UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

ELABORAÇÃO DE LINGUIÇA FRESCAL DE PEIXE: USO DE ÓLEO ESSENCIAL COMO AROMATIZANTE E ANTIMICROBIANO NATURAL

PAULO SÉRGIO PEDROSO COSTA JÚNIOR
Bacharel em Biologia

CRUZ DAS ALMAS
BAHIA - BRASIL
2016

PAULO SÉRGIO PEDROSO COSTA JÚNIOR

ELABORAÇÃO DE LINGUIÇA FRESCAL DE PEIXE: USO DE ÓLEO ESSENCIAL COMO AROMATIZANTE E ANTIMICROBIANO NATURAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, sob orientação da professora Dra. Norma Suely Evangelista-Barreto, como parte das exigências do Curso de Graduação de Bacharelado em Biologia, para obtenção do título de Bacharel em Biologia.

CRUZ DAS ALMAS
BAHIA - BRASIL
2016

PAULO SÉRGIO PEDROSO COSTA JÚNIOR

ELABORAÇÃO DE LINGUIÇA FRESCAL DE PEIXE: USO DE ÓLEO ESSENCIAL COMO AROMATIZANTE E ANTIMICROBIANO NATURAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, sob orientação da professora Dra. Norma Suely Evangelista-Barreto, como parte das exigências do Curso de Graduação de Bacharelado em Biologia, para obtenção do título de Bacharel em Biologia.

APROVADO:

Marcia Luciana Cazetta – DS
UFRB

Soraia Barreto Aguiar Fonteles – DS
UFRB

Norma Suely Evangelista-Barreto – DS
Orientador
UFRB

Aos meus pais, Luisa e Sérgio
A minha avó Maria Santiago (in memorian)
Aos meus irmãos, Ana Paula e Lucas.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades na vida, sem Ele nada seria.

A minha mãe, Luisa Dias pelo amor incondicional, paciência e estímulo aos estudos.

Ao meu pai, Paulo Sérgio por todo o ensinamento, dedicação e apoio.

Aos meus irmãos, Ana Paula e Lucas, que com pequenas palavras me dão força para enfrentar todos os desafios sem desanimar.

A minha avó Maria Santiago (*in memorian*), que por todos esses anos foi o meu porto seguro. Vó, suas orações foram essenciais para minha vitória.

A minha tia Jacira, que desde o início desta caminhada esteve ao meu lado, me apoiando como seu próprio filho.

A toda a minha família, em especial a Juliana, Murilo, Tereza, Luciano e Miriam, que tem sido a minha base de confiança, respeito e simplicidade.

As minhas três marias: Erika, Jiscele e Ruanna, que me mostraram o verdadeiro significado de amizade.

A todos os amigos que conquistei durante a graduação, em especial à Aldo, Amanda, Ciça, Gabriel, Leandro, Rafael, Sara, Tiago, ao pessoal da república Cafofo, Armengadinho, ao grupo UFRBxx e Maravilindos; vocês foram o melhor presente que a universidade me deu.

Agradeço também aos meus antigos amigos, que nunca se fizeram ausentes, apesar da distância.

A professora Dra. Norma Suely Evangelista-Barreto pela orientação, paciência, confiança e ensinamentos, mesmo em momentos delicados.

As minhas co-orientadoras Brenda Borges e Marly Silveira, pelo incentivo e amizade constante.

A toda equipe do LABMAA, pelo carinho, ajuda, companheirismo e alegria, indispensáveis durante todos esses anos e que sempre lembrarei com muita saudade.

A todos os professores do Curso de Bacharelado em Biologia pelos valiosos ensinamentos.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB pela oportunidade de realização do Curso.

À PROPAAE, CNPq e UFRB pelo suporte financeiro.

E à todos aqueles que não foram citados mas de alguma forma contribuíram para a concretização desde sonho, muito obrigado!

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1. Teste de suscetibilidade dos óleos essenciais para bactérias Gram-negativas (*Vibrio cholerae, Salmonella* Enteretidis e *Escherichia coli*) e Gram-positivas (*Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) após 24 horas de incubação.....32

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de orégano, cravo, manjericão, noz moscada e louro encontrada para bactérias Gram-negativas (*V. cholerae, S.* Enteretidis e *E. coli*) *e* Gram-positivas (*L. monocytogenes, S. aureus* e *B. cereus*) 33

CAPITULO II

Tabela 1. Matéria prima e ingredientes para a elaboração da linguiça de cação frescal 44

Tabela 2. Tratamentos a serem utilizados na linguiça de cação frescal 45

Tabela 3. Contagem de bactérias psicotróficas em linguiça de cação frescal com o óleo essencial de orégano em sua formulação para verificação do tempo de prateleira, armazenadas à 7ºC por 20 dias.....49

Tabela 4. Desenvolvimento de *Escherichia coli* adicionada intencionalmente em amostras de linguiça de cação frescal com o óleo essencial de orégano, armazenadas à 7ºC por 72 horas 50

Tabela 5. Média do índice de aceitabilidade dos atributos e global da linguiça de cação frescal com o óleo essencial de orégano em sua formulação.....51

Tabela 6. Composição centesimal (%) da linguiça de cação frescal com o óleo essencial de orégano em sua formulação.....52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação multidimensional do perfil de atributos sensoriais dos tratamentos da linguiça de cação frescal 51

Figura 2. Valores da escala de atitude de consumo dos tratamentos da linguiça de cação frescal 52

LISTA DE ABREVIATURAS

µ	Mícron
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CO_2	Dióxido de carbono
FAO	Food and Agriculture Organization
mL	Mililitro
$NaNO_2$	Nitrito de sódio
$NaNO_3$	Nitrato de sódio
NMP	Número Mais Provável
pH	Potencial hidrogeniônico
UFC	Unidades formadoras de colônia
WHO	World Health Organization
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
BPC	Bactérias Psicotróficas Cultiváveis
ATP	Adenosina Trifosfato
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
DVA	Doenças Veiculadas por Alimentos
EC	*Escherichia coli*

SUMÁRIO

RESUMO viii
ABSTRACT ix
1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 3
2.1. Objetivo geral 3
2.2. Objetivos específicos 3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4
3.1. Produção de Pescado 4
3.2. Composição quimica do pescado 5
3.3. Conservação do pescado 6
3.4. O uso de aditivos quimicos e seus riscos 7
3.5. Antimicrobianos naturais 8
3.6 Especiarias e óleos essenciais 10
3.7 Linguiça de peixe 11
3.8 Microrganismos deteriorantes e patogênicos em embutidos 12
3.9 Análises fisico-quimicas 15
3.10 Análise sensorial 16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 17

CAPITULO I - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE DIFERENTES ESPECIARIAS FRENTE A MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS E DETERIORANTES 26
1. ARTIGO I 27
2. RESUMO 27
3. ABSTRACT 27
4. INTRODUÇÃO 28
5.MATERIAL E MÉTODOS 29
5.1 Microrganismos 29
5.2 Óleos essenciais 29
5.3 Teste de suscetibilidade *in vitro* 29
5.4 Determinação da concentração inibitória minima (CIM) 30
5.5 Determinação da concentração bactericida minima (CBM) 31
6. RESULTADOS 31

6.1 Teste de suscetibilidade *in vitro* 31
6.2 Concentração inibitória minima (CIM) 32
6.3 Concentração bactericida minima (CBM) 33
7. DISCUSSÃO 34
8. CONCLUSÕES 37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 38

CAPITULO II - LINGUIÇA DE PEIXE TIPO FRESCAL ADCIONADA DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO: CARACTERISTICAS MICROBIOLÓGICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAL 41
1. ARTIGO II 42
2. RESUMO 42
3. ABSTRACT 42
4. INTRODUÇÃO 43
5.MATERIAL E MÉTODOS 44
5.1 Elaboração da linguiça frescal de peixe 44
5.2 Processamento das amostras 45
5.3 Análises microbiológicas 45
5.4 Análise sensorial - Teste de aceitação 46
5.5 Análises físico-quimicas 47
5.5.1 Determinação de Umidade 47
5.5.2 Determinação de Cinzas 47
5.5.3 Determinação de Lipídios 48
5.6 Análise estatistica 48
6. RESULTADOS 48
6.1 Análises microbiológicas 48
6.2 Análise sensorial - Teste de aceitação 50
6.3 Análises físico-quimicas 52
7. DISCUSSÃO 53
8. CONCLUSÕES 56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 56
CONSIDERAÇÕES FINAIS 59
ANEXOS 60

RESUMO

COSTA JÚNIOR, PAULO SÉRGIO PEDROSO, Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, julho de 2016. Elaboração de linguiça frescal de peixe: uso de óleo essencial como aromatizante e antimicrobiano natural. Orientador: Norma Suely Evangelista-Barreto. Co-orientador: Brenda Borges Vieira.

O pescado é um importante componente da dieta diária de muitos países que tem o seu consumo aumentado nos últimos anos no Brasil. A oferta de produtos derivados do pescado e a diversificação na linha de processamento contribuem para o aumento desse consumo. A utilização de produtos naturais na substituição de aditivos químicos também tem crescido ultimamente, e as especiarias têm se mostrado uma boa alternativa na formulação de embutidos cárneos, dentre eles, a linguiça. O objetivo principal desse trabalho foi elaborar linguiça frescal com carne de cação adicionada de óleo essencial de orégano. O trabalho foi dividido em dois capítulos, o primeiro que tem como objetivo verificar o potencial antimicrobiano de diferentes óleos essenciais e o segundo que visa a análise das características microbiológicas, físico e química e sensoriais do embutido elaborado com o óleo essencial que apresentou maior eficiência na primeira etapa. Para isto, foi feita a avaliação e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de cinco óleos essenciais (cravo, louro, manjericão, noz moscada e orégano) frente a seis bactérias patogênicas e deteriorantes Gram-negativas (*Escherichia coli, Salmonella* e *Vibrio cholera*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes e Bacillus cereus*). O óleo essencial de orégano evidenciou forte atividade antibacteriana (CIM 50 – 800 μg/mL), seguido do cravo (CIM 800 – 3200 μg/mL), com atividade moderada para todos os microrganismos. Os outros óleos apresentaram baixa ação (CIM 400 – 3200 μg/mL), não apresentando atividade sobre todos as bactérias. Desta forma o óleo essencial de orégano apresentou melhor atividade antibacteriana, sendo o escolhido para ser usado na etapa de formulação do embutido. A linguiça de cação foi elaborada contendo 0,08 e 0,16% de óleo essencial de orégano, armazenada à 7ºC durante 20 dias, verificado o tempo de prateleira e a aceitação sensorial do produto. A linguiça se mantém viável para o consumo quanto aos parâmetros microbiológicos e físico-químicos por até 16 dias em temperatura de refrigeração. No entanto, o sabor intenso do óleo essencial de orégano comprometeu a aceitação do produto.

Palavras-chave: Embutidos; Especiarias; Orégano.

ABSTRACT

COSTA JÚNIOR, PAULO SÉRGIO PEDROSO, Bachelor of Biology, Federal University of Bahia Reconcavo, July 2016. Preparation of fresh sausage fish tuscan type: use of essential oil as a flavoring and natural antimicrobial. Advisor: Norma Suely Evangelista-Barreto. Co-advisor: Brenda Borges Vieira.

Fish is an important component of the daily diet of many countries that have increased their consumption in recent years in Brazil. The supply of products derived from fish and diversification in processing line contribute to the increase of consumption. The use of natural products in place of chemical additives has also grown lately, where spices have been shown to be a good alternative to meat embedded formulation, including the Tuscan type sausage. The main objective of this work was to prepare Tuscan fresh sausage with added oregano essential oil. The work was divided into two chapters, the first that aims to determine the antimicrobial potential of different essential oils and the second aimed at the analysis of microbiological, physical and chemical and sensory embedded prepared with the essential oil with the highest efficiency first step. For this, the evaluation and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of five essential oils was made (cloves, bay leaf, basil, nutmeg and oregano) against six pathogenic and spoilage bacteria, Gram-negative (*Escherichia coli*, *Salmonella* and *Vibrio cholerae*) and Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*). The essential oil of oregano showed strong antibacterial activity (MIC 50-800 μg/ml), followed by clove (CIM 800-3200 μg/ml), with moderate activity for all microorganisms. Other oils had low action (CIM 400-3200μg/ml), showing no activity against all bacteria. Thus the essential oil of oregano showed better antibacterial activity, being chosen to be used in embedded formulation stage. The Tuscan type cation sausage was prepared containing 0.08 and 0.16% essential oil of oregano, stored at 7°C for 20 days, checked the shelf-life and the acceptance of the product. The sausage remains viable for use as the microbiological and physico-chemical parameters for up to 16 days at refrigerated temperature. However, the intense flavor of the essential oil of oregano committed to product acceptance.

Keywords: Embedded; Spices; Oregano

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, é perceptível a mudança do interesse alimentar do consumidor, buscando cada vez mais alimentos que sejam de rápido preparo e com boa qualidade nutricional. Por isso, a oferta de produtos derivados do pescado e a diversificação na linha de processamento contribuem para o aumento do consumo de peixe no país, além do incentivo a pesquisa de novos produtos, mostrando ser uma boa alternativa para pessoas que procuram hábitos saudáveis e com maior segurança alimentar (SANTOS, 2004).

As linguiças constituem os derivados cárneos fabricados em maior quantidade no Brasil, uma vez que para a sua elaboração não é exigida tecnologia sofisticada, sendo utilizados poucos e baratos equipamentos. Por este motivo, as pequenas agroindústrias geralmente iniciam suas atividades com a fabricação de linguiças (BROMBERG, 2002).

Considerando que a demanda de produtos alimentícios está sendo cada vez maior, principalmente para aqueles com proteína de alto valor nutricional e valor tecnológico agregado, a formulação de produtos à base de pescado, como a produção de embutidos, utilizando-se espécies de baixo valor comercial ou dos subprodutos de sua industrialização, tem se tornado uma alternativa promissora, afim de agregar valor ao produto (VAZ, 2005).

A utilização de produtos naturais na substituição de aditivos químicos vem crescendo bastante, sendo que as especiarias têm se mostrado uma boa alternativa na formulação de embutidos cárneos, entre eles a linguiça tipo toscana. A propriedade conservante das especiarias está relacionada com a presença de compostos com ação antimicrobiana, podendo ser utilizadas no combate a microrganismos deteriorantes (TRAJANO et al., 2009).

A principal fonte de contaminação e deterioração dos alimentos a partir dos microrganismos são as bactérias, pois atuam sobre diversos tipos de substratos, temperaturas, pH e condições ambientais (SACCHETTI et al., 2004). Tendo em vista os problemas de resistência de microrganismos aos antimicrobianos convencionais, e diante da atual tendência do mercado em utilizar produtos ecologicamente seguros, o emprego de óleos essenciais para a conservação de alimentos e controle fitossanitário vem sendo amplamente estudado, proporcionando o desenvolvimento de técnicas que procurem reduzir os efeitos negativos de microrganismos causadores de prejuízos às indústrias alimentícias (PEREIRA et al., 2008).

Os óleos essenciais vem sendo utilizados como conservantes de alimentos há muito tempo, despertando grande interesse das indústrias, pois quando comparados aos condimentos em pó, garantem maior vida de prateleira, manutenção do aroma e menor risco de contaminação microbiológica, garantindo a qualidade do produto processado (ARAUJO, 1995).

Os óleos essenciais são provenientes do metabolismo secundário das plantas, normalmente produzidos por células secretoras, ou grupos de células, sendo encontrados em diversas partes do vegetal, como folhas, talos, casca ou frutos, apresentando composições diversas. Eles são definidos como líquidos oleosos voláteis dotados de aroma forte, quase sempre agradável, podendo ser extraídos das plantas através de processos específicos, sendo o mais recorrente a destilação por arraste de vapor de água (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

O alecrim, o orégano e o cravo da índia são alguns dos condimentos e especiarias com significativas propriedades antioxidantes e antimicrobianas em produtos alimentícios. Além disso, eles também têm a capacidade de realçar o sabor e o *flavor* dos alimentos (TERRA, 2004).

Diante disto, a utilização de óleos essenciais como antimicrobiano natural na elaboração de embutidos cárneos, como linguiça frescal, visa promover maior segurança ao consumidor ao agir como inibidor do crescimento bacteriano, melhorando a qualidade sanitária do produto, além da possibilidade de elaboração de um novo alimento funcional promovendo uma ampla diversidade de sabores e aromas, característico de embutidos cárneos. Além disso, a utilização do pescado como principal matéria prima visa promover a diversificação e elaboração de novos produtos à base de pescado como uma forma de agregar valor à espécimes de baixo valor econômico ou que não alcançam tamanho comercial.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Verificar o potencial antimicrobiano de óleos essenciais de especiarias para substituição de aditivos químicos na elaboração de linguiça frescal de peixe.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana e determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de louro, cravo, manjericão, noz moscada e orégano frente a diferentes patógenos de importância para os alimentos;
- Selecionar o óleo essencial que apresentar melhor resposta antimicrobiana para a elaboração da linguiça frescal de peixe;
- Monitorar os parâmetros físico-químicos do produto;
- Verificar a segurança microbiológica do tempo de prateleira da linguiça mantidas à 7ºC;
- Realizar teste de aceitação da linguiça de peixe adicionado de óleo essencial.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção de pescado

Em um mundo onde mais de 800 milhões de pessoas ainda sofrem de desnutrição crónica, sendo que a previsão de aumento da população mundial é de dois bilhões até o ano de 2050, enfrentamos o imenso desafio de alimentar todas estas pessoas, além de proteger o planeta e os seus recursos naturais para as gerações futuras. A partir disto, destaca-se a importância da pesca e aquicultura na produção de pescado para contribuir com a diminuição da fome mundial (FAO, 2014).

