meat Science**, v. 55, n. 2, p. 213-221, 2000.

SILVEIRA, S. M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 °C. **Food Science and Technology**, v. 59, p. 86-93, 2014.

SINDELAR, J. J.; MILKOWSKI, A. L. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. **Nitric Oxide**, v. 26, n. 4, p. 259-266, 2012.

SOARES, A. L. et al. Lipid oxidation and fatty acid profile related to broiler breast meat color abnormalities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 6, p. 1513-1518, 2009.

TERRA, N. N.; BRUM, M. A. R. **Carne e seus derivados: Técnicas de controle de qualidade**. São Paulo: Nobel, 1988, 119 p.

WEISS, J. et al. The antimicrobial paradox: Why preservatives lose activity in food. **Current Opinion in Food Science**, v. 4, p. 69-75, 2015.

XIE, Y. et al. Antitermitic and antifungal activities of eugenol and its congeners from the flower buds of *Syzygium aromaticum* (clove). **Industrial Crops Products**, v. 77, n. 1, p. 780-786, 2015.

YILDIZ-TURP, G.; SERDAROGLU, M. Effects of using plum puree on some properties of low fat beef patties. **Meat Science**, v. 86, n. 4, p. 896-900, 2010.

ZHANG, L.; LOKESHWAR, B. L. Medicinal Properties of the Jamaican Pepper Plant *Pimenta dioica* and Allspice. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 14, p. 1900-1906, 2012.

ZENGİN, H.; BAYSAL, A. H. Antioxidant and antimicrobial activities of thyme and clove essential oils and application in minced beef. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 1261-1271, 2015.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observou-se que os OEs de pimenta-da-jamaica e cravo apresentaram atividade antioxidante muito forte, com IAA > 2. Sendo esta atividade atribuída ao composto majoritário presente nesses dois OEs, o eugenol. O OE de erva-baleeira apresentou fraca atividade antioxidante nas concentrações testadas, IAA < 0,5.

Quanto à atividade antimicrobiana, nos testes *in vitro*, observou-se que o OE de pimenta-da-jamaica apresentou CBM de 5 µg mL⁻¹ e 40 µg mL⁻¹ para *E. coli* e *S. Choleraesuis*, respectivamente, e CIM de 20 µg mL⁻¹ para *S. aureus*. O OE de cravo-da-índia apresentou os melhores resultados de inibição, apresentando efeito bactericida sobre todas as estirpes testadas, sendo necessárias concentrações de 5 µg mL⁻¹, 10 µg mL⁻¹ e 40 µg mL⁻¹ para provocar a morte das cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *S. Choleraesuis*, respectivamente. O OE de erva-baleeira não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas.

Os OEs de cravo e pimenta-da-jamaica mostraram-se efetivos sobre a estabilidade oxidativa da linguiça frescal de frango durante os 21 dias de armazenamento. Todos os tratamentos adicionados dos OEs apresentaram valores de TBARS significativamente ($p < 0,05$) inferiores ao controle. No entanto, os OEs não foram efetivos na estabilidade microbiológica das linguiças frescas de frango, uma vez que a contagem de coliformes aumentou progressivamente durante o período de armazenamento e apenas os tratamentos adicionados de 40 µL g⁻¹ de cravo e o tratamento adicionado dos dois OEs que não apresentaram crescimento de *Salmonella* sp.

Na realização do teste de *headspace*, observou-se que o OE permaneceu na linguiça frescal de frango durante o período avaliado, pois foram detectados nos tratamentos os compostos majoritários presentes nos OEs de cravo e pimenta-da-jamaica.

De acordo com os resultados, pode-se concluir que os OEs de cravo e pimenta-da-jamaica apresentam potencial para serem utilizados como uma fonte antioxidante natural na indústria de alimentos para controlar a oxidação lipídica em produtos cárneos.