



ARÍCIA MARA MELO POSSAS

ÓLEO ESSENCIAL COMO ANTIMICROBIANO NATURAL EM PRODUTOS CÁRNEOS À
BASE DE PEITO DE PERU: ESTUDO DA TRANSFERÊNCIA DE *Salmonella* Enteritidis
DURANTE O FATIAMENTO E DO SEU COMPORTAMENTO DURANTE A VIDA ÚTIL
DOS PRODUTOS FATIADOS

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

ARÍCIA MARA MELO POSSAS

ÓLEO ESSENCIAL COMO ANTIMICROBIANO NATURAL EM PRODUTOS CÁRNEOS À
BASE DE PEITO DE PERU: ESTUDO DA TRANSFERÊNCIA DE *Salmonella* Enteritidis
DURANTE O FATIAMENTO E DO SEU COMPORTAMENTO DURANTE A VIDA ÚTIL
DOS PRODUTOS FATIADOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do
título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marta Cristina Teixeira Duarte

Co-orientadores: Prof.^a Dr.^a Guiomar Denisse Posada Izquierdo

Prof. Dr. Fernando Pérez Rodríguez

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ARÍCIA MARA
MELO POSSAS, E ORIENTADA PELA PROF.^a DR.^a MARTA
CRISTINA TEIXEIRA DUARTE

CAMPINAS

2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

P843o Possas, Arícia Mara Melo, 1989-
Óleo essencial como antimicrobiano natural em produtos cárneos à base de peito de peru : estudo da transferência de *Salmonella* Enteritidis durante o fatiamento e do seu comportamento durante a vida útil dos produtos fatiados / Arícia Mara Melo Possas. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Marta Cristina Teixeira Duarte.

Coorientadores: Fernando Pérez Rodríguez e Guiomar Denisse Posada Izquierdo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Embalagem ativa. 3. Alimentos prontos para o consumo. 4. Segurança alimentar. 5. Contaminação cruzada. I. Duarte, Marta Cristina Teixeira. II. Pérez Rodríguez, Fernando. III. Posada Izquierdo, Guiomar Denisse. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Essential oil as natural antimicrobial in turkey breast products : study of *Salmonella* Enteritidis transfer during slicing and its behaviour during shelf-life of the sliced products

Palavras-chave em inglês:

Antimicrobial activity

Active packaging

Ready to eat foods

Food safety

Cross-contamination

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Marta Cristina Teixeira Duarte [Orientador]

Eunice Akemi Yamada

Maristela da Silva do Nascimento

Data de defesa: 09-03-2015

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Marta Cristina Teixeira Duarte
Orientadora
CPQBA/UNICAMP

Dr.^a Eunice Akemi Yamada
Membro Titular
Instituto de Tecnologia de Alimentos/ITAL