O pescado é a carne mais demandada mundialmente e a de maior valor de mercado (SIDONIO et al., 2012). Esta demanda vem crescendo de forma acelerada em decorrência do aumento populacional e da busca por alimentos mais saudáveis (FAO, 2010). Assim, o aumento do consumo per capita de pescado será cada vez mais dependente da disponibilidade dos produtos da aquicultura e sua capacidade de adequação às exigências do mercado consumidor (ROCHA et al., 2013).

A aquicultura é uma prática tradicional de longa data, encontrada em várias culturas pelo mundo, sendo responsável por quase metade da produção do pescado mundial. É definida como uma atividade multidisciplinar, referente ao cultivo de diversos organismos aquáticos, incluídos neste contexto plantas aquáticas, moluscos, crustáceos e peixes, principalmente organismos utilizados para a alimentação humana, sendo que a intervenção ou manejo no processo de criação desses organismos é imprescindível para o aumento da sua produção (OLIVEIRA, 2009).

De acordo com a FAO (2014), a produção global de pescado em 2012 foi de 158 milhões de toneladas, dos quais 136,2 milhões foram utilizados para o consumo humano. Desses, 51,1% tiveram origem na pesca, enquanto 48,9% tiveram origem na aquicultura. Em 2013, as previsões do consumo de pescados aproximaram-se de 20 kg por habitante por ano, com produção estimada de mais de 160 milhões de toneladas. Assim, a tendência dos últimos anos deve continuar nas próximas décadas, aumentando cada vez mais o consumo do pescado (FAO, 2013).

No Brasil, em 2014, a produção total foi de, aproximadamente, 2 milhões de toneladas de pescado conforme dados divulgados pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). Anualmente o programa “Mais Pesca e Aquicultura” do MPA cria metas para consumo de pescado por habitante/ano. Em 2011, o consumo de 9 kg de pescado por

habitante por ano foi alcançada com pelo menos um ano de antecedência. O novo dado se aproxima do patamar considerado ideal pela Organização Mundial de Saúde (12 kg por habitante/ano), tendo aumentado nos últimos anos para 11,17 kg por habitante por ano (BRASIL, 2013), valor ainda abaixo do mínimo recomendado, mas 14,5% a mais do que em relação ao ano anterior (FAO, 2012).

O Brasil é um país de grande potencial para a aquicultura pelas condições naturais, pelo clima favorável e pela sua matriz energética (ROCHA et al., 2013), possuindo características regionais bastante específicas no campo social, econômico e geográfico, com um imenso mercado consumidor em potencial para produtos provenientes da aquicultura (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008).

A aquicultura apresenta números oficiais que apontam o Sul e o Nordeste como as principais regiões produtoras de pescado, correspondendo juntas a 61% da produção aquícola nacional. As regiões Sudeste e Centro-Oeste são responsáveis por 30% da produção, a região Norte tem a menor participação na produção nacional, com 9%, segundo estatísticas oficiais publicadas pelo Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2010; KUBITZA et al., 2012).

Na Bahia foi registrada uma queda de 19,9% na produção da pesca marinha, que passou de 74.043,0 t em 2010 para 59.293,0 t em 2011, caindo da terceira para a quarta posição no ranking desta modalidade no país (MPA, 2011).

3.2 Composição química do pescado

A carne de peixe é muito nutritiva, sendo rica em proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais. É um alimento de baixa concentração de gordura, além de possuir elevados teores de ômega-3, trazendo benefícios à saúde humana, destacando-se nutricionalmente de outros alimentos de origem animal. A água é o componente de maior quantidade do peso total do peixe, representando de 53 a 80%, por isso apresenta grande influência na qualidade da carne afetando sua coloração, suculência, textura e sabor (SENAI-DR, 2007).

O pescado representa uma das principais fontes de proteína na alimentação humana, caracterizado por sua elevada digestibilidade, acima de 95%, superior à das carnes em geral, e alto valor biológico, sendo o alimento mais saudável do ponto de vista nutritivo, com o teor de proteínas alto, variando entre 15% a 25% (ORDONEZ, 2005; GERMANO; GERMANO, 2008).

O pescado é composto basicamente por água, lipídios e proteínas, cujas quantidades variam entre as espécies. Contêm grandes quantidades de vitaminas lipossolúveis A e D, minerais, cálcio, fósforo, ferro, cobre e selênio. A composição lipídica é considerada de elevada proporção de ácidos graxos poli-insaturados, mais de 40%, o que impacta tanto na saúde, quanto na tecnologia aplicada durante o processamento destes alimentos. As proteínas contêm todos os aminoácidos essenciais para o ser humano e têm elevado valor biológico. Adicionalmente, são excelentes fontes de aminoácidos como a lisina, metionina e cisteína (FAO, 2013).

Por definição, o termo pescado abrange, segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal, por meio do Decreto nº 30.691, de 1952: peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios e quelônios, habitantes dos meios aquáticos de origem fluvial, marinha ou estuarina, desde que destinados à alimentação humana (BRASIL, 1952; GONÇALVES, 2011).

Os benefícios nutricionais provenientes do consumo de pescados são atribuídos à presença dos ácidos graxos ômega-3, principalmente EPA (eicosapentaenoico) e DHA (docosaexaenoico). Entre os efeitos fisiológicos nos humanos, estão a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, hipertensão, inflamações em geral, asma, artrite, psoríase e vários tipos de câncer. O EPA relaciona-se principalmente com a proteção da saúde cardiovascular, e o DHA é considerado fundamental para o desenvolvimento do cérebro e sistema visual, associado à saúde materno infantil (PEREDA et al., 2005; ORDONEZ, 2005).

3.3 Conservação do pescado

O pescado necessita de cuidados adequados na sua manipulação, desde a captura até o consumo ou industrialização, pois sua composição de água, lipídios e proteínas favorece o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (ABREU et al., 2008). A carne do pescado, comparado com as outras carnes de origem animal, representa um dos alimentos mais perecíveis por apresentar pH próximo a neutralidade, elevada atividade de água nos tecidos, alto teor de nutrientes facilmente utilizáveis pelos microrganismos, acentuado teor de fosfolipídios e rápida ação destrutiva das enzimas presentes nos tecidos e nas vísceras dos peixes (SOARES; GONÇALVES, 2012).

Além disso, apresenta o conteúdo de aminoácidos livres e bases voláteis nitrogenadas relativamente alto quando comparado as outras carnes. O alto conteúdo de

compostos nitrogenados de baixo peso molecular, associado a outros fatores, os tornam extremamente sensíveis à microbiota deteriorante (VÁSCONEZ et al., 2009; CHAHAD et al., 2012). Entre os processos que podem levar à deterioração do pescado há a ação de enzimas autolíticas, a oxidação lipídica e a atividade bacteriana. Desses, os microrganismos constituem os principais responsáveis pelo surgimento das alterações da carne do pescado (RIBEIRO et al., 2009).

Desde a captura até a comercialização, o pescado fica sujeito a perdas de qualidade físico-química, sensorial e microbiológica, devido às condições de armazenamento a bordo e à natureza da sua composição, podendo haver alterações nas características químicas, físicas ou microbiológicas. Apesar de não causar doenças de origem alimentar, a deterioração do pescado é um processo metabólico que pode causar algumas alterações organolépticas indesejáveis, mudanças na sua aparência, sabor ou consistência (SOARES; GONÇALVES, 2012).

Como forma de minimizar ou retardar os processos de deterioração decorrentes em pescados, as indústrias vêm buscando melhorar as tecnologias de conservação dos alimentos para que, assim, se obtenha um produto final com a maior qualidade possível (SOARES; GONÇALVES, 2012).

3.4 O uso de aditivos químicos e seus riscos

Os alimentos que consumimos possuem um grande número de substâncias químicas que são essenciais para a manutenção da saúde humana, como vitaminas, minerais e proteínas. Porém, os alimentos também podem conter algumas substâncias potencialmente tóxicas, como micotoxinas, resíduos de pesticidas, aditivos e metais pesados que, em excesso, podem apresentar risco à saúde humana (JARDIM; CALDAS, 2009).

A mudança no hábito alimentar no Brasil, ocorrida nas últimas décadas, tem atraído a atenção dos órgãos reguladores e da comunidade científica, pois a substituição de alimentos in natura por alimentos processados vem contribuindo de forma contundente para o empobrecimento da dieta brasileira (SANDHI et. al., 2005). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pelo processo de registro de aditivos, pesticidas e drogas veterinárias e pela condução de avaliação do risco da exposição humana a estas substâncias e a contaminantes em alimentos (BRASIL, 2016).

Alimentos embutidos e enlatados apresentam conservantes para a manutenção das características sensoriais do produto, como a cor mais aproximada da carne original, além de uma vida de prateleira maior, tornando o produto mais atraente. Diversos aditivos podem ser utilizados para a conservação dos alimentos, como o ácido sórbico, carbonato de cálcio, benzoato de sódio, nitritos e nitratos (BRASIL, 2001).

O emprego de sais de nitrito e nitrato de sódio ou potássio em produtos embutidos de carne são os mais comuns, tendo por finalidade manter a cor, sabor e aroma dos produtos, além de atuar como agentes antimicrobianos e antioxidantes (TERRA; FRIES; TERRA 2004). Entretanto, o uso desses compostos é questionável devido ao seu efeito prejudicial à saúde humana quando utilizado em grandes quantidades ou a longo prazo, podendo acarretar sérios riscos à saúde humana, pela possibilidade de manifestações de efeitos tóxicos agudos e crônicos (MODENA; MEIRELLES; ARAÚJO, 2008).

O nitrito é mais tóxico do que o nitrato, tendo como principais sintomas a indução da formação da hemoglobina em metahemoglobina (impedindo que a hemoglobina exerça a função normal de transportar oxigênio), vasodilatação e relaxamento da musculatura lisa. Em doses inferiores observa-se, como sintomas principais, a vermelhidão da face e das extremidades do corpo, desconforto gastrointestinal e cefaleia (WILLETT, 2003; OLIVEIRA; ARAUJO; BORGO, 2005).

A principal preocupação do uso de nitritos e nitratos em alimentos é decorrente dos efeitos tóxicos por excesso na dieta e pela formação endógena de composto n-nitrosos como a n-nitrosodimetilamina e monometilnitrosamina, que apresentam efeitos carcinógenos, teratogênicos e mutagênicos (MARTINS; MÍDIO, 2000; SUGIMURA; WAKABAYASHI, 2003).

3.5 Antimicrobianos naturais

A conservação dos alimentos consiste em inibir a ação microbiológica assegurando as características de seu estado original, como os caracteres organolépticos, constituintes químicos e valor nutricional (EVANGELISTA, 2008). A escolha do conservante depende de vários fatores como as propriedades físicas e químicas do alimento, os agentes contaminantes como as leveduras, bolores e bactérias, e as condições de armazenamento. O conservador deve ser avaliado em função de sua ação contra tipos específicos de microrganismos, toxicidade, solubilidade, economicidade e sabor próprio (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

Os agentes antimicrobianos representam substâncias químicas produzidas por microrganismos ou de forma sintética com capacidade de inibir o crescimento de outros microrganismos (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). As plantas aromáticas e condimentos, ou ainda as chamadas especiarias, usadas em alimentos com fins aromatizantes, a partir da identificação de sua atividade antimicrobiana, podem ser utilizadas como conservantes de alimentos (KRUGER, 2006).

O uso de óleos essenciais de especiarias como agentes antimicrobianos naturais em produtos alimentícios pode ser considerado um adicional determinante para aumentar a segurança e a vida de prateleira dos alimentos (EBRAHIMI, 2008).

A atuação dos óleos essenciais como antimicrobianos naturais se deve a danos causados na membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, modificando a sua estrutura e destruindo a sua integridade, o que acaba por afetar a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos (SHYLAJA; PETER, 2004).

Os óleos essenciais alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática para íons de hidrogênio e potássio, provocando a interrupção dos processos vitais da célula, como por exemplo, o transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações que dependem de enzimas, resultando na perda do controle quimiosmótico da célula afetada, causando a morte bacteriana (DORMAN; DEANS, 2000).

Durante um estudo sobre a influência do carvacrol, que é um composto ativo presente em muitos óleos essenciais e extratos vegetais, sobre os parâmetros bioenergéticos em células vegetativas de *Bacillus cereus*, verificou-se que este composto reduziu significativamente o *pool* de ATP intracelular, sendo associado a uma mudança no potencial de membrana, devido a um aumento da permeabilidade da membrana a prótons e íons K+, o que levou à desestabilização de processos essenciais da célula e finalmente à morte celular (GALLUCCI et al., 2006).

A atividade antimicrobiana do carvacrol é devido à presença do grupamento hidroxila e de um sistema de elétrons localizados em sua molécula. Este age como um trocador de cátions, reduzindo o gradiente de prótons e consequentemente o pH da célula, causando um colapso na força próton-motriz. Como consequência, se tem menos síntese de ATP, levando à morte celular (ULTEE; BENNIK; MOEZLAAR, 2002).

Com isso, é possível se verificar que grande parte dos condimentos possuem propriedades antimicrobianas ativas, e mesmo quando utilizados em concentrações

moderadas, além de realçar o sabor, cheiro e coloração do alimento, pode aumentar a vida-de-prateleira do produto (TRAJANO et al., 2009).

3.6 Especiarias e óleos essenciais

Segundo a legislação vigente no Brasil, o Regulamento Técnico para Especiarias, Temperos e Molhos define especiarias como "produtos constituídos por partes (raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes, talos) de uma ou mais espécies vegetais, tradicionalmente utilizadas para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas" (BRASIL, 2005).

Os condimentos e especiarias foram amplamente utilizados por civilizações antigas para melhorar a palatabilidade de alimentos e bebidas. Os egípcios aproveitavam também as características preservativas destes temperos, utilizavando óleos essenciais de cravo, canela e cássia para a mumificação de seus mortos. A utilização de substâncias naturais, de origem vegetal, torna o alimento mais atrativo ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico, mesmo quando empregadas em concentrações relativamente elevadas (POZZATTI et al., 2009).

Por causa da toxicidade, a legislação vem exigido cada vez mais a diminuição da quantidade de alguns compostos químicos nos alimentos, assim como alternativas de produtos naturais para a comercialização como conservantes. No âmbito alimentar, especiarias vem sendo utilizadas desde a antiguidade no Oriente afim de promover coloração, cheiro e sabor à alimentos e bebidas, ou mascarar propriedades indesejadas em produtos cárneos, pois não existia um método eficiente de conservação (KOTZEKIDOU; GIANNAKIDIS; BOULAMATSIS, 2008).

O estudo em busca de compostos antimicrobianos naturais tem se intensificado com o propósito de serem aplicados na conservação de alimentos (BURT, 2004). Uma boa proposta como conservante natural de alimentos são os óleos essenciais extraídos de plantas, por sua diversidade de compostos antimicrobianos e por não apresentarem riscos à saúde dos consumidores (TRAJANO et al., 2009).

Os óleos essenciais (OE) estão presentes nas plantas como um produto natural e são definidos como parte do metabolismo vegetal composto, geralmente, por terpenos que estão associados ou não a outros componentes, cuja maioria, sendo voláteis, geram o odor do vegetal (BANDONI; CZEPAK, 2008). Estes compostos são constituídos, geralmente, por hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos,

peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos como enxofre (SIMÕES et al., 2007; BAKKALI et al., 2008).

As atividades biológicas antimicrobianas dos óleos essenciais estão diretamente correlacionadas com a presença de constituintes da planta com propriedades biológicas ativas (POZZATTI et al., 2009). Apesar de comprovado o potencial e efeito antimicrobiano de diversos OE contra uma vasta gama de microrganismos ao longo dos anos, o seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado (BURT, 2004; LIMA et al., 2006).

3.7 Linguiça de peixe

Segundo o regulamento técnico de identidade e qualidade (BRASIL, 2000) linguiça é definida, como "produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionado ou não de tecido adiposo, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, e submetido ao processo tecnológico adequado". Ainda segundo este regulamento, as linguiças frescais caracterizam-se por apresentar teores máximos de 70% de umidade, 30% de gordura e 0,1% de cálcio (em base seca), e um teor mínimo de 12% de proteína.

As linguiças constituem os derivados cárneos fabricados em maior quantidade no Brasil, uma vez que para a sua elaboração não é exigida tecnologia sofisticada, sendo utilizados poucos e baratos equipamentos. Por este motivo, as pequenas agroindústrias geralmente iniciam suas atividades com a fabricação de linguiças (BROMBERG, 2002).

Considerando que a demanda de produtos alimentícios está sendo cada vez maior, principalmente para aqueles com proteína de alto valor nutricional e valor tecnológico agregado, a formulação de produtos à base de pescado, como a produção de embutidos, utilizando-se espécies de baixo valor comercial ou dos subprodutos de sua industrialização, tem se tornado uma alternativa promissora, afim de agregar valor ao produto (VAZ, 2005).

Ultimamente as empresas produtoras de embutidos tem apresentado significativa expansão e alta competitividade, uma vez que o consumo de produtos cárneos como salsichas, linguiças, mortadelas, salames e outros, tem se tornado parte do hábito alimentar da maioria dos consumidores brasileiros (MELO FILHO; GUERRA, 1998).

Segundo Moreira (2005), um dos produtos que contribui para essa diversificação é o embutido emulsionado de pescado. Como qualquer outra forma de processamento, visa

melhorar as características do produto final, tendo como principal vantagem o aproveitamento maior da carne do pescado. Além disso, facilita o transporte e armazenamento, tornando possível que regiões distantes dos centros produtores tenham acesso à proteína de elevado valor nutricional.

Apesar da alta incidência de patógenos, os embutidos frescais são geralmente seguros, pois passam por tratamento térmico antes do consumo. Entretanto, as toxinfecções alimentares podem ocorrer pelo consumo do produto insuficientemente cozido ou contaminado após o cozimento, além do que, os microrganismos podem consumir determinados nutrientes presentes no pescado durante o seu desenvolvimento. Neste sentido, o risco do cozimento ser inadequado ou insuficiente pode existir em qualquer produto cárneo, o que é evidenciado pela incidência de toxinfecções causadas por microrganismos patogênicos tais como *Salmonella* sp e *Escherichia coli* em produtos geralmente considerados seguros, como salsichas e hambúrgueres (BASTOS, 2008).

A preocupação com uma alimentação mais saudável, menos calórica e com componentes funcionais motivou o estudo realizado por Cardoso, Mendes e Nunes (2008) os quais elaboraram uma linguiça substituindo parte da carne de porco por pescado, além de adicionar diferentes quantidades de fibra dietética. Os autores verificaram que foi possível produzir uma linguiça de peixe com baixo teor de gordura com textura e cor similares às linguiças suínas tradicionais. Diversos autores também desenvolveram estudos sobre a elaboração de linguiça a base de pescado, como Oksuz et al. (2008), López-Caballero et al. (2005), Raju, Shamasundar e Udupa (2003).

3.8 Microrganismos deteriorantes e patogênicos em embutidos

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) abrangem enfermidades do mais amplo espectro e, além de ser um problema crescente de saúde pública em todo o mundo, são resultado da ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos, toxinas de microrganismos, parasitas, substâncias químicas, objetos lesivos ou que contenham em sua constituição estruturas naturalmente tóxicas (BRASIL, 2015).

Essa contaminação pode ocorrer em qualquer fase do processo de produção até o consumo, principalmente através do meio ambiente, incluindo a poluição da água, solo ou ar (BRASIL, 2004). A ocorrência de DVA vem aumentando de modo significativo em nível mundial. Vários são os fatores que contribuem para a emergência dessas doenças,

entre os quais destacam-se: o crescente aumento das populações; a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala. Contribui, ainda, o deficiente controle dos órgãos públicos e privados quanto à qualidade dos alimentos ofertados às populações (BRASIL, 2010a).

O pescado vivo apresenta contaminação bacteriana principalmente na pele, brânquias e escamas, passando aos demais tecidos após a morte do animal. Desta forma, a manipulação indevida e a não utilização de medidas higiênicas durante o transporte, manuseio e conservação podem facilitar o desenvolvimento dos patógenos, presentes no próprio pescado ou provenientes do ambiente (FAO, 2010).

As bactérias patogênicas presentes no pescado podem ser divididas em dois grupos: bactérias do meio ambiente e as bactérias oriundas de contaminação. As bactérias do meio ambiente são *Bacillus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas* sp. e *Listeria* sp. Já as bactérias provenientes de contaminação são *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Shigella* (Costa, 2006).

O gênero *Vibrio* é formando por 130 espécies, sendo que em torno de 11 delas são reconhecidamente patogênicas para humanos (DSMZ, 2015). São pertencentes à família Vibrionaceae, definidos, morfologicamente, como bacilos não esporogênicos, finos ou com uma única curvatura rígida. São móveis e muitos têm um único flagelo polar quando se desenvolvem em meio líquido (SHINOZAKI-MENDES et al., 2005; REBOUÇAS, 2008; SANTIAGO et al., 2013).

Os vibrios são considerados os microrganismos mais importantes na aquicultura, pois podem atingir diversos organismos aquáticos, como peixes, crustáceos e moluscos (VANDENBERGHE et al., 2003). Dentre as principais doenças causadas por estes patógenos, destacam-se as manifestações gastrointestinais e extraintestinais, estas caracterizadas por infecção cutânea e otites, especialmente em manipuladores de alimentos, profissionais do ramo da pesca e mergulhadores (THOMPSON; IIDA; SWINGS, 2004; YENG; BOOR, 2004).

O gênero *Listeria* compreende nove espécies diferentes, no entanto, somente são consideradas patogênicas para humanos e animais as espécies *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* (BERTSCH et al., 2013; LANG; NEUHAUS; SCHERER., 2013; PAGADALA et al., 2012). *Listeria monocytogenes* representa uma preocupação constante para as indústrias de alimentos e órgãos oficiais de regulamentação, pois esta

espécie possui habilidade de sobreviver em condições adversas e tem capacidade para crescer em temperaturas de refrigeração, resistir ao congelamento e diversos antimicrobianos, tornando-se um dos microrganismos de grande importância entre os patógenos veiculados por alimentos, por meio do consumo de pescados (GANDHI; CHIKINDAS, 2007; GONÇALVES, 2011).

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, são Gram negativas, geralmente móveis, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, catalase positivas, oxidase negativas, desenvolvendo-se no intervalo de temperatura entre 5°C e 47°C, porém, apresentam crescimento ótimo na faixa de 35°C a 37°C (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Este gênero é composto por duas espécies *Salmonella enterica*, com seis subespécies e *Salmonella bongori* (BHOWMICK et al., 2011). Ressalta-se que existem mais de 2.500 sorovares considerados patógenos potenciais a animais e humanos (NORHANA et al., 2010).

A salmonelose é uma das principais zoonoses para a saúde pública em todo o mundo (LOURENÇO; REIS; VALLS, 2004), exteriorizando-se pelas suas características de endemicidade, alta morbidade e, sobretudo, pela dificuldade da adoção de medida no seu controle (GUERIN; VOLD; VILTSLAND, 2005). Devido a *Salmonella* encontrar-se cada vez mais envolvida em surtos de DVA, com efetiva participação do pescado, além da importância das medidas preventivas para evitar o risco de infecção da salmonelose na população humana, o controle desta doença é de grande interesse para a economia dos países em que ocorrem esses surtos (SHINOHARA et al., 2008).

Sthaphylococcus está presente nas cavidades orofaríngea e nasal, nas mãos, unhas, cabelos, pelos, além da pele e podem ser facilmente transmitidos aos alimentos se não forem adotadas práticas adequadas de higiene (WERTHEIM et al., 2005). Os manipuladores de alimento estão associados a 24% de todos os casos de enfermidades veiculadas por alimentos em países desenvolvidos, destacando-se dentre as bactérias envolvidas *S. aureus* (ARIAS-ECHANDI, 2000).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2013, no Brasil, *S. aureus* foi o segundo microrganismo mais relacionado a casos de surtos registrados entre os anos de 2000 e 2013. Foram 759 casos registrados, estando atrás somente da *Salmonella* spp., com 1522 casos registrados. A enterotoxina estafilocócica é termoestável e está presente no alimento mesmo após o cozimento, possibilitando desta

forma, a instalação de um quadro de intoxicação de origem alimentar (GÁRCIA-LÁZARO et al., 2010).

Escherichia coli é uma espécie bacteriana pertencente à família Enterobacteriaceae. São microrganismos Gram negativos, em forma de bastonetes, não esporulados e móveis, com presença de flagelos peritríquios. Possuem metabolismo respiratório e fermentativo, pois são anaeróbios facultativos, com temperatura ótima de crescimento a 37ºC. A sua presença em alimentos deve ser avaliado por indicar contaminação microbiana de origem fecal, portanto condições higiênicas insatisfatórias, e eventual presença de enteropatógenos (SCHEUTZ; STROCKBINE, 2005).

Escherichia coli não é um habitante natural da microbiota de peixes, porém tem sido isolada com frequência no intestino desses animais, pois ambientes aquáticos contaminados podem transmitir o microrganismo (GUZMÁN et al., 2004). Barbosa et al., (2014), analisando água e peixes de pesque pagues da Microbacia de Córrego Rico, Jaboticabal (SP) no Brasil, encontrou 115 estirpes de *E. coli*, entre as quais foram encontrados diversos sorogrupos como a EPEC (*E. coli* enteropatogênica) e EIEC (*E. coli* enteroinvasiva).

3.9 Análises físico-químicas

O conhecimento da composição e das propriedades dos diversos componentes nitrogenados é de grande importância, já que as características próprias dos músculos dependem, majoritariamente, da concentração e da proporção. A maior parte dos elementos nitrogenados do pescado constituem-se das proteínas (ORDONEZ, 2005). De acordo com sua solubilidade, as proteínas são divididas em sarcoplasmáticas, miofibrilares e insolúveis ou do estroma (PEREDA et al., 2005).

Os lipídeos exercem importante papel como fonte energética, constituinte de membranas celulares, nutrientes essenciais (ácidos graxos essenciais, vitaminas lipossolúveis, entre outras), substâncias controladas de metabolismo, substâncias isolantes (manutenção de temperatura, isolante de calor), protetor contra danos mecânicos externos (SOUZA et al., 2007).

Dependendo da época do ano, da dieta, temperatura, salinidade, espécie, sexo e da parte do corpo analisada o teor de lipídios no pescado pode sofrer variações significativas. As variações lipídicas entre indivíduos da mesma espécie também são bastante

acentuadas. Por isso, existe tanto esforço para distinguir diferentes categorias de pescado em relação ao seu conteúdo de gordura (ORDONEZ, 2005).

Comparado com a carne bovina, o pescado apresenta, de maneira geral, muito mais gordura insaturada e com maior conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), caracterizando assim, um alimento muito mais saudável do ponto de vista nutritivo em relação aos níveis de colesterol sérico e de eicosanóides dos consumidores. Os pescados marinhos são conhecidos ainda como possuidores de maior teor de lipídios do tipo omega-3, muito importante para a dieta humana (ROSA; FERRANDIN; SOUSA, 2012).

O pescado, principalmente marinho, também é uma boa fonte de iodo, cálcio, fósforo, sódio, potássio e magnésio. Em relação ao conteúdo mineral, encontra-se entre 0,6 a 2,0% do total da composição química e pode ser influenciado, principalmente, pela qualidade da água do ambiente e por seu estado nutricional (OLIVEIRA FILHO, 2009).

3.10 Análise sensorial

Além do valor nutritivo de um alimento, ele deve produzir satisfação e ser agradável ao consumidor, resultado do equilíbrio de diferentes parâmetros de qualidade sensorial. No desenvolvimento de um produto é imprescindível otimizar parâmetros, como forma, cor, aparência, aroma, sabor, textura, consistência e a interação dos diferentes componentes, com a finalidade de alcançar um equilíbrio integral que se traduza em uma excelente qualidade e que seja de boa aceitabilidade (ANGELINI, 2010).

A análise sensorial é uma ciência que estuda as percepções, sensações e reações do consumidor sobre características dos produtos, incluindo sua aceitação ou rejeição. A qualidade sensorial diz respeito ao resultado da interação entre um determinado alimento e o homem, não sendo uma característica do própria alimento (MINIM, 2006).

A análise sensorial é definida pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT,1993) como a disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição.

Correia et al. (2001) investigaram a aceitabilidade de linguiças preparadas a partir da associação de três ingredientes cárneos: camarão (*Penaeus vannamei*) e peixe (*Balistes carolinensis*), camarão e bacon, camarão, bacon e peixe. Todas as formulações apresentaram aceitabilidade satisfatória, sendo a formulação obtida a partir de camarão e

bacon a preferida pelos avaliadores, com preferência de 56% em relação às demais formulações.

Bispo et al. (2004), estudando o aproveitamento do bivalve *Anomalocardia brasiliana* na produção de linguiça, verificaram que o índice de aceitação do produto variou entre 78 e 87% para todos os atributos avaliados, especialmente em relação ao sabor e a textura.

Vaz (2005) desenvolveu uma linguiça de tilápia (*Oreochromis niloticus*) utilizando quantidades variadas de gordura vegetal hidrogenada e surimi. O produto obteve ótima aceitação sensorial, com índice de aceitação de, aproximadamente, 80%.

Ribeiro et al. (2008) formularam uma linguiça a partir de peixe-voador (*Cheilopogon cyanopterus*) e verificando sua aceitabilidade, concluíram que de maneira geral, o produto obteve boa aceitação sensorial e os provadores destacaram o sabor e o aroma agradáveis.

A resposta positiva ou negativa do consumidor em relação aos testes de aceitação e intenção de compra visam complementar a elaboração de um produto, fornecendo informações que podem aumentar ou diminuir a intenção de compra deste mesmo antes dele ser experimentado (NORONHA, 2003).

A importância da análise sensorial está ligada não só à manutenção da qualidade mas também ao desenvolvimento de novos produtos que, segundo Minozzo (2005), proporciona subsídios para adaptações de novas tecnologias e melhor aproveitamento no uso de matérias primas para a produção de um novo alimento, acarretando assim, no crescimento no setor da indústria alimentícia e da grande área da Ciência e Tecnologia de Alimentos.

REFERÊNCIAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Análise sensorial dos alimentos e bebidas.** Terminologia – NBR 12806, 1993.

ABREU, M. G. et al. Caracterização sensorial e análise bacteriológica do peixe-sapo (*Lophius gastrophysus*) refrigerado e irradiado. **Revista Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 498-503, 2008.

ANGELINI, M. F. C. **Desenvolvimento do produto de conveniência *Quenelle* de tilápia (*Oreochromis niloticus*).** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, 2010.

OLIVEIRA, M. J.; ARAÚJO, W. M. C.; BORGO, 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.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos – Teoria e Prática – Óleos Essenciais**; Ed. Impr. Univ. UFV: , 1995.

ARIAS-ECHANDI, M. L. Contaminatión microbiologica de los alimentos en Costa Rica. Una revisión de 10 años. **Revista Biomédica**, v.11, n. 2, p.113-122, 2000.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n.2, p. 466-475, 2008.

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

BARBOSA, M. M. C. et al. Serology and patterns of antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* isolates from pay-to-fish ponds. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.1, p.43-48, 2014.

BASTOS, M. S. R. Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) na Produção de Alimentos. **Ferramentas da Ciência e Tecnologia para a Segurança dos Alimentos.** Fortaleza. Embrapa Agroindustrial Tropical. p.283-299, 2008.

BERTSCH, D. et al. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, n.2, p.526–532, 2013.

BHOWMICK, P. P. et al. Presence of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes in seafood-associated *Salmonella* serovars and the role of the sseC gene in survival of *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in epithelial cells. **Microbiology**, v.157, n. 1, p.160-168, 2011.

BISPO, E. S., SANTANA, L. R. R., CARVALHO, R. D. S., ANDRADE, G., LEITE, C. C. Aproveitamento industrial de marisco na produção de linguiça. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.4, p.664-668, 2004.

BIZZO, H. R.; HVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil; aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v.32, n.3, p.588-594, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. http://www.anvisa.gov.br, acessada em Junho 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Resolução RDC No 12 de 2 de janeiro de 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos.** Resolução RDC nº 276, de 22 de setembro de 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Resolução – RDC nº 216 de 15 de set. de 2004.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/bps.htm>. Acesso em: 15 fev. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, 7 jul. 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. 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**, 05 abr. 2000, seção I, p. 6-10.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010**. Brasília: MPA, 2010. 128p. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/files/docs/Boletim_MPA_2011_pub.pdf>. Acesso em: 19 jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil**, 2011.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Consumo de pescado no Brasil aumenta 23,7% em dois anos**. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos.** Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010a. 158 p.

BRASIL. Secretária de Vigilância Sanitária. **Doença transmitida por alimento.** 2015. Disponível em: <http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php/inspecao-de-produtos-e-servicos-de-saude/alimentos/91-area-de-atuacao/inspecao-de-produtos-e-servicos-de-saude/alimentos/415-doenca-transmitida-por-alimento-dta.>. Acesso em: 20 mai. 2015.

BROMBERG, R. Microbiologia de Produtos Embutidos. In: LEMOS, A.L.S.C.; YAMADA, E.A. **Princípios do Processamento de Embutidos Cárneos**. CTC/ITAL, p.164, 2002.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p. 223-53, 2004.

CARDOSO, C., MENDES, R., NUNES, M. L. Development of a healthy low-fat fish sausage containing dietary fibre. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, n.2, p. 276-283, 2008.

CHAHAD, O. B. et al. Discovery of novel biopreservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their application to seafood products. **Research in Microbiology**, v.163, n.1, p.44-54, 2012.

CORREIA, R. T. P., MENDONÇA, S. C., LIMA, M. L., SILVA, P. D. Avaliação química e sensorial de linguiças de pescado tipo frescal. **Boletim do CEPPA**, v.19, n.2, p.183-192, 2001.

COSTA, R. A. **Pesquisa de Vibrio no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no estado do Ceará.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Universidade Federal do Ceará, 2006.

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

DSMZ. **German collection of microorganisms and cell cultures**. Disponível em: <http://www.dsmz.de/microorganisms/pnu/bacterial_nomenclature_info_mm.php?genus=Vibrio>. Acesso em: 20 jun. 2015.

EBRAHIMI, S. N. et al. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. **Food Chemistry**, v.110, p.927-931, 2008.

EVANGELSITA, J. **Tecnologia de alimentos.** 2º Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

FAO – Food and Agriculture Organization of The United Nations. **Food outlook: biannual report on global food markets.** Rome: FAO, p.134, 2013.

FAO – Food and Agriculture Organization of The United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture**, 2010.

FAO – Food and Agriculture Organization of The United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture,** 2014.

FAO – Food and Agriculture Organization of The United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture,** 2012.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, p.182, 2003.

GALLUCCI N., CASERO C., OLIVA M., ZYGADLO J., DEMO M. Interactions between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta lactam antibiotics. **Molecules & Medicinal Chemistry**, v.10, p.30-2, 2006.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, n.1, p.1-15, 2007.

GARCÍA-LÁZARO, M., PULIDO, M. C. A., RIVERO, A., TORRE-CISNEROS, J. Cólera y otras infecciones del gé nero Vibrio. **Medicine**, v.10, n.52, p.3489-3496, 2010.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. B.G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações.** 2ª ed. São Paulo: Nobel, 2008.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Manole, p.986, 2008.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Ateneu, p.608, 2011.

GUERIN, P. J.; VOLD, L. A. A.; VILTSLAND, P. Communicable disease control in a migrant seasonal workers population: a case sudy in Norway. **Eurosurveillance**, v.10, n.1-3, p.48-50, 2005.