Prof.^a Dr.^a Maristela da Silva do Nascimento
Membro Titular
FEA/UNICAMP

Dr.^a Glyn Mara Figueira
Membro Suplente
CPQBA/UNICAMP

Dr.^a Renata Bromberg
Membro Suplente
Instituto de Tecnologia de Alimentos- ITAL

RESUMO

Salmonella é um dos patógenos mais importantes relacionados a surtos de origem alimentar que têm como veículos carnes vendidas prontas para o consumo. A contaminação destes produtos pode ocorrer durante o processamento em operações como o fatiamento, embalagem e outros procedimentos que requerem manipulação. O aumento do consumo de produtos à base de carne de peru tem sido verificado mundialmente, pois estes aliam a praticidade dos chamados produtos “ready-to-eat” com o fato de que as carnes de aves são reconhecidas como saudáveis. Outro fator importante que influencia na escolha do consumidor é a presença de conservantes químicos nos produtos alimentícios. A substituição de conservantes químicos por substâncias naturais, como os óleos essenciais, e a incorporação destas em sistemas de embalagens ativas, representa uma alternativa interessante e atende a demanda por produtos mais naturais. Este estudo teve como objetivo desenvolver e aplicar um revestimento incorporado com óleo essencial como antimicrobiano em produtos cárneos à base de peito de peru e avaliar sua atividade contra *Salmonella* Enteritidis, simulando um sistema de embalagem ativa. Além disso, foi estudada a transferência desta bactéria a produtos de peito de peru durante o fatiamento, para simular a contaminação cruzada em equipamentos utilizados para este procedimento. Também foi avaliado o comportamento de *S. Enteritidis* durante a vida útil de fatias contaminadas dos produtos cárneos, contendo ou não revestimento de óleo essencial, armazenadas a diferentes temperaturas (10 e 25 °C). Quatro formulações dos produtos cárneos (A, B, C e D) foram estudadas para que fosse possível avaliar como a composição da matriz alimentar influencia no comportamento de *S. Enteritidis*. Dos quatro óleos essenciais testados *in vitro*, o óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho) foi o que apresentou menor concentração mínima inibitória (MIC) contra *S. Enteritidis*, sendo selecionado para ensaios posteriores. Baseando-se em análise sensorial e nos testes de triagem antimicrobiana, uma concentração de 0,08 % (v/m) de óleo essencial de *T. vulgaris* foi aplicada nos revestimentos para os produtos cárneos. Observou-se transferência de *S. Enteritidis* durante o fatiamento, a partir das lâminas de corte artificialmente contaminadas (~ 8 log UFC/lâmina) a todas as fatias analisadas (n = 20), de produtos revestidos ou não com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*. Diferenças estatísticas foram detectadas em relação à transferência do patógeno nos diferentes tratamentos ($p \leq 0,05$). O comportamento de *S. Enteritidis* nas fatias durante o armazenamento foi fortemente dependente da temperatura e da composição dos produtos, sendo verificado o crescimento a 25 °C em todas as formulações e tratamentos avaliados. Apenas o produto A propiciou o crescimento do patógeno a 10 °C. Nas fatias dos demais produtos foi verificado um perfil de sobrevivência, com redução das contagens ao longo da vida útil. O óleo essencial de *T. vulgaris* foi efetivo contra *S. Enteritidis*, durante o armazenamento de fatias revestidas a 10 °C. Testes finais indicaram que a adição e mistura do óleo essencial juntamente com os outros ingredientes, no processo industrial para obtenção dos produtos cárneos processados, possivelmente resultaria em maior atividade antimicrobiana do mesmo contra *S. Enteritidis*.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, embalagem ativa, alimentos prontos para o consumo, segurança alimentar, contaminação cruzada.

ABSTRACT

Salmonella is one of the most important pathogens involved in foodborne outbreaks related to the consumption of ready-to-eat meat products. The contamination of these products can occur during processing operations like slicing, packaging or other handling procedures. The increase in demand for turkey breast based products has been verified worldwide since they combine the convenience of ready-to-eat-products with the fact that poultry meat is recognized as healthy by consumers. The presence of chemical preservatives in food products is another important factor that influences consumer's choice. The use of natural substances as antimicrobials, such as essential oils, and their incorporation in active packaging systems represents an interesting alternative to the use of chemical preservatives. The aim of this study was to develop and implement an edible coating incorporated with essential oil as a natural antimicrobial to turkey breast products and to assess its activity against *Salmonella* Enteritidis, in order to simulate an active packaging system. This study also aimed to evaluate the transfer of *S. Enteritidis* to turkey breast products during the slicing procedure, simulating a cross-contamination scenario. Pathogen behavior during sliced turkey breast products' shelf-life at different storage temperatures (10 e 25 °C) was also evaluated. Four different formulations of products (A, B, C and D) were studied in order to evaluate how the composition of these food matrices can influence the behavior of *S. Enteritidis*. Among the four essential oils tested *in vitro*, *Thymus vulgaris* (thyme) essential oil exhibited the lowest minimum inhibitory concentration (MIC) against the pathogen and it was selected to subsequent assays. Based on sensory analysis and antimicrobial screening tests, 0.08 % (v/w) of *T. vulgaris* essential oil was applied on the edible coatings to be tested on turkey breast meat products. *S. Enteritidis* could be transferred during the slicing procedure, from artificially contaminated slicer blades (~ 8 log CFU/blade) to all slices microbiologically analyzed (n = 20), of products previously coated and not coated with *T. vulgaris* essential oil. Statistical differences were detected regarding pathogen transfer in the different treatments ($p \leq 0.05$). *S. Enteritidis* behavior on slices during storage was strongly dependent on temperature and products composition. Growth was verified in slices of all formulations and treatments during storage at 25 °C. Only one product was susceptible to pathogen growth at 10 °C (product A). In the slices of the other three products (B, C and D) a survival pattern was observed, with reductions of *S. Enteritidis* counts during shelf-life. *T. vulgaris* essential oil was effective against *S. Enteritidis* during storage of slices at 10 °C. Final tests indicated that the addition of *T. vulgaris* essential oil with the other ingredients, during the industrial manufacture process of turkey breast products, probably would result in higher antimicrobial activity against *S. Enteritidis*.