GUZMÁN, M. C. et al. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. **Water Research**, v.38, n.9, p.2368-2374, 2004.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D.; Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Quimica Nova**, v.32, n.7, p.1898-1909, 2009.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULAMATSIS, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie.** v.41, p.119-127, 2008.

KRUGER, M. F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina**. Dissertação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

KUBITZA, F. et al. Panorama da Piscicultura no Brasil. **Revista Panorama da Aquicultura**, v.22, n.132, p.13-25, 2012.

LANG, H. E.; NEUHAUS, K. E.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, n.2, p.641–647, 2013.

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.197-201, 2006.

LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GUILLÉN, M. C.; MATEOS, M. P.; MONTERO, P. A. Functional chitosan-enriched fish sausage treated by high pressure. **Journal of Food Science**, v. 70, p.166-171, 2005.

LOURENÇO, M. C. S.; REIS, E. F. M.; VALLS, R. *Salmonella entérica* subsp houtenae sorogrupo O:16 em um paciente HIV positivo: relato de caso. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.46, n.3, p.169-170, 2004.

MARTINS, D.I.; MÍDIO, A.F. **Toxicologia de alimentos.** 2. ed. São Paulo: Varela, 2000.

MELO FILHO, A.B.; GUERRA, N.B. **Avaliação da qualidade nutricional de produtos cárneos: salsichas e mortadelas comercializadas na Região Metropolitana do Recife.** In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE NUTRICIONISTAS-DIETISTAS, p.186, 1998.

MOREIRA, R. T. **Desenvolvimento de embutido emulsionado de tilápia (*Oreochromis niloticus* L.) estabilizado com hidrocolóides.** 2005. 174 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial: estudos com consumidores**. Viçosa: Ed. UFV, p.225, 2006.

MINOZZO, M. G. **Elaboração de patê cremoso a partir de file de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus)* e sua caracterização físico-química, microbiológica e sensorial.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2005.

MODENA, S. F., MEIRELLES, L. R., ARAUJO, M. R. Os nitritos são importantes na gênese do adenocarcinoma associado ao esôfago de Barrett? **ABCD Arq Brás Cir Dig,** n.21, n.3, p.124-129, 2008.

NORHANA, M. N. W. et al. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: a review. **Food Control Journal**, v.21, n.4, p.343-361, 2010.

NORONHA, R. L. F.; DELIZA, R.; SILVA, M. A. A. P. A Expectativa do consumidor e seus efeitos na avaliação sensorial e aceitação de produtos alimentícios. **Alimentos e Nutrição**, v.16, n.3, p.299-308, 2005.

OKSUZ, A.; EVRENDILEK, G. A.; CALIS, M. S.; OZEREN, A. Production of a dry sausage from African catfish (Clarias gariepinus, Burchell, 1822): microbial, chemical and sensory evaluations. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, n.1, p.166-172, 2008.

OLIVEIRA FILHO, P. R. C. **Elaboração de embutido cozido tipo salsicha com carne mecanicamente separada de resíduos de filetagem de tilápias do Nilo.** Tese Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura. Jacotibal, p.115, 2009.

OMS - Organização Mundial de Saúde; **Framework for the Provision of Scientific Advice on Food Safety and Nutrition.** Geneva, 2007.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos de origem animal**. São Paulo: Artmed; p.280, 2005.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**, 2008. Disponível em: <http://projetopacu.com.br/public/paginas/202-livro-aquicultura-no-brasil-o-desafio-e-crescer.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2016.

PAGADALA, S. et al. Comparison of automated BAX PCR and standard culture methods for detection of *Listeria monocytogenes* in Blue Crabmeat (*Callinectus sapidus*) and Blue Crab processing plants. **Journal of Food Protection**, v.74, n.11, p.1930–1933, 2012.

PEREDA, J. A. O. et al. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. Vol.2. Editora Artmed. São Paulo. P.279, 2005.

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.03, p.887-893, 2008.

POZZATTI, P., LORETO, E. S., LOPES, P. G. M., ATHAYDE, M. L., SANTURIO, J. M., ALVES, S. H. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of Candida albicans and Candida dubliniensis to essential oils. **Mycoses**, v.53, n.1, p.12-5, 2009.

RAJU, C. V.; SHAMASUNDAR, B.A.; UDUPA, K.S. The use of nisin as a preservative in fish sausage stored at ambient (28 ± 2ºC) and refrigerated (6 ± 2ºC) temperatures. **International Journal of Food Science and Technology**, v.38, p.171-185, 2003.

REBOUÇAS, R. H. **Perfil de resistência a antimicrobianos de *Vibrio* isolado de água de viveiro e de camarão (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em fazendas no Estado do Ceará**. 2008. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

RIBEIRO, A. L. M. S. et al. Avaliação microbiológica da qualidade do pescado processado, importado no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.16, n.3, p.109-112, 2009.

RIBEIRO, E. M. G., CAVALCANTE, A. F., SEABRA, L. M. J., DAMASCENO, K. S. F. S. C. Avaliação sensorial de formulações de lingüiças de peixe-voador (*Cheilopogon cyanopterus*). **Higiene Alimentar**, v.22, n.162, p.51-56, 2008.

ROCHA, C. M. C. et al. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.8, p.9-11, 2013.

ROSA, C. A.; FERRANDIN, D. C.; SOUSA, M. M. **Desenvolvimento de nuggets de filé e polpa de tilápia com adição de linhaça (*Linum usitatissimum* L.)**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, p.73, 2012.

ROSSI, F., ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana:** Interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu, p.118, 2005.

SACCHETTI, G. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v.91, n.03, p.621-632, 2004.

SANDHI M. B., PINHEIRO A. R. O., SICHIERI R., MONTEIRO C. A., FILHO M. B., SCHIMIDT M. I. Análise da Estratégia Global para Alimentação, Atividade Física e Saúde, da Organização Mundial da Saúde. **Epidemiol Serv Saúde** v.14, p.41-68, 2005.

SANTIAGO, J. A. S. et al. Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados – revisão. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.46, n.2, p.92-103, 2013.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários**.** In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre: UFSC, 2004.

SCHEUTZ, F.; STROCKBINE, N. A. Genus I. Escherichia. The Proteobacteria, Part B: **The Gamma proteobacteria.** New York: Springer, p.625, 2005.

SENAI-DR BA. **Tecnologia de Pescados.** Salvador, 2007.

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp. importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência Saúde Coletiva**, v.13, n.5, p.1675-1683, 2008.

SHINOZAKI-MENDES, E. et al. Os víbrios na carcinicultura. **Panorama da Aquicultura**, p.26-29, 2005.

SHYLAJA. M. R.; PETER, K. V. The functional role of herbal spices. In: PETER, K. V. **Handbook of herbs and spices**. v. 2. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004.

SIDONIO, L. et al. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, v.35, p.421-463, 2012.

SIMÕES, M; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Products Report**, v.26, n.6, p.746-57, 2007.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.1, p.1-10, 2012.

SOUZA, S. M. G.; ANIDO, R. J. V.; TOGNON, F. C. Ácidos graxos Ômega-3 e Ômega-6 na nutrição de peixes – fontes e relações. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.6, n.1, p. 63-71, 2007.

SUGIMURA T., WAKABAYASHI K. Carcinogênios nos alimentos. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença.** v. II. 9a Ed. Barueri: Editora Manole; p. 1343-5, 2003.

TERRA, A. B. M.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. Particularidades na fabricação de salame. São Paulo: Livraria Varela, p.152, 2004.

THOMPSON, F. L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Rewiews**, v.68, n.3, p.403-431, 2004.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.29, n.3, p542-545, 2009.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.4, p.1561-1568, 2002.

VANDENBERGHE, J. et al. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. **Aquaculture**, v.219, n.1-4, p.9–20, 2003.

VÁSCONEZ, M. B. et al. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. **Food Research International**, v.42, n.7, p.762-769, 2009.

VAZ, S. K. **Elaboração e caracterização de linguiça fresca "tipo toscana" de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2005. 113 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

WERTHEIM, H. F., MELLES, D. C., VOS, M. C. VAN LEEWEN, W., VAN BELKUM, A., VERBRUGH, H. A., NOUWEN, J. L. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **Lancet Infect Dis**, v.5, n.12, p.751-62, 2005.

WILLETT W. C., SHILLS M. E., OLSON J. A., MOSHI S., ROSSI C. Dieta, nutrição e câncer. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença.** v. II. 9a Ed. Barueri: Editora Manole; p.336-40, 2003.

YENG, P. S.; BOOR, K. J. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of food borne *Vibrio* infections. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.1, n.2, p.74-88, 2004.

CAPÍTULO I

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE DIFERENTES ESPECIARIAS FRENTE A MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS E DETERIORANTES

[Artigo a ser submetido à publicação no periódico Boletim do Instituto de Pesca (ISSN 1678 - 2305), São Paulo, Brasil, 2016]

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE DIFERENTES ESPECIARIAS FRENTE A MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS E DETERIORANTES

Paulo Sérgio Pedroso COSTA JÚNIOR[1], Norma Suely EVANGELISTA-BARRETO[2], Brenda Borges VIEIRA[3]

RESUMO

Antimicrobianos naturais são alternativas eficazes e econômicas, pois são obtidos a partir das plantas aromáticas e especiarias ricas em óleos essenciais caracterizados por uma notável atividade antimicrobiana, e por esta razão, seus produtos derivados podem ser usados para retardar ou inibir a multiplicação microbiana. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo, louro, manjericão, noz moscada e orégano frente a seis bactérias patogênicas e deteriorantes por meio da técnica de difusão em poços, determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). O óleo essencial de orégano evidenciou forte atividade antibacteriana (CIM 50 – 800 μg/mL), seguido do cravo (CIM 800 – 3200 μg/mL), com atividade moderada para todos os microrganismos. Os outros óleos apresentaram baixa ação (CIM 400 – 3200 μg/mL), não apresentando atividade sobre todos as bactérias. Desta forma os óleos essenciais de cravo e orégano apresentaram melhor atividade antibacteriana e assim se apresentam como óleos favoráveis para a aplicação em alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Potencial antimicrobiano, Especiarias, Plantas medicinais

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF OILS ESSENTIAL FROM DIFFERENT SPICES FACE TO PATHOGENIC MICROORGANISMS AND SPOILAGE

ABSTRACT

Natural antimicrobials are effective and economical alternative, as they are obtained from herbs and spices rich in essential oils characterized by a remarkable antimicrobial activity, and for this reason, their derivatives can be used to retard or inhibit microbial growth. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of essential oils of clove, bay leaf, basil, nutmeg and oregano against six pathogenic and spoilage bacteria by diffusion technique in wells, determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The essential oil of oregano showed strong antibacterial activity (MIC 50-800 μg/ml), followed by clove (CIM 800-3200 μg/ml), with moderate activity for all microorganisms. Other oils had low action (CIM 400-3200μg/ml), showing no activity against all bacteria. Thus the essential oil of clove and oregano showed the best antibacterial activity and so are presented as favorable oils for use in food.

KEYWORDS: Antimicrobial potential, Spices, Medicinal plants.

INTRODUÇÃO

A *International Standard Organization* (ISO) define óleos essenciais como misturas complexas caracterizadas quimicamente como compostos de baixo peso molecular, sendo em sua maioria, altamente voláteis, capazes de gerar sabores e/ou aromas. São extraídos de parte de plantas medicinais e especiarias, como casca, caule, flores, frutas, ou de plantas inteiras. Grande parte das propriedades farmacêuticas descritas para plantas medicinais se dá por causa dos óleos essenciais (TROMBETTA et al., 2005).

Os óleos essenciais são, de maneira geral, compostos de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos, entre outros, encontrados em todo tecido vivo de plantas em diferentes concentrações nas diferentes partes vegetais, nos quais, possuem um composto farmacologicamente ativo e majoritário e, mesmo que apresentem compostos iguais qualitativamente, diferenças quantitativas fazem com que aquele óleo tenha propriedades químicas e biológicas diferentes entre si (FARMACOPEIA ITALIANA,1998; EDRIS, 2007).

Extratos e óleos de plantas há muito tempo têm servido como base para diversas aplicações na medicina popular. Isto serviu de base para diversas investigações científicas, com nos experimentos que resultaram na confirmação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (REHDER et al., 2004; NUNES et al., 2006; ALMEIDA et al., 2006; ARRUDA et al., 2006).

Os óleos essenciais vem sendo utilizados há séculos na fabricação de cosméticos e perfumarias e, farmacologicamente, com fins medicinais, o que tem estimulado a procura por substâncias biologicamente ativas e eficazes, especialmente frete à microrganismos. Outro aspecto importante é que, por se tratar de um produto natural e biodegradável de baixa toxidade aos mamíferos, e por atuarem sobre várias moléculas-alvo, ao compará-los com fármacos industrializados, percebe-se que seu estudo é de grande importância para descoberta de novos compostos ativos presentes nos óleos essenciais (FIGUEIREDO et al., 2008).

Estudos mostram que a atividade bacteriostática e/ou bactericida do óleo essencial se dá devido a compostos terpenóides presentes em sua composição. Porém, sua composição e atividade pode ser alterada por diversos fatores, desde o modo de extração, até aspectos da própria planta e do ambiente em que ela está inserida (BURT, 2004; SILVA et al., 2011).

Acredita-se que a maioria dos mecanismos de ação dos óleos essenciais exerce efeito antimicrobiano na estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando as proteínas. Os óleos essenciais alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática para íons de hidrogênio e potássio, provocando a interrupção dos processos vitais da célula, como por exemplo, o transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações que dependem de enzimas, resultando na perda do controle quimiosmótico da célula afetada, causando a morte bacteriana (DORMAN; DEANS, 2000). Diante disto, este trabalho teve como objetivo principal avaliar o potencial antimicrobiano de óleos essenciais frente a diferentes patógenos de importância alimentar.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

Para a realização desse estudo foram utilizadas seis bactérias patogênicas, sendo três bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli, Salmonella* e *Vibrio cholera*) e três bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes e Bacillus cereus*). Todos os microrganismos fazem parte do acervo de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental – LABMAA, no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura – NEPA.

Óleos essenciais

Foram utilizados os óleos essenciais de louro, cravo, manjericão, noz moscada e orégano, obtidos comercialmente da empresa Terra Flor Aromaterapia, Chapada dos Veadeiros, Alto Paraíso – GO.

Teste de suscetibilidade *in vitro*

A atividade antibacteriana de cada óleo essencial foi testada por meio da técnica de difusão em poços de acordo com o protocolo M7-A6 do "National Committee for Clinical Laboratory Standard" (NCCLS, 2003), adaptado para produtos naturais.

A partir do crescimento bacteriano de 18 a 24 horas, foram inoculadas três a cinco colônias em 5mL de solução salina a 0,85%, com auxílio de alça bacteriológica, previamente flambada. A suspensão obtida teve a densidade ótica lida em

espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm no intervalo de 0,08 a 0,10 (10^8 UFC/mL), correspondendo a 0,5 da escala de McFarland.

Com o auxílio de *swab* estéril, a suspensão foi semeada na superfície de uma placa de ágar Müller-Hinton até a obtenção de um esfregaço uniforme. Após a secagem do inóculo, foram feitos furos no meio de cultivo de 6 mm de diâmetro, e inoculados com 10 µL de cada óleo essencial. As leituras foram realizadas após 24 e 48 horas de incubação a 35 ^{o}C, por meio da medição dos halos de inibição de crescimento bacteriano em milímetros de diâmetro. Como controles foram utilizados disco de cloranfenicol (30 µg-Laborclin) (controle positivo) e glicerol estéreo (controle negativo).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a diluição dos óleos essenciais foi pesado 1 g de cada óleo, diluindo-o em metanol até que atingisse a concentração de 640 mg/ml^{-1} (Solução I). A seguir, realizou-se a diluição 1:100 em Caldo Muller-Hinton, obtendo-se a concentração de 6400 µg/ml^{-1} (Solução II) (NCCLS, 2003). Com base no documento M7-A6 do NCCLS (NCCLS, 2003), a determinação da concentração inibitória mínima consistiu-se na distribuição de 200µL de Caldo Muller-Hinton em poços de uma placa de microtitulação; posteriormente, 200µL da Solução II foram adicionados ao primeiro poço e, após homogeneização, transferiu-se para o segundo e assim sucessivamente, sendo obtidas as concentrações finais de: 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50 e 25 µg/mL^{-1}.

A preparação do inóculo consistiu em preparar uma suspensão bacteriana em solução salina 0,85% com turvação equivalente a 0,5 da Escala Mac Farland ($1x10^8$ UFC/mL). A seguir, a suspensão foi diluída a 1:100 em caldo Muller-Hinton, obtendo-se a concentração de $1x10^6$ UFC/mL do inóculo. Desta suspensão, foi depositado 10µl ($1x10^4$ UFC/mL) em cada poço já adicionado dos óleos essenciais. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 h em estufa bacteriológica em condições de aerobiose.

A determinação das CIM consistiu em examinar a placa, registrando-se a menor concentração do óleo essencial capaz de causar inibição total do crescimento bacteriano. Para a leitura do ensaio foi utilizado o método colorimétrico, que consistiu na adição de 20 µL do corante resazurina sódica (Sigma – Aldrich) na concentração de 0,01% (p/v) em todos os poços da placa, reconhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução (PALOMINO et al., 2002; BURT; REINDERS, 2003).

A mudança na coloração do azul para rosa indicou crescimento microbiano, demonstrando que, nessa concentração, o óleo não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano. Considerou-se como CIM, a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento das bactérias testadas, verificado pela permanência da coloração azul do corante (COSTA, 2009). Estes ensaios foram realizados em triplicata.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a determinação da CBM foram retirados 10µL das três últimas concentrações do óleo com as cepas bacterianas da placa de microtitulação com ausência de crescimento, e foram semeadas em placa de Petri contendo ágar Muller-Hinton. Após 24 h de incubação a 35 °C foi realizada a leitura das placas. Foi considerada bactericida a concentração do óleo que não permitiu a reativação do microrganismo em meio isento de óleo essencial. Para os microrganismos que apresentaram crescimento, foi considerado que o óleo apresentava ação bacteriostática. Esses ensaios também foram realizados em triplicatas (SANTURIO et al., 2007).

RESULTADOS

Teste de Suscetibilidade *in vitro*

A Tabela 1 evidencia os resultados do teste de suscetibilidade antimicrobiana dos óleos essenciais frente aos microrganismos selecionados para este estudo. Os óleos essenciais de cravo e orégano apresentaram maior espectro de inibição, sendo o óleo de orégano o mais eficiente, apresentando forte grau de inibição para todos os microrganismos testados, com valores de halos variando de 22,35 a 48,3 mm de diâmetro.

O óleo de cravo apresentou atividade antimicrobiana sobre a maioria das bactérias testadas, com exceção da bactéria *Listeria monocytogenes*. O grau de inibição variou entre fraco, moderado e forte, tendo maior ação frente à bactérias Gram-negativas.

Apesar do fraco grau de inibição, os óleos de manjericão, noz moscada e louro demonstraram atividade antimicrobiana para pelo menos uma das bactérias testadas (Tabela 1), sendo as cepas de *V. cholerae* e *B. cereus* as mais susceptíveis à ação dos óleos essenciais.

Tabela 1. Teste de suscetibilidade dos óleos essenciais para bactérias Gram-negativas (*Vibrio cholerae, Salmonella* Enteretidis e *Escherichia coli*) e Gram-positivas (*Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) após 24 horas de incubação.

Micro-organismos	Óleos essenciais					Controle
	Orégano	Cravo	Manjericão	Noz moscada	Louro	CLO
	Diâmetro dos halos em mm					
V. cholerae	46,22	31,19	NI	12,62	11,26	22,90
S. Enteretidis	35,13	13,89	NI	NI	NI	19,36
E. coli	31,90	17,47	NI	NI	NI	29,89
L. monocytogenes	27,85	NI	NI	NI	NI	24,14
S. aureus	22,35	11,35	NI	NI	NI	27,32
B. cereus	48,30	18,47	10,86	11,21	NI	30,72

*NI: Valores < 10 mm não houve inibição; Graus de inibição: 10-13,9 mm: fraco; 14-18 mm: moderado; > 18 mm: forte (CAROVIC-STANKO, 2010); CLO: Cloranfenicol

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Tabela 2 apresenta os resultados do ensaio da CIM dos óleos essenciais. Semelhante ao observado no teste de suscetibilidade com os discos, o óleo essencial de orégano (OEO) foi o óleo essencial que apresentou melhor ação inibitória. Como pode ser observado, a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano foi de 50 µg/mL, atuando em duas das três bactérias Gram-positivas testadas.

O óleo essencial de cravo inibiu todos os seis microrganismos avaliados, com CIM variando de 800 µg/mL (*L. monocytogenes* e *V. cholerae*) a 3200 µg/mL (*B. cereus*). As concentrações necessárias para inibir o crescimento microbiano foram maiores quando comparadas ao óleo de orégano para todos os microrganismos.

A bactéria Gram-positiva *L. monocytogenes* demonstrou maior sensibilidade, necessitando de baixas concentrações dos óleos essenciais para ser inibida. Esta bactéria foi a única que teve crescimento inibido na presença de todos os óleos testados. *Escherichia coli* se mostrou sensível na presença de três dos cinco óleos testados, mesmo que necessitando de concentrações 3200µg/mL para a sua inibição.

Os demais óleos testados apresentaram atividade antimicrobiana em pelo menos um dos microrganismos testados.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de orégano, cravo, manjericão, noz moscada e louro encontrada para bactérias Gram-negativas (*V. cholerae, S.* Enteretidis e *E. coli*) *e* Gram-positivas (*L. monocytogenes, S. aureus* e *B. cereus*).

Micro-organismo	Óleos Essenciais (μg/mL)					CLO	Sem adição do óleo
	Orégano	Cravo	Manjericão	Noz Moscada	Louro		
V. cholerae	200	800	NI	NI	NI	100	NI
S. Enteretidis	200	1600	NI	NI	NI	100	NI
E. coli	400	1600	3200	NI	NI	100	NI
L. monocytogenes	50	800	100	200	400	100	NI
S. aureus	50	1600	NI	NI	NI	100	NI
B. cereus	800	3200	NI	NI	NI	100	NI

*NI: Não houve inibição; CLO: Cloranfenicol

Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Observou-se que o óleo essencial de orégano apresentou ação bactericida frente aos microrganismos *B. cereus, E. coli* e *V. cholerae*, com CBM de 1600 μg/mL. Para os microrganismos *S.* Enteretidis, *L. monocytogenes* e *S. aureus* o óleo essencial de orégano não apresentou morte celular mesmo na concentração de 3200 μg/mL, sendo o efeito apenas bacteriostático.

Os resultados para os óleos de cravo, louro, manjericão e noz moscada não apresentaram CBM, demonstrando efeito bacteriostático sobre os microrganismos testados.

DISCUSSÃO

O método de avaliação de difusão em poços ou discos pode ser utilizado como método prévio, servindo como um "*screening*" inicial, por ser reconhecido e determinar a sensibilidade de muitos microrganismos a determinadas substâncias, produzindo resultados semiquantitativos, além de ser a técnica mais comum para a avaliação de

antibacterianos e antifúngicos de óleos essenciais, por ser de fácil execução e requerer pequenas quantidades de amostra (KALEMBA E KUNICKA, 2003).

Para o teste de suscetibilidade pôde ser observado que a formação do halo de inibição foi maior na presença do óleo essencial de orégano do que com os outros óleos essenciais sobre todas as bactérias avaliadas, com valores maiores até mesmo do que o controle. De acordo com ARAÚJO et al. (2015) a ação antimicrobiana dos óleos essenciais está diretamente relacionada à sua composição química.

A atividade bactericida e bacteriostática do óleo essencial de orégano deve-se aos compostos majoritários presentes nesse óleo, como o carvacrol e o timol (POZZO et al., 2011). Esses compostos ativos são capazes de alterar a estrutura física da célula, desestabilizar a membrana celular bacteriana e, consequentemente, alterar a sua permeabilidade, desnaturar enzimas essenciais ao metabolismo celular e ocasionar variações de pH e potencial elétrico, causando a morte celular (BURT, 2004).

O óleo essencial de orégano se mostrou eficiente sobre todas as bactérias Gram-negativas e positivas testadas, corroborando com dados já relatados por GUTIERREZ et al. (2009). Assim como os resultados encontrados no presente estudo, diversos autores relataram que o óleo essencial de orégano apresentou maior potencial antimicrobiano que os demais óleos testados (MARINO et. al., 2001; BUSSATA et al., 2007; SANTURIO et al., 2007; MARTINO et al., 2009; SANTOS et al., 2011).

De acordo com MENEZES et al. (2009), para apresentar atividade antimicrobiana adequada, os produtos naturais devem apresentar uma concentração inibitória inferior a 100.000 µg/mL. BUSSATA et al. (2007) verificaram que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* ssp. apresentaram os respectivos valores de 230, 460 e 460 µL/mL como resultados da CIM do óleo essencial de orégano. No presente estudo foram encontrados valores inferiores, sendo necessário uma menor concentração do óleo para inibir o crescimento dos mesmos microrganismos (Tabela 2). Isto pode ter acontecido devido à origem do produto, uma vez que BUSSATA et al (2007) produziram o óleo, e por isto, pode ter havido variações na quantidade do composto principal e na pureza do óleo essencial.

Com relação à CBM, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* e *Bacillus cereus* foram susceptíveis a ação do óleo essencial de orégano, porém não seguiu o mesmo valor encontrado na CIM, necessitando do dobro da concentração (1600µg/mL) para sua ação efetiva. Todavia, a literatura não dispõe de estudos que classifiquem a atividade

bactericida de óleos essenciais, o que limita, tão somente, a apresentação dos dados (SANTURIO et al., 2007).

No trabalho desenvolvido por MARINO et al. (2000) foi demonstrado que o óleo essencial de orégano teve ação bactericida sobre várias bactérias estudadas com concentrações entre 400μg.mL^{-1}. Este valor foi inferior ao encontrado no presente trabalho, que foi de 1600 μg.mL^{-1}. MORAIS (2009) explica que as diferenças na ação do óleo se deve à quantidade dos compostos principais de óleos essenciais, que são influenciados por fatores genéticos, técnicos (coleta, estabilização e armazenamento), bióticos ou abióticos, pode influenciar diretamente na qualidade.

É, ainda, oportuno salientar que a concentração bactericida mínima (CBM) implica na morte bacteriana, e o óleo essencial de orégano foi efetivo nesta ação sobre 50% dos microrganismos estudados (*E. coli*, *V. cholerae* e *B. cereus*). Já os óleos essenciais de cravo, manjericão, noz moscada e louro não evidenciaram o mesmo desempenho, pois apresentaram apenas ação bacteriostática.

TRAJANO et al. (2009), estudando a ação antimicrobiana de óleos essenciais de especiarias frente a diferentes microrganismos contaminantes de alimentos, relataram que o óleo essencial de cravo apresentou uma excelente ação antibacteriana inibindo todas as dez bactérias testadas, com formação de halos de inibição de até 30mm de diâmetro, corroborando os resultados deste trabalho. Segundo o autor, o principal composto responsável pela atividade do óleo essencial de cravo foi o eugenol.

Além de apresentar propriedades antimicrobianas, o óleo essencial de cravo se destaca por possuir características anestésicas e anti-inflamatórias (HEMAISWARYA; DOBLE, 2009). LÓPEZ et al. (2005) demonstraram que óleo essencial de cravo exibiu efeito antibacteriano frente a diversos patógenos alimentares.

De acordo com TAJKARIMI et al. (2010), o óleo essencial de manjericão apresentou ação antimicrobiana frente a *Bacillus.* TRAJANO et al. (2009) estudando a propriedade antibacteriana do óleo essencial de manjericão, verificaram que este apresentava um baixo espectro de ação sendo apenas efetivo contra uma ou duas bactérias, semelhante ao encontrado neste trabalho.

Ainda que a maioria dos óleos essenciais não tenham apresentado ação inibitória sobre a maioria dos microrganismos testados, a espécie *L. monocytogenes* é amplamente distribuída na natureza e frequentemente encontrada em alimentos cárneos (FSIS, 2012). Por conta disto, os resultados obtidos neste estudo são promissores, mostrando que

foram necessárias baixas concentrações do óleo essencial de todas especiarias para a inibição deste patógeno. Esta bactéria é a única do gênero *Listeria* que é patogênica, podendo multiplicar-se em uma ampla faixa de temperatura (1°C – 45°C) e pH (4.3 – 9.6), além de tolerar concentrações salinas elevadas (≥ 10%) (RYSER; MARTH, 2006).

A doença provocada pela *L. monocytogenes*, denominada listeriose, ganhou importância como enfermidades de origem alimentar no início dos anos 1980, sendo responsável por casos de aborto, meningite e septicemia, diagnosticada principalmente em pessoas pertencentes a grupos de risco tais como imunodeficientes, idosos, crianças e mulheres grávidas (FARBER; PETERKIN, 1998).

CARMO (1999) verificou a ação do óleo essencial de cravo à 0,1 e 0,2% associado a condimentos tradicionais na inibição de *Listeria inocua* em embutidos cárneos. Segundo o autor, os resultados mostraram que os embutidos com a adição de cravo, mesmo em baixas concentrações, apresentou efeito inibidor frente à *L. inócua*, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho (Tabela 2). Apesar desta espécie não ser patogênica, todas as espécies de *Listeria* apresentam um padrão de crescimento e comportamento similares frente às diferentes condições de cultivo (COELHO et al., 1998).

As bactérias Gram-positivas foram mais suscetíveis que as Gram-negativas. Resultados semelhantes foram encontrados por DORMANS e DEANS (2000), que após utilizarem óleos essenciais de orégano, gerânio, cravo e pimenta, frente a 25 espécies Gram-positivas e negativas, observaram que bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis. Isto se deve à membrana externa que cerca a parede celular das bactérias Gram-negativas, sendo menos susceptíveis à ação dos óleos, pois restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através da membrana externa (BURT, 2004).

Os resultados deste teste variou em relação ao teste de suscetibilidade anterior de acordo com o Gram das bactérias. Para NASCIMENTO et al. (2007), os métodos de atividade antimicrobiana (diluição e difusão) não são necessariamente comparáveis. Isto por que o método de diluição mostra-se como o que melhor disponibiliza dados quantitativos, enquanto a difusão em placa constitui-se em um método qualitativo, além de que existem fatores que podem interferir nos valores da CIM, obtidos por meio de métodos de difusão e diluição: condições de cultivo (tempo de incubação, temperatura, taxa de oxigênio), meio de cultura, concentração das substâncias testadas, dispersão e emulsificação dos agentes utilizados na emulsão óleo-água (RIOS & RECIO, 2005).

A comparação destes resultados com estudos similares deve ser cautelosa, na medida que a grande maioria dos estudos não segue procedimentos padronizados, uma vez que alguns empregam a técnica de difusão em ágar, fornecendo resultados referentes ao diâmetro de inibição, expressos em milímetros, e outros estudos fornecem resultados referentes a concentração do óleo, seguindo a técnica de microdiluição em caldo (SANTURIO et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2007).

CONCLUSÕES

Os óleos essenciais estudados apresentaram bons resultados na ação antimicrobiana sobre a grande maioria das bactérias testadas, com destaque para o óleo essencial de orégano, que necessitou de baixas concentrações para inibir o crescimento bacteriano, com alto grau de inibição para todos os microrganismos.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) encontradas entre os óleos essenciais mostraram que o óleo essencial de orégano foi mais eficaz sobre todas as bactérias estudadas, além de ter sido o único que apresentou ação bactericida, indicando o seu uso como conservante e antimicrobiano natural em alimentos.

A falta de padronização nas técnicas utilizadas para a quantificação das concentrações mínimas inibitórias para óleos essenciais é um problema na hora de comparar resultados, necessitando de maiores estudos nesta área.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA J.R.G.A et al. Antimicrobial activity of the essential oil of Bowdichia virgilioides Kunt. **Revista Brasileira Farmacognosia** v.16, p.638-641, 2006.

ARAÚJO, L. S., ARAÚJO, R. S., SERRA, J. L., NASCIMENTO, A. R. Composição química e susceptibilidade do óleo essencial de óregano (*Origanum vulgare* l., família *Lamiaceae*) frente à cepas de *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis.* **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.33, n.1, p.73-78, 2015.

ARRUDA T.A. et al. Preliminary study of the antimicrobial activity of Mentha x villosa Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Revista Brasileira Farmacognosia** v.16, p.307-311, 2006.

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

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p.223-53, 2004.

BUSATTA, C., MOSSI, A. J., RODRIGUES, M. R. A., CANSIAN, R. L., OLIVEIRA, J. V. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.610-616, 2007.

CAROVIC-STANKO, K. et al. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**, v.119, p.196-201, 2010.

CARMO, C. A. C. **Inibição do crescimento de *Listeria* por culturas láticas e condimentos, em salame tipo italiano.** Viçosa, MG: UFV, 64p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.

COELHO, C. P. et al. Efeito in vitro de glicose e cloreto de sódio sobre *Listeria* spp. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, p. 885-892, 1998.

DORMAN H.J.D.; DEANS S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil. **Journal of Applied Microbiology**. v.3, p.308-316, 2000.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Reserch**, v.21, p.308-323, 2007.

FARMACOPEA UFFICIALE DELLA REPUBLICA ITALIANA. X Edizione. **Instituto Poligrafico e Zecco dello Stato**, v.1, p.206-210, 1998.

FIGUEIREDO, AC et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v.23, n.4, p. 213-26, 2008.

FSIS - Food Safety and Inspection Service. Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science. **United States Department of Agriculture**. MLG 8.09. 2012.

GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C., BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: effi cacy, synergistic potential and interactions with food components, **Food Microbiology**, v.26, p.142–150, 2009.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram-negative bacteria. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11, p. 997-1005, 2009.

KALEMBA, D., KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v10, p.813-829, 2003.

LÓPEZ, P. et al. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains**. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.17, p. 6939-6946, 2005.

MARINO, M., BERSANI, C., COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae.* **International Journal of Food Microbiology**, v.67, n.5, p.187-195, 2001.

MARTINO, L. D.; VINCENZO, D. F.; FORMISANO, C.; MIGNOLA, E.; SENATORE, F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three

chemotypes of Origanum vulgare L. ssp. hirtum Ietswaart growing wild in Campania (Southern Italy). **Molecules**, v. 14, n. 8, p. 2735-46, 2009.

MENEZES, T. O. A., ALVES A. C. B. A., VIEIRA, J. M. S., MENEZES, S. A. E., ALVES, B. P., MENDONÇA, L. C. V. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia** UNESP, v.38, p.184-191, 2009.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v.27 p.4050- S4063, 2009.

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

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). **NCCLS**, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NUNES X.P. et al., Antimicrobial activity of the essential oil of Sida cordifolia L. **Brazilian Journal of Microbiology,** v.16, p.642-644, 2006.

PALOMINO, J-C., MARTIN, A., CAMACHO, M. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance *Mycobacterium tuberculosis.* **Antimicrobial Agents and Chemother,** v.46, p.2720-2722, 2002.

POZZO, M. D., VIÉGAS, J., SANTURIO, D. F., ROSSATTO, L., SOARES, I. H., ALVES, S. H., COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. **Ciência Rural,** v.41, p.667-672, 2011.

REHDER V.L.G. et al. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essential de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v.6, p.67-71, 2004.

RIOS, J. L., RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacol,** v.100, p.80-84, 2005.