Keywords: antimicrobial activity, active packaging, ready-to-eat foods (RTE), food safety, cross-contamination.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
AGRADECIMENTOS	xix
LISTA DE FIGURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxvii
1. Introdução	1
2. Objetivos	5
2.1. Objetivo geral	5
2.2. Objetivos específicos	5
3. Revisão de Literatura	7
3.1. <i>Salmonella</i>	7
3.2. Contaminação cruzada	9
3.3. Produtos prontos para o consumo	12
3.4. Carne de peru	13
3.5. Embalagens ativas	14
3.6. Óleos essenciais como antimicrobianos naturais	16
3.6.1. <i>Thymus vulgaris</i> L.	19
3.6.2. <i>Cymbopogon martinii</i> (Roxb.) Will. Watson	19
3.6.3. <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	20
3.6.4. <i>Ocimum gratissimum</i> L.	20
4. Material e Métodos	21
4.1. Matéria-prima vegetal	21
4.2. Extração e determinação da composição química dos óleos essenciais	22
4.3. Micro-organismo e preparação do inóculo	23
4.4. Testes de triagem de atividade antimicrobiana	24
4.4.1. Teste de Difusão em disco	24
4.4.2. Teste de Microdiluição em caldo	24
4.5. Produtos cárneos	25

4.6. Avaliação sensorial dos produtos tratados com óleo essencial	28
4.6.1. Análise sensorial preliminar	28
4.6.2. Análise sensorial	29
4.7. Preparo dos revestimentos contendo óleo essencial e testes preliminares	31
4.8. Contaminação cruzada artificial dos produtos	32
4.8.1. Capacidade de sobrevivência de <i>S. Enteritidis</i> em superfícies de aço inoxidável.....	32
4.8.2. Máquina fatiadora e contaminação artificial das lâminas de corte.....	34
4.8.3. Transferência de <i>S. Enteritidis</i> de lâminas contaminadas para produtos cárneos à base de peito de peru durante o fatiamento	35
4.8.4. Quantificação da transferência de <i>S. Enteritidis</i>	36
4.9. Estudo do comportamento de <i>S. Enteritidis</i> em fatias de produtos cárneos à base de peito de peru durante vida útil	37
4.9.1. Análises microbiológicas das fatias armazenadas a diferentes temperaturas.....	38
4.9.2 Análise dos dados de comportamento de <i>S. Enteritidis</i> em fatias armazenadas a diferentes temperaturas	40
5. Resultados e Discussão	43
5.1. Composição química dos óleos essenciais utilizados.....	43
5.2. Atividade anti- <i>S. Enteritidis</i> dos óleos essenciais	48
5.2.1. Teste de Difusão em disco	48
5.2.2. Teste de Microdiluição em caldo	49
5.3. Análise sensorial dos produtos tratados com óleo essencial de <i>T. vulgaris</i>	52
5.3.1. Análise sensorial preliminar.....	52
5.3.2. Análise sensorial	53
5.4. Testes dos revestimentos contendo óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> em produtos cárneos fatiados	59
5.5. Contaminação cruzada dos produtos cárneos.....	61
5.5.1. Capacidade de sobrevivência de <i>S. Enteritidis</i> em superfícies de aço inoxidável.....	61
5.5.2. Contaminação cruzada artificial dos produtos	66
5.6. Comportamento de <i>S. Enteritidis</i> nas fatias dos produtos armazenados a diferentes temperaturas durante a vida útil	76
5.6.1. Comparação do comportamento de <i>S. Enteritidis</i> nos quatro produtos cárneos de peito de peru fatiados, não revestidos com emulsão de óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> , armazenados a 25 °C	78

5.6.2. Comparação do comportamento de <i>S. Enteritidis</i> nos produtos cárneos fatiados A e B, com revestimento e sem revestimento de óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> , armazenados a 25 °C	84
5.6.3. Comparação do comportamento de <i>S. Enteritidis</i> no produto cárneo fatiado A com revestimento e sem revestimento de óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> , armazenado a 10 °C	88
5.6.4. Comparação do comportamento de <i>S. Enteritidis</i> nos produtos cárneos fatiados B, C, D, não revestidos com óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> , armazenados a 10 °C	92
5.6.5. Comparação do comportamento de <i>S. Enteritidis</i> no produto cárneo fatiado B com revestimento e sem revestimento de óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> , armazenado a 10 °C	99
5.6.6. Monitoramento da microbiota presente nos produtos cárneos prontos para o consumo durante o armazenamento	104
5.7. Aplicação do óleo essencial por imersão das fatias	105
6. Conclusões	107
7. Referências Bibliográficas	109
APÊNDICES	119
APÊNDICE A- Fichas utilizadas em análise sensorial	121
APÊNDICE B- Composição química dos óleos essenciais estudados	125
APÊNDICE C- Parâmetros estatísticos de ajuste dos modelos pelo software GIna FiT®	129
APÊNDICE D- Legislações vigentes para produtos cárneos	131

"To those who devote their lives to science, nothing can give more happiness than making discoveries