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

SANTURIO J. M., SANTURIO, D. F., POZZATTI, P. et al. Atividade antimicrobiana de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella entérica* de origem avícola. **Ciência Rural,** v.37, n.3, p.803-808, 2007.

SILVA, NCC et al. Antimicrobial activity andphytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. **Natural Product Research**, 2011.

TAJKARIMI, M. M., IBRAHIM, S. A., CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v.21, p.1199-1218, 2010.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p 542-545, 2009.

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.6, p.2474-2478, 2005.

CAPÍTULO II

LINGUIÇA DE PEIXE TIPO FRESCAL ADCIONADA DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO: CARACTERISTICAS MICROBIOLÓGICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAIS

[Artigo a ser submetido à publicação no periódico Boletim do Instituto de Pesca (ISSN 1678 - 2305), São Paulo, Brasil, 2016]

LINGUIÇA DE PEIXE TIPO FRESCAL ADCIONADA DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO: CARACTERISTICAS MICROBIOLÓGICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAIS

Paulo Sérgio Pedroso COSTA JÚNIOR[1], Norma Suely EVANGELISTA-BARRETO[1], Brenda Borges VIEIRA[1]
[1]Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

RESUMO

A maioria dos alimentos embutidos apresentam conservantes químicos para a manutenção das características sensoriais do produto. Porém, estes aditivos químicos podem apresentar efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos. A substituição desses aditivos químicos por antimicrobianos naturais pode aumentar a segurança e a vida de prateleira dos alimentos, sem causar efeitos colaterais. O objetivo deste trabalho foi elaborar linguiça de peixe frescal utilizando carne de cação adicionado de óleo essencial de orégano. A concentração do óleo na formulação do embutido foi de 0,08 e 0,16%, analisando os seus aspectos microbiológicos, sensoriais e físico-químicos. O produto se manteve viável para o consumo humano para os aspectos microbiológicos e físico-químicos até o período de 16 dias, armazenado à 7ºC, contudo, não foi bem aceito sensorialmente devido ao sabor intenso.

PALAVRAS-CHAVE: Embutidos, Especiarias, Orégano

FISH SAUSAGE TYPE FRESCAL ADDED OREGANOS'S ESSENTIAL OIL: MICROBIOLOGICAL, PHYSICOCHEMICAL AND SENSORY FEATURES

ABSTRACT

Most embedded foods have chemical preservatives to maintain the sensory characteristics. However, these chemical additives may have carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects. The replacement of these chemical additives for natural antimicrobials may be considered an additional key to increasing the security and shelf life of food. The objective of this work was to prepare fish sausage fresh Tuscan type using dogfish meat added essential oil of oregano. The oil concentration in the formulation of the embedded was 0.08 and 0.16%, analyzing its microbiological, sensory and physicochemical. The product remained viable for human consumption for microbiological and physico-chemical to the period of 16 days, stored at 7°C, however, it was not well accepted sensory due to the intense flavor.

KEY WORDS: Built, Spices, Oregano

INTRODUÇÃO

O pescado é a carne mais demandada mundialmente e a de maior valor de mercado (SIDONIO et al., 2012). Esta demanda vem crescendo de forma acelerada em decorrência do aumento populacional e da busca por alimentos mais saudáveis (FAO, 2010). Os benefícios nutricionais provenientes do consumo de pescados são atribuídos à presença dos ácidos graxos ômega-3, principalmente EPA (eicosapentaenoico) e DHA (docosaexaenoico). Entre os efeitos fisiológicos nos humanos, estão a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, hipertensão, inflamações em geral, asma, artrite, psoríase e vários tipos de câncer (ORDONEZ, 2005).

Alimentos embutidos e enlatados apresentam conservantes para a manutenção das características sensoriais do produto, como a cor mais aproximada da carne original, além de uma vida de prateleira maior, tornando o produto mais atraente. Diversos aditivos podem ser utilizados para a conservação dos alimentos, como o ácido sórbico, carbonato de cálcio, benzoato de sódio, nitritos e nitratos (BRASIL, 2001).

A principal preocupação do uso de nitritos e nitratos em alimentos é decorrente dos efeitos tóxicos por excesso na dieta e pela formação endógena de composto n-nitrosos como a n-nitrosodimetilamina e monometilnitrosamina, que apresentam efeitos carcinógenos, teratogênicos e mutagênicos (MARTINS; MÍDIO, 2000; SUGIMURA; WAKABAYASHI, 2003).

Os agentes antimicrobianos representam substâncias químicas produzidas por microrganismos ou de forma sintética com capacidade de inibir o crescimento de bactérias (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). As plantas aromáticas e condimentos, ou ainda as chamadas especiarias, usadas em alimentos com fins aromatizantes, a partir da identificação de sua atividade antimicrobiana, podem ser utilizadas como conservantes de alimentos (KRUGER, 2006).

O uso de óleos essenciais de especiarias como agentes antimicrobianos naturais em produtos alimentícios pode ser considerado um adicional determinante para aumentar a segurança e a vida de prateleira dos alimentos (EBRAHIMI, 2008).

Apesar da alta incidência de patógenos, os embutidos frescais são geralmente seguros, pois passam por tratamento térmico antes do consumo. Entretanto, as toxinfecções alimentares podem ocorrer pelo consumo do produto insuficientemente cozido ou contaminado após o cozimento, além de que os microrganismos podem consumir determinados nutrientes presentes no pescado durante o seu

desenvolvimento, diminuindo seu conteúdo nutricional. Neste sentido, o risco do cozimento ser inadequado ou insuficiente pode existir em qualquer produto cárneo, o que é evidenciado pela incidência de toxinfecções causadas por microrganismos patogênicos tais como *Salmonella* sp e *Escherichia coli* em produtos geralmente considerados seguros (BASTOS, 2008). O objetivo deste trabalho foi elaborar linguiça de cação frescal, adicionada de diferentes concentrações de óleo essencial de orégano como conservante natural.

MATERIAL E MÉTODOS

Elaboração da linguiça frescal de peixe

A linguiça foi elaborada de maneira artesanal, sendo a principal matéria prima utilizada na elaboração do embutido 85% de carne do peixe. O peixe utilizado foi o cação (*Carcharhinus spp.*), peixe de médio porte, médio valor comercial, com alto teor de gordura e amplamente comercializado no Recôncavo Baiano. Foram utilizados três quilos do peixe, obtidos comercialmente no município de Cruz das Almas – BA. As linguiças foram elaboradas no Laboratório Multifuncional 04 – Bloco de Laboratórios O – UFRB. Os ingredientes utilizados na formulação dos embutidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Matéria prima e ingredientes para a elaboração da linguiça de cação frescal.

Matéria prima	**(%)**
Carne de peixe	85
Toucinho	15
Ingredientes	**(%)**
Sal Iodado	1,0
Tempero Completo*	0,5
Molho Inglês	0,5
Colorífico	0,2
Farinha de Trigo	0,5
Creme de Milho	0,5
Açúcar	2,0
Água	8,0

*sal, cebola, alho, cebolinha, salsa, manjericão.

A carne de peixe e o toucinho foram moídos em moedor de carne semi-industrial, em disco de 8 mm de diâmetro e em seguida, misturados manualmente aos demais ingredientes. Para os tratamentos, foi utilizado o óleo essencial de orégano em duas concentrações diferentes, seguindo os valores encontrados no CIM (Tabela 2). A massa foi embutida em tripa, com calibre de 45 mm e cortadas formando bisnagas de aproximadamente 10cm de comprimento (Anexo).

Tabela 2. Tratamentos utilizados na linguiça de cação frescal.

Tratamento	Descrição
Controle	Sem adição de especiarias
Tratamento T1	0,08% do óleo essencial de orégano
Tratamento T2	0,16% do óleo essencial de orégano

Processamento das Amostras

As linguiças foram transferidas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental (LABMAA) – NEPA – UFRB logo após o preparo, para o processamento das amostras e realização dos testes microbiológicos.

Análises microbiológicas

Foram realizadas análises microbiológicas para contagem de bactérias psicotróficas segundo a metodologia descrita pelo Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água (SILVA et al., 2010). As análises foram realizadas na massa da linguiça logo após o preparo (Tempo 0), e posteriores análises com 4, 8, 12, 16 e 20 dias de estocagem em refrigeração à 7 ºC, a fim de verificar o tempo de prateleira do embutido. Para as análises de microrganismos heterotróficos aeróbios psicotróficos, alíquotas de 1 ml das diluições seriadas foram inoculadas em placas de Petri estéreis e adicionado meio fundido Plate Count Agar (PCA). Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas por sete dias a 7 ºC. Para a leitura das placas foram escolhidas aquelas que apresentaram entre 30 a 300 colônias. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por grama de alimento (UFC/g). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Para a verificação da ação direta do óleo na linguiça foi semeada cultura de *Escherichia coli* na concentração de $1x10^4$ UFC/g nos tratamentos que receberam óleo na

composição e no controle, e então realizado contagem do microrganismo nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas em refrigeração à 7º C. Para determinação do Número Mais Provável (NMP/g) de *E. coli* foi utilizada a técnica de fermentação em tubos múltiplos em Caldo *Escherichia coli* (EC). Foram inoculadas alíquotas de 1mL das diluições seriadas em Caldo EC, contendo tubos de Durhan invertidos e incubados em banho-maria a 44,5 ºC por 48 horas. A prova foi considerada positiva quando os tubos apresentaram turvação do meio e produção de gás. Decorrido esse período os tubos positivos de EC foram semeados em meio Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) e incubados a 35 ºC por 24 horas para confirmação das colônias características de *E. coli* (colônias de centro negro, com ou sem brilho metálico esverdeado). Para este teste, todas as amostras também foram realizadas em duplicata.

Análise sensorial – Teste de aceitação

Para a realização da análise sensorial, as linguiças foram fritas por cerca de 30 minutos e acondicionados em caixas térmicas para manutenção da temperatura. Em seguida foram servidos a uma temperatura de 57 ± 1°C a 40 provadores não treinados, compostos por alunos de graduação, mestrado e docentes da UFRB mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo). Antes de cada teste, os mesmos receberam orientações sobre o método e procedimentos das avaliações.

Para limpeza das papilas gustativas foram oferecidos, entre cada amostra, água com gás e biscoito de água e sal. As amostras foram apresentadas em pratos descartáveis devidamente identificados com números aleatórios de três algarismos (para o controle código 101, para o tratamento T1 código 202 e para o tratamento T2 código 303) para evitar possíveis induções nas respostas (Anexo).

A análise sensorial baseou-se no método de estímulo simples com escala hedônica de nove pontos com os extremos 1 (desgostei muitíssimo) e 9 (gostei muitíssimo) (STEVANATO et al., 2007). A apresentação das amostras da linguiça de peixe foi realizada de acordo com MINIM (2010), de forma monádica (uma de cada vez) favorecendo a provação dos julgadores no mesmo momento.

Para avaliar a aceitação por atributos sensoriais, a fim de determinar quais foram os responsáveis pela aceitação ou rejeição e com que intensidade contribuíram para maior ou menor aceitação do produto, foi aplicada a escala afetiva de nove pontos previamente estabelecida, que varia gradativamente, tendo como extremos 1 (desgostei

muitíssimo) e 9 (gostei muitíssimo) onde foram avaliados os seguintes atributos: Cor, Aroma, Sabor e Textura (Anexo).

Para avaliar o grau de aceitação do produto com base em atitudes do consumidor, foi utilizada a escala de atitude classificadas em sete categorias, previamente estabelecidas com base em atitudes de consumo (Anexo).

Análises físico-químicas

Para a caracterização da composição centesimal de cada formulação da linguiça de cação frescal foram realizadas as seguintes análises, em triplicata:

Determinação de Umidade

A determinação de umidade foi realizada conforme método de secagem direta em estufa a 105 °C descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2005). Inicialmente foram pesados 5 g da amostra em cápsula de porcelana, previamente tarada. Posteriormente, as amostras foram aquecidas durante 12 horas em estufa e resfriadas em dessecador em temperatura ambiente, repetindo-se a operação até a obtenção de peso constante da amostra. O percentual de umidade foi obtido mediante cálculo na Equação 1.

Equação 1:

%UMIDADE = 100 x (N/ P)

Onde:

N = gramas de umidade (perda de massa em gramas)

P = gramas da amostra.

Determinação de Cinzas

O percentual de cinzas foi baseado na determinação da perda de peso do material submetido à queima em temperatura de 550 ºC em mufla. As amostras, anteriormente secas em estufa, foram incineradas durante 4 horas e resfriadas em dessecador a temperatura ambiente, repetindo-se esta operação até a obtenção de peso constante. A diferença entre o peso original da amostra e o peso da matéria orgânica na Equação 2, forneceu a quantidade de cinza presente no produto (IAL, 2005).

Equação 2:

% CINZA = Peso da cinza x 100/ Peso da amostra

Determinação de Lipídios

Para a determinação de lipídios totais foi utilizado o método de Bligh-Dyer modificado, segundo Instituto Adolfo Lutz - IAL (2005). Foram pesados 50 g da amostra homogeneizada e transferidas para um béquer de 500 mL. Adicionou-se 50 mL de clorofórmio e 100 mL de metanol. Adicionou-se novamente 50 mL de clorofórmio e 50 mL de água. Agitou-se, com o auxílio de um agitador mecânico, por 15 minutos, em capela química. O material homogeneizado, utilizando funil de vidro com papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro, para um funil de separação de 500 mL. Após completa separação e clarificação, recolheu-se a camada de clorofórmio (inferior) para um balão de fundo chato com boca esmerilhada de 300 mL, previamente tarado. Evaporou-se o solvente em chapa de aquecimento a 65 °C. Transferiu-se o balão para uma estufa a 105 °C por 1 hora. Esfriou-se em dessecador e posteriormente foi pesado. Repetiu-se estas operações de aquecimento e resfriamento até peso constante. O percentual de lipídios totais foi obtido mediante cálculo da Equação 3 (IAL, 2005).

Equação 3:

%LIPÍDIOS TOTAIS = (N / P) x 100

Onde:

P= massa da amostra em g

N = (massa do balão + massa óleo) – massa do balão

Determinação de Proteínas (Nitrogênio total)

Para determinação de nitrogênio total foi utilizado o método do fenol-hipoclorito, descritos por Weatherburn (1967) & Felker (1977). Inicialmente foi realizada a digestão com ácido sulfúrico em bloco digestor a 350°C. Foram pesados 0,5 g da amostra, previamente secas e trituradas, em tubos e acrescentou-se 3,5 mL de ácido sulfúrico aguardando por 30 minutos para digerir. Acrescentou-se 2,5 mL de peróxido de hidrogênio aos tubos e levados para o bloco digestor a 350°C por 30 min, posteriormente, foram retirados, esperado esfriar, e acrescentou-se 1 mL de peróxido de hidrogênio e levados novamente ao bloco por mais 30 min. Esta operação de acrescentar 1 mL e aquecer por 30 min no bloco foi realizada até obtenção de uma solução incolor. Em seguida, foi transferida a solução obtida da digestão para um balão volumétrico e acrescentado água destilada até 100 mL, obtendo assim o extrato digerido.

Para a realização das análises de nitrogênio total, foram adicionados em tubos de ensaios, 160 µL do extrato digerido diluído 40 vezes com água destilada, 1,0 mL de uma solução de fenol com nitroprussiato de sódio e 1,0 mL de uma solução de hidróxido de sódio com hipoclorito de sódio. Posteriormente, foram colocados em banho-maria a 37°C por 20 minutos. Após 45 minutos de repouso em temperatura ambiente, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 630 nanômetros. Os cálculos das concentrações de nitrogênio foram realizados tendo como referência a Equação 4, obtida para a curva padrão de nitrogênio com o fator 6,25.

Equação 4:

NITROGÊNIO TOTAL (µg N g-1 MS) = L x D x Fd / a x P

Onde:

L = Leitura (A630)

V = Volume total do extrato

Fd = Fator de diluição

a = Coeficiente angular da reta 0,0968 para concentração em µg N g-1 MS

P = Peso da amostra

Determinação de Carboidratos

O teor de carboidratos foi determinado segundo Instituto Adolfo Lutz (2005), obtido pela diferença entre 100 e o somatório dos teores de proteína, lipídios, umidade e cinzas, de acordo com a Equação 5.

Equação 5:

Total de Carboidratos = 100 - (U + C + L + P)

Onde:

U = % umidade;

C =% cinzas;

L = % lipídeos;

P =% proteínas.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram avaliadas com auxílio do programa estatístico SISVAR 4.3 (FERREIRA, 2000). As médias dos tratamentos quando significativas foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Análises Microbiológicas

Análise Microbiológica de Bactérias Psicotróficas durante 20 dias

A contagem de bactérias psicotróficas cultiváveis (BPC), em todos os tratamentos apresentou diferença significativa entre os tempos avaliados (Tabela 3). Todos os tratamentos apresentaram um aumento significativo estatisticamente no número de células bacterianas ao longo dos 20 dias.

O teste controle (sem óleo) apresentou um aumento significativo no número de células bacterianas (UFC) no decorrer do período de 20 dias, sendo que a concentração inicial bacteriana de $9{,}9x10^{1}$ UFC.g^{-1} alcançou $>9{,}9x10^{6}$ UFC.g^{-1} no final de 20 dias. A diferença entre o controle e os tratamentos ocorreu, principalmente, a partir do 12º dia, em que se observou um acréscimo significativo no desenvolvimento bacteriano chegando a valores incontáveis.

Tabela 3 – Contagem de bactérias psicotróficas em linguiça de cação frescal com o óleo essencial de orégano em sua formulação para verificação do tempo de prateleira, armazenadas à 7 ºC por 20 dias.

Psicotróficos (UFC/g)	**Tempo (Dias)**					
	0	**4**	**8**	**12**	**16**	**20**
Controle	$9{,}9x10^{1}$ aA	$1{,}6x10^{5}$ bB	$2{,}9x10^{6}$ cA	$>9{,}9x10^{6}$ dB	$>9{,}9x10^{6}$ dB	$>9{,}9x10^{6}$ dA
Tratamento T1	$5{,}4x10^{1}$ aA	$8{,}6x10^{4}$ bA	$1{,}6x10^{6}$ cA	$2{,}4x10^{6}$ cA	$>9{,}9x10^{6}$ dB	$>9{,}9x10^{6}$ dA
Tratamento T2	$4{,}2x10^{1}$ aA	$4{,}5x10^{4}$ bA	$1{,}2x10^{6}$ cA	$1{,}5x10^{6}$ cA	$2{,}2x10^{6}$ cA	$>9{,}9x10^{6}$ dA

* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p<0{,}05$), sendo comparadas letras minúsculas em linhas e maiúsculas em colunas; INC: incontáveis.

A linguiça de cação frescal apresentou um tempo de prateleira de 16 dias quando mantidas sob refrigeração à 7ºC no tratamento T2 adicionada de óleo essencial de orégano à 0,16%, quatro dias a mais que o tratamento à 0,08% do óleo e oito dias a mais que o tratamento controle.

Do tempo T0 ao tempo T12 não houve diferença estatística entre os tratamentos (T1 e T2) para a densidade microbiana das BPC. Os tratamentos começaram a se diferenciar a partir do 16º dia, onde se observou um acréscimo significativo ($p<0{,}05$) no desenvolvimento bacteriano do tratamento T1, chegando a valores acima de 10^{6}UFC/g.

O tratamento T2 apresentou melhor resultado, mantendo sua contagem de 10^6 do oitavo até o tempo de 16º dia. A partir do dia 20º dia não houve diferença entre os tratamento, pois todos apresentaram-se incontáveis (Tabela 1).

Efeito antimicrobiano do óleo essencial de orégano em linguiça de cação frescal contaminados intencionalmente

As análises da linguiça contaminada intencionalmente indicaram que não houve aumento no número de células bacterianas do controle ao longo do tempo de 72 horas, o qual não continha em sua formulação a presença do óleo essencial. Os valores encontrados para o controle ($2{,}3x10^3$ NMP/100g) serviram como referência para o desenvolvimento da bactéria *E. coli* quando comparado com os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4 - Desenvolvimento de *Escherichia coli* adicionada intencionalmente em amostras de linguiça de cação frescal com o óleo essencial de orégano, armazenadas à 7 ºC por 72 horas.

***Escherichia coli* (NMP/100g)**	**Tempo (Horas)**			
	0	**24**	**48**	**72**
Controle	$2{,}3x10^3$ aB	$2{,}3x10^3$ aB	$2{,}3x10^3$ aB	$2{,}3x10^3$ aB
Tratamento T1	$3{,}6x10^2$ aA	< $3{,}0x10^1$ aA	< $3{,}0x10^1$ aA	< $3{,}0x10^1$ aA
Tratamento T2	< $3{,}0x10^1$ aA	< $3{,}0x10^1$ aA	< $3{,}0x10^1$ aA	< $3{,}0x10^1$ aA

* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p<0{,}05$), sendo comparadas letras minúsculas em linhas e maiúsculas em colunas.

A ação do óleo pôde ser verificada desde o tempo zero, onde foi inoculadas a mesma quantidade de *E. coli* em todos os tratamentos. Mesmo o controle não tendo apresentado aumento na densidade microbiana de *E. coli*, esta ainda foi superior aos valores encontrados na linguiça de peixe tratada com óleo essencial de orégano.

Ao longo do período das 72 horas não foi observada diferença significativa no desenvolvimento da bactéria entre os dois tratamentos que continham o óleo essencial de orégano nas concentrações de 0,08 e 0,16%, permitindo afirmar que o aumento da quantidade do óleo não apresentou maior eficiência na redução do número de células inoculadas, não permitindo o desenvolvimento do microrganismo mesmo na menor concentração.

Análise Sensorial

Do total de provadores, 28 foram mulheres e 12 homens, totalizando 40 participantes, entre servidores, técnicos, professores e estudantes da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Os resultados dos testes de aceitação global e por atributos sensoriais da linguiça de cação frescal estão apresentados na Tabela 5.

A linguiça de cação sem o óleo essencial (controle) foi a mais aceita pelos provadores. O tratamento T1, contendo 0,08% de óleo essencial de orégano apresentou escore entre as médias 6 e 7, situando-se entre os termos hedônicos "gostei ligeiramente" e "gostei moderadamente". O tratamento T2 contendo 0,16% do óleo de orégano apresentou média variando entre 5 e 7, situando-se entre os termos hedônicos "indiferente" e "gostei moderadamente".

Tabela 5 – Média do índice de aceitabilidade dos atributos e global da linguiça de cação frescal com o óleo essencial de orégano em sua formulação.

Amostras	Cor	Aroma	Sabor	Textura	Global
Controle	7,6±1,3b	7,6±1,2b	7,8±1,1c	7,4±1,2a	7,7±1,0c
Tratamento T1	6,8±1,7a	6,6±1,6a	6,1±1,8b	6,9±1,6a	6,3±1,7b
Tratamento T2	7,2±1,5a	6,6±1,8a	5,4±2,2a	6,8±1,6a	5,5±2,1a

* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$).

Por meio das médias dos escores para cada atributo (cor, aroma, sabor e textura), foi feito uma representação multidimensional (gráfico aranha), onde é visualizada a diferença entre as formulações das linguiças (Figura 1).

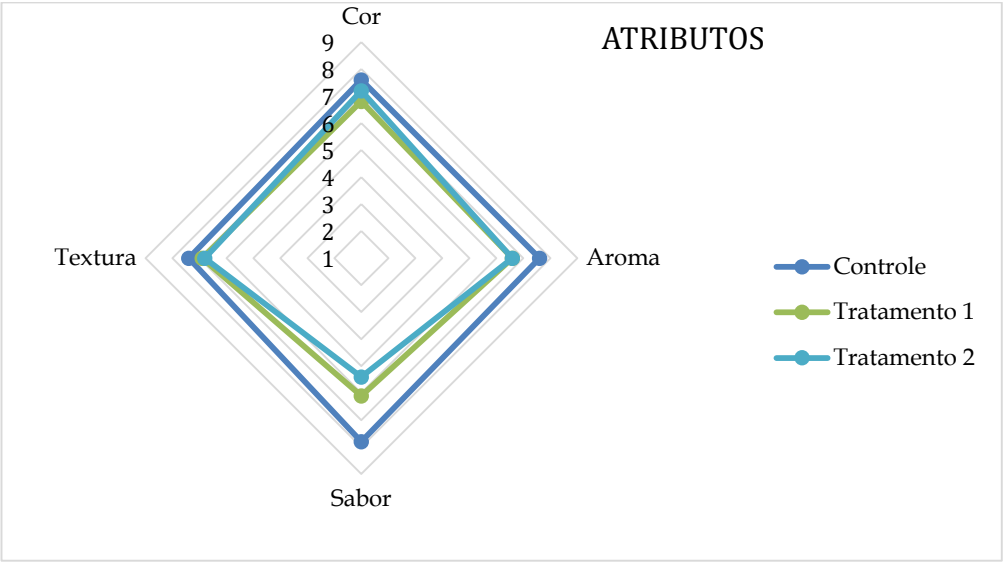

Figura 1. Representação multidimensional do perfil de atributos sensoriais dos tratamentos da linguiça de cação frescal.

Os atributos cor e aroma da formulação sem óleo, apresentaram escore médio de aceitação igual a 7,6, situando-se entre os termos hedônicos "gostei moderadamente" e "gostei muito". Já o tratamento T1, apresentou escore médio de aceitação igual a 6,8 (cor) e 6,6 (aroma), situando-se entre os termos hedônicos "gostei ligeiramente" e "gostei moderadamente". Logo, ambas as formulações atenderam ao padrão aceitável de qualidade.

Com relação ao teste de atitude de consumo (Figura 2), 30% dos provadores comeriam frequentemente a linguiça sem óleo, 12,5% com óleo à 0,08% e 10% comeriam frequentemente o tratamento T2 com 0,16% de óleo essencial de orégano. Se somado as notas obtidas nos itens "7-comeria frequentemente", "6-comeria sempre que tivesse oportunidade" e "5-comeria de vez em quando", tem-se que 92,5% dos provadores consumiriam a linguiça sem a presença do óleo, enquanto que 67,5% e 30% consumiriam as linguiças para os tratamentos T1 e T2, respectivamente, evidenciando que haveria um público considerável caso esse produto estivesse disponível no mercado.

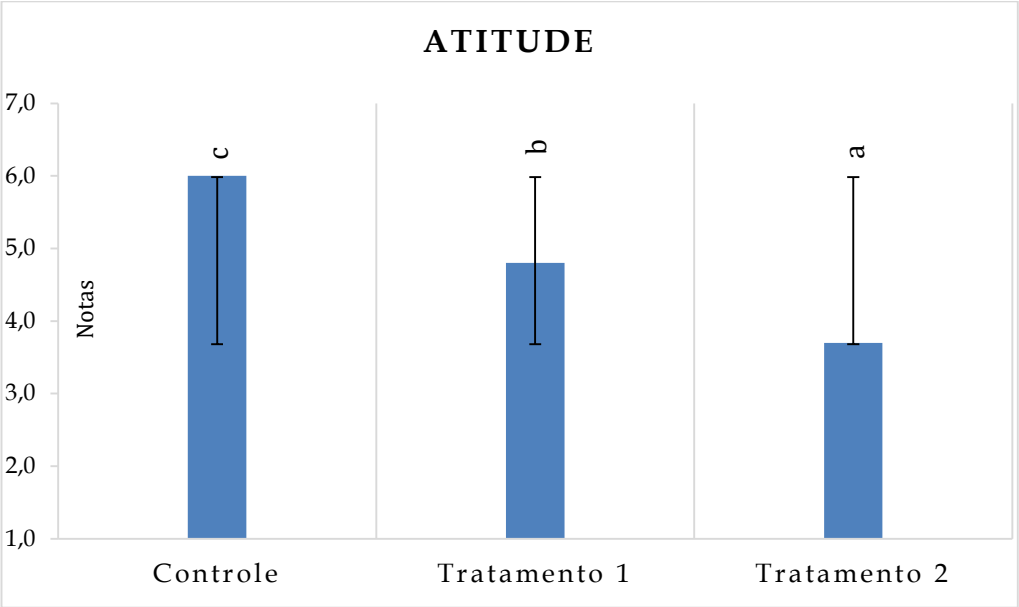

Figura 2. Valores da escala de atitude de consumo dos tratamentos da linguiça de cação frescal.
* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$).

Análises Físico-químicas

Os três produtos desenvolvidos possuíam quantidades similares de todos os ingredientes, exceto pela quantidade de óleo essencial. Conforme pode ser observado na

Tabela 6, as linguiças frescais de peixe atenderam aos padrões físico-químicos, conforme o Regulamento técnico de identidade e qualidade do produto (BRASIL, 2000).

Tabela 6: Composição centesimal (%) da linguiça de cação frescal com o óleo essencial de orégano em sua formulação.

Composição (%)	Brasil (2000)	Controle	Tratamento T1	Tratamento T2
Cinzas	3,0 (máx.)	2,80±0a	2,67±0,2a	2,73±0,1a
Umidade	70 (máx.)	67,67±1,5a	67,6±2,4a	68,47±0,2a
Lipídios	30 (máx.)	19,84±0a	21,12±0,3a	22,46±0,7a
Proteínas	12 (mín.)	13,52±0,4a	14,10±0,2a	13,58±0,5a
Carboidratos	**	3,83±2,0c	5,49±2,4b	7,24±0,6a

* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$); **Não existe limite de valores estabelecido pela legislação.

DISCUSSÃO

Apesar dos microrganismos psicotróficos não possuírem valores limites, segundo a legislação brasileira vigente, estes foram utilizados como indicadores da vida de prateleira do produto neste trabalho. Os microrganismos psicotróficos são os principais deterioradores de alimentos refrigerados, pois essa microbiota não tem seu crescimento inibido pelo efeito da refrigeração, e por conta disso, tendem a diminuir a vida-de-prateleira do produto (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Para a contagem deste grupo, tomou-se como base os valores sugeridos por GEORGANTELIS et. al. (2007), considerando o valor limite de 10^6 UFC/g^{-1} para avaliação da vida útil do produto.

A partir do oitavo dia, todos os tratamentos excederam o valor limite estabelecido para bactérias psicotróficas, não tendo diferença entre as linguiças com e sem óleo essencial de orégano. Porém, a linguiça de cação frescal adicionada com óleo essencial de orégano a 0,16% não excedeu o valor de 10^6 UFC/g^{-1} nos 16 dias de armazenamento sob refrigeração, indicando que houve redução da carga microbiana do produto quando adicionada do óleo essencial de orégano. Apesar de não ter tido diferença significativa estatisticamente entre os tratamentos para as bactérias psicotróficas, as linguiças adicionadas de óleo essencial de orégano inibiu o crescimento da *E. coli* inoculada intencionalmente, demonstrando que o óleo é eficaz na morte do microrganismo patogênico.

Concentrações inferiores do óleo essencial de orégano (T1) embora apresentem atividade antimicrobiana frente aos microrganismos deteriorantes, tem a vida de

prateleira do produto aumentada conforme aumenta a concentração do óleo essencial de orégano. Entretanto, uma adição maior pode comprometer as características sensoriais do produto. Este fato indica que o óleo essencial de orégano pode ser utilizado em substituição aos aditivos químicos.

Segundo JAY (2005), as linguiças normalmente apresentam uma microbiota bastante variável em comparação a outras carnes processadas, devido aos condimentos utilizados, quase todos contribuindo com a sua própria carga microbiana. Este fato pode explicar a presença de microrganismos psicotróficos encontrada neste trabalho.

A presença do óleo essencial de orégano foi eficiente na redução da carga microbiana de *E. coli*, reduzindo duas casas decimais ao valor de referência do controle em apenas 24 horas, permitindo afirmar que o óleo foi capaz de causar a morte celular das células inoculadas, não permitindo o seu desenvolvimento. Isto mostra a importância desse antimicrobiano natural na elaboração de embutidos, reduzindo a níveis aceitáveis os coliformes termotolerantes, mesmo quando esses se fazem presente através de contaminação cruzada.

Corroborando com os resultados encontrados neste trabalho, BUSSATA (2007) observou que ao longo do período de 30 dias não foi perceptível o desenvolvimento da bactéria *Escherichia coli* adicionada intencionalmente em nenhum dos lotes de linguiça frescal de peixe que continham concentrações de óleo essencial de orégano, verificando que este não permitiu o desenvolvimento do microrganismo.

Escherichia coli não apresentou aumento no crescimento durante o período de 72 horas para o controle (sem óleo essencial), provavelmente em virtude da condição de refrigeração, não permitindo que houvesse aumento da massa microbiana. A refrigeração também age como um fator limitante ao crescimento desse microrganismo, que tem seu crescimento ótimo à 45 ºC (SCHEUTZ; STROCKBINE, 2005).

Durante a análise sensorial, muitos provadores disseram que a sua preferência sobre o tratamento sem óleo de orégano se deu por conta da suavidade dos ingredientes na linguiça. Apesar de terem comentado que gostaram da formulação com 0,08% do óleo de orégano, a maioria dos provadores disse preferir a linguiça sem ele. Alguns provadores comentaram, em suas fichas de avaliação, que o sabor do óleo de orégano utilizada na formulação com 0,16% estava muito forte, de modo a sobrepor ao sabor dos outros ingredientes e, até mesmo, realçando o sabor do sal, recomendando uma redução da mesma de modo a suavizar o sabor da erva.

A diferença dos resultados na análise sensorial entre a linguiça sem óleo e com óleo essencial de orégano pode ter acontecido por se tratar de um alimento que não se encontra na dieta diária dos provadores, além disso, grande parte dos provadores afirmaram não ter o costume de consumir condimentos, até mesmo pelo costume alimentar da região.

O grau de aceitabilidade de um alimento por parte dos consumidores é afetado por fatores inerentes ao próprio indivíduo e ao meio ambiente que o circunda. A preferência por um produto está ligada aos hábitos e padrões culturais, além da sensibilidade individual, idade, fidelidade a determinadas marcas, higiene e local de consumo, tipo e número de acompanhantes, entre outros aspectos (MINIM, 2006).

Apesar da linguiça com óleo de orégano não ter sido bem aceita, a adição do óleo essencial de orégano é uma alternativa para a substituição do uso de aditivos químicos em embutidos cárneos. Sugere-se a adição de menores quantidades de óleo essencial de orégano atuando em conjunto com aditivos químicos em quantidades inferiores ou, até mesmo, a adição de combinações de diferentes óleos essenciais, necessitando de maiores trabalhos na área.

Reduzindo o valor do orégano a aceitação da linguiça de peixe teve uma aceitação maior, indicando que apesar da presença do óleo essencial de orégano, a linguiça frescal de peixe foi bem aceita pelos provadores. Resultados semelhantes foram encontrados por VAZ (2005) durante teste de aceitação com diferentes formulações de linguiça de tilápia (*Oreochromis niloticus*), as quais variavam pelos percentuais de surimi, filé e gordura presentes. As médias para a impressão global obtidas pelas três melhores formulações foram 7,6, 7,0 e 7,5. RIBEIRO et al. (2008), ao avaliarem a aceitação de linguiça obtida de peixe-voador (*Cheilopogon cyanopterus*), encontraram média de impressão global de 7,06.

Os valores encontrados referente às análises físico-químicas para as três formulações de linguiça não apresentaram diferenças significativas, pois continham a mesma concentração de proteína animal. Mesmo tendo variado o teor de lipídios na formulação dos tratamentos da linguiça, já que foi adicionado óleo essencial de orégano em diferentes concentrações, também não houve diferença estatística referente ao teor de lipídeos entre o controle e os tratamentos.

Não há legislação específica para embutidos de pescado, porém a legislação para linguiças toscanas (cruas) solicita uma quantidade máxima de 70% de umidade e 30%

de gordura, e mínima de 12% de proteína, assim, as linguiças de cação se encontraram de acordo com o que preconiza a legislação vigente (BRASIL, 2000).

A variação na porcentagem de lipídeos, umidade e proteínas está diretamente ligado ao tipo de peixe que é utilizado, além das variações devido à idade, sexo, maturidade sexual, regime alimentar ou estação sazonal (VAZ, 2005). CHUAPOEHUK et al. (2001) publicaram os resultados de linguiças feitas de peixe-gato que continham 74,5% de umidade, 31,6% de gordura e 13,73% de proteína, todos acima do limite preconizado pela legislação vigente.

Linguiças de peixe produzidas por ALBULUSHI et al., (2011) continha 12,2% de gordura, enquanto linguiças de peixe comerciais 5,5% de gordura, ambos os valores dentro do que a legislação preconiza para este parâmetro. STANSBY (1962) descreveu que os peixes semi-gordos possuem intervalos de teor de gordura entre 5 a 15%, explicando assim, os valores encontrados no presente trabalho. VAZ (2005) verificando os aspectos físico-químico de linguiça fresca de tilápia, obteve resultados semelhantes ao encontrado neste trabalho, com valores dentro do que a legislação vigente determina.

CONCLUSÕES

O desenvolvimento de um produto inovador como linguiça frescal de peixe adicionado com óleo essencial de orégano, evidenciou ser uma opção aceitável para a industrialização, pois apresenta características nutricionais e sensoriais aceitáveis, além de ser de fácil preparo e com valor agregado.

O óleo essencial testado apresentou bons resultados como agente antimicrobiano sobre bactérias psicotróficas e *Escherichia coli* em linguiça toscana. O óleo essencial de orégano apresentou-se como uma fonte promissora de conservante antimicrobiano natural a ser utilizado em produtos cárneos, em substituição aos aditivos químicos.

As formulações da linguiça de peixe adicionada de óleo essencial apresentaram boas características nutricionais e microbiológicas, devendo ser utilizado a concentração de 0,08%.

REFERÊNCIAS

ALBULUSHI, I. M., KASAPIS, S., DYKES, G. A., AL-WAILI, H., GUIZANI, N., AL-OUFI, H. Effect of frozen storage on the characteristics of a developed and commercial fish sausages, **Journal of Food Science and Technology**, 2011.

BASTOS, M. S. R. Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) na Produção de Alimentos. **Ferramentas da Ciência e Tecnologia para a Segurança dos Alimentos,** p.283-299, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Resolução – RDC nº 216 de 15 de set. de 2004.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/bps.htm>. Acesso em: 15 fev. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. 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**: Brasília, seção I, p. 6-10, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Resolução nº 12 de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Diário Oficial da União, Brasília, 2001.

EBRAHIMI, S. N. et al. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. **Food Chemistry**, v.110, p.927-931, 2008.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. Listeria monocytogenes, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v.55, n.3, p.476-511, 1991.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture**, 2010. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/sofia/en>. Acesso em: 19 jan. 2016.

FERREIRA, V. L. P.; ALMEIDA, T. C. A.; PETTINELLI, M. L. C.; SILVA, M. A. A. P.; CHAVES, J. B. P.; BARBOSA, E. M. M. **Análise Sensorial: Testes discriminativos e afetivos**, p.127, 2000.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, p.182, 2003.

GEORGANTELIS, D., BLEKAS, G., KATIKOU, P., AMBROSIADIS, I. D.J. Effect of rosemary extract, chitosan and α-tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. **Meat Science**, v.75, p.256-264, 2007.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. Ed. Adolfo Lutz, 4ª ed., São Paulo, 2005.

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

KRUGER, M. F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina**. Dissertação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2006.

MARTINS, D.I.; MÍDIO, A.F. **Toxicologia de alimentos.** 2. ed. São Paulo: Varela, 2000.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial: estudos com consumidores**. Viçosa: Ed. UFV, p.225, 2006.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos de origem animal**. São Paulo: Artmed; 2005.

RIBEIRO, E. M. G., CAVALCANTE, A. F., SEABRA, L. M. J., DAMASCENO, K. S. F. S. C. Avaliação sensorial de formulações de lingüiças de peixe-voador (*Cheilopogon cyanopterus*). **Higiene Alimentar**, v.22, n.162, p.51-56, 2008.

ROSSI, F., ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana:** Interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu, p.118, 2005.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. Eds. **Listeria, listeriosis and food safety.** 3rd edition, Taylor and Francis, Boca Raton, Florida, 2006.

SCHEUTZ, F.; STROCKBINE, N. A. Genus I. Escherichia. The Proteobacteria, Part B: **The Gamma proteobacteria.** New York: Springer, p.625, 2005.

SIDONIO, L. et al. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, v.35, p.421-463, 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SILVEIRA, S. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de louro (*l. Nobilis*) como agente conservador natural em embutido cárneo frescal.** Tese - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2012.

STANSBY, M. E. Proximate composition of fish. In: HEEN, E.; KREUZER, R. (ed.). **Fish in nutrition**. London: Fishing News Books Ltda, p. 1-59, 1962.

STEVANATO, F. B., PETENUCCI, M. E., MATSUSHITA, M., MESOMO, M. C., SOUZA, N. E., VISENTAINER, J. E. L., ALMEIDA, V. V., VISENTAINER, J. V. Avaliação química e sensorial da farinha de resíduo de tilápias na forma de sopa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.3, p.567-571, 2007.

SUGIMURA T., WAKABAYASHI K. Carcinogênios nos alimentos. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença.** v. II. 9a Ed. Barueri: Editora Manole; p.1343-5, 2003.

VAZ, S. K. **Elaboração e caracterização de lingüiça fresca "tipo toscana" de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p.113, 2005.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os óleos essenciais estudados apresentaram bons resultados na ação antimicrobiana sobre a grande maioria das bactérias testadas, demonstrando resultados promissores para o uso de óleos essenciais como conservantes naturais.

O óleo essencial de orégano foi mais eficaz sobre todas as bactérias estudadas, além de ter sido o único que apresentou ação bactericida, indicando o seu uso como conservante e antimicrobiano natural para a produção da linguiça frescal de cação.

A produção da linguiça frescal de cação adicionada de óleo essencial de orégano mostrou-se viável, demonstrando ser uma boa opção na introdução de um novo produto no mercado afim de aumentar o consumo de pescado em nosso país, além de apresentar um novo alimento funcional que substitui aditivos químicos frequentemente utilizados por conservantes naturais.

Os embutidos estavam dentro dos padrões físico-químicos e microbiológicos de acordo com a legislação vigente, apresentando boas características nutricionais e microbiológicas, estando apropriada para o consumo humano.

As formulações da linguiça de peixe foram sensorialmente aceitáveis quando em menores concentrações do óleo essencial de orégano, devendo ser utilizada a concentração de 0,08% do óleo em sua composição.

ANEXOS

Tabela 7. Modelo da ficha do teste de aceitação global da linguiça de cação frescal.

ANÁLISE SENSORIAL DE LINGUIÇA DE PEIXE

TESTE DE ACEITAÇÃO - Global

Nome:_____

Data:_____ Sexo: M ( ) F ( ) Idade:_____ anos

Por favor, avalie a amostra servida e indique o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque a resposta que melhor reflete o seu julgamento.

(9) Gostei muitíssimo
(8) Gostei muito
(7) Gostei moderadamente
(6) Gostei ligeiramente
(5) Indiferente
(4) Desgostei ligeiramente
(3) Desgostei moderadamente
(2) Desgostei muito
(1) Desgostei muitíssimo

Nota (101): _____
Nota (202): _____
Nota (303): _____

Comentários:_____
_____

Tabela 8. Modelo da ficha do teste de aceitação avaliando os atributos da linguiça de cação frescal.

ANÁLISE SENSORIAL DE LINGUIÇA DE PEIXE

TESTE DE ACEITAÇÃO - Atributos

Nome:_____

Data:_____ Sexo: M ( ) F ( ) Idade:_____ anos

Por favor, avalie a amostra servida e indique o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque a resposta que melhor reflete o seu julgamento.

(9) Gostei muitíssimo
(8) Gostei muito
(7) Gostei moderadamente
(6) Gostei ligeiramente
(5) Indiferente
(4) Desgostei ligeiramente
(3) Desgostei moderadamente
(2) Desgostei muito
(1) Desgostei muitíssimo

Atributos	Amostras		
	101	**202**	**303**
Cor			
Aroma			
Sabor			
Textura			

Comentários:_____

_____

Tabela 9. Modelo da ficha de avaliação para o teste do grau de aceitação linguiça de cação frescal, utilizando a escala de atitude.

ANÁLISE SENSORIAL DE LINGUIÇA DE PEIXE

TESTE DE ACEITAÇÃO - Atitude

Nome:_____

Data:_____ Sexo: M ( ) F ( ) Idade:_____ anos

Por favor, avalie a amostra servida e indique o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque a resposta que melhor reflete o seu julgamento.

(7) Comeria frequentemente

(6) Comeria sempre que tivesse a oportunidade

(5) Comeria de vez em quando

(4) Comeria se estivesse acessível, mas não me esforçaria para isso

(3) Comeria ocasionalmente

(2) Raramente comeria

(1) Só comeria se não pudesse escolher outro alimento

Nota (101): _____

Nota (202): _____

Nota (303): _____

Comentários:_____

_____

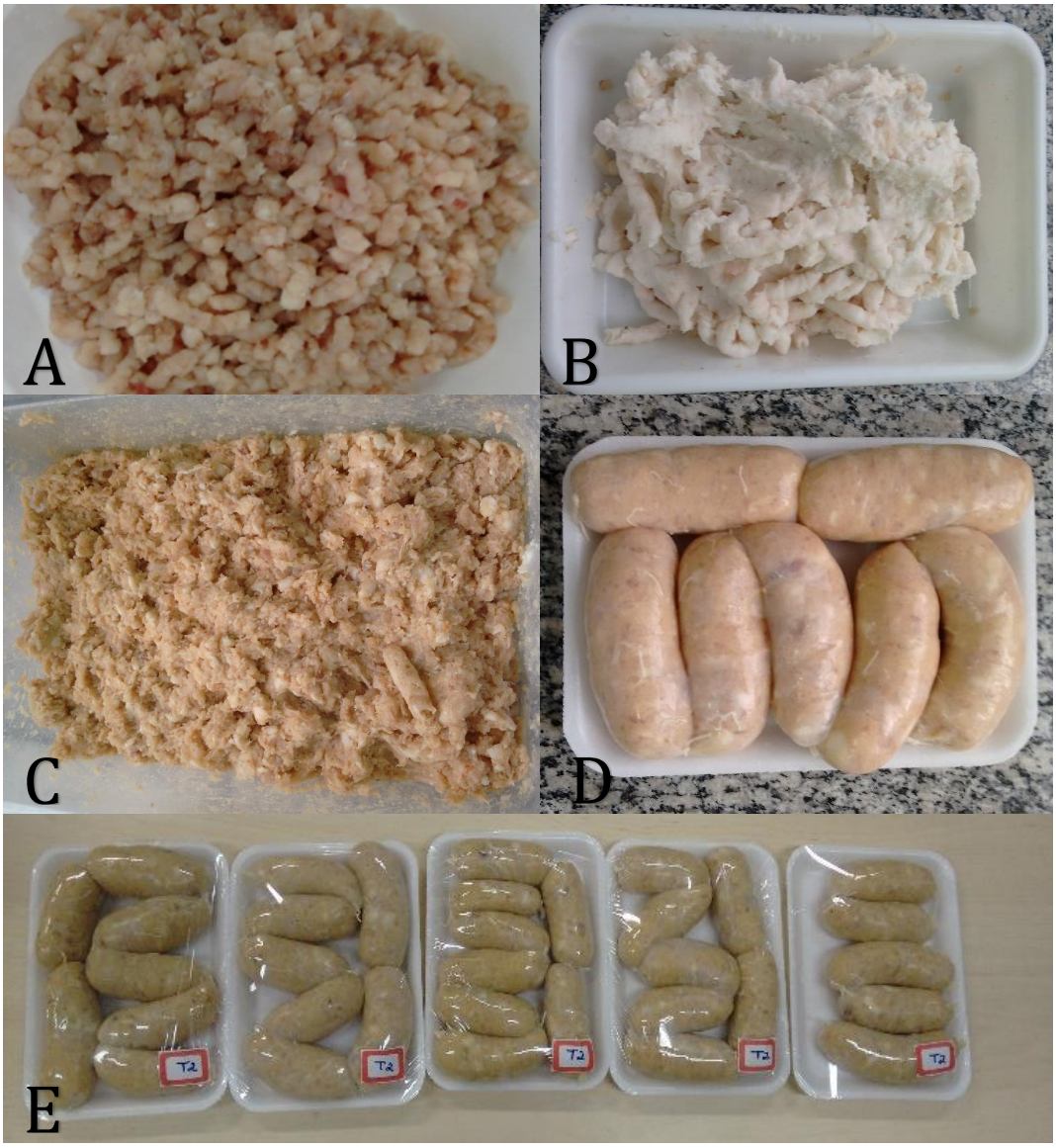

Figura 3. Etapas do processamento da linguiça. A: Carne do peixe cação moída; B: Toucinho moído; C: Massa para a linguiça; D e E: Embutidos prontos.

Pesquisa: ELABORAÇÃO DE LINGUIÇA FRESCAL DE PEIXE: USO DE ESPECIARIAS COMO AROMATIZANTE E ANTIMICROBIANO NATURAL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa, que tem duração de uma hora, porque faz parte do universo de docentes, técnicos administrativos e estudantes da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, gosta de peixe, é maior de idade e por ser consumidor de pescado. Aceitando nosso convite, você irá provar porções de 25g de linguiça de peixe adicionada de óleo essencial. Em seguida preencherá uma ficha para aferirmos o grau de aceitação, atributos sensoriais do produto, conforme os objetivos da pesquisa e intenção de compra. Os resultados dessa pesquisa serão importantes para melhorar a grande área de Tecnologia do Pescado, principalmente incrementando o paladar dos produtos da pesca. Neste sentido, necessita-se da sua colaboração assinando, caso aceite, esse TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, garantindo sua participação. Esteja ciente que uma vez autorizando, também estará autorizando o uso adequado de sua imagem durante o processo da pesquisa. Da mesma forma sinta-se à vontade para negar vossa participação.

O benefício da sua participação neste estudo será o de contribuir com o desenvolvimento da ciência e educação, nomeadamente relacionado à conservação do pescado sem aditivos químicos. A concentração do óleo essencial usado não causará nenhum risco físico para você ou para a sua família e a metodologia investigativa não apresenta riscos morais para os/as participantes. Reforço que os registros, por exigência, serão guardados à chave durante 5 anos na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), sendo destruídos logo após esse prazo.

Apesar de todos os cuidados, a análise sensorial pode gerar desconforto com o sabor de algum/alguns produto/s, assim para reverter essa possível situação garantimos disponibilizar água e outro alimento que descaracterize o gosto do item pesquisado. Dessa forma a ficha só será aplicada após a sua aceitação e assinatura nas duas vias deste termo de aprovação, onde uma ficará com você. Reforçamos também que não receberá nenhum pagamento com a sua participação, pois o ganho com a pesquisa será para toda a comunidade na forma de conhecimento e identificação de métodos usados na conservação de alimentos.

Caso eventualmente venha ficar chateado(a) ou incomodado(a), você pode **desistir** da participação em qualquer momento da pesquisa, sem qualquer prejuízo ou importunação. Os pesquisadores responsáveis por

esta pesquisa compromete-se ao final disponibilizar os **resultados** na própria Instituição, além do que serão publicados em eventos de pesquisa e servirão para a divulgação quanto a elaboração de linguiça de peixe frescal do tipo toscana adicionada de óleo essencial em substituição a aditivos químicos usados atualmente na conservação de alimentos. Também garantimos que o nome do Sr.(a) será mantido em sigilo e todos os dados coletados serão manipulados somente pelos pesquisadores e por integrantes do grupo de estudo da professora responsável.

Essa pesquisa será coordenada pelos/as professores/as Norma Suely Evangelista-Barreto (professora-orientadora) e conduzida pelo aluno colaborador Paulo Sérgio Pedroso Costa Júnior (aluno-colaborador), que estarão à disposição para os devidos esclarecimentos sobre qualquer dúvida no NEPA/CCAAB/UFRB, Rua Rui Barbosa, nº 710, Centro, Cruz das Almas (BA), CEP 44.380-000, horário comercial ou através do telefone: 75 3621 1558 ou 75 99186.5233. O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFRB, que fica situada no mesmo endereço também pode esclarecer quaisquer dúvidas, inclusive pelo tel: (75) 3621.6850.

Cruz das Almas,.....de ..... de 2016

Agradecemos a sua participação!

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa, e que concordo em participar.

_____ _____

Paulo Sérgio Pedroso Costa Júnior
(Pesquisador colaborador)
e-mail: paulomc19@hotmail.com
UFRB- Centro de Ciências Agrárias,
Ambientais e Biológicas (CCAAB)
Rua Rui Barbosa, 701 – centro
Cruz das Almas - Bahia
CEP: 44.380-000
Tel.(75) 3621-1558

Norma Suely Evangelista Barreto
(Pesquisadora responsável)
e-mail: nsevangelista@yahoo.com.br
UFRB- Centro de Ciências Agrárias,
Ambientais e Biológicas (CCAAB)
Rua Rui Barbosa, 701 – centro
Cruz das Almas - Bahia
CEP: 44.380-000
Tel.(75) 3621-1558

_____

(Assinatura ou impressão dactiloscópica do Participante da Pesquisa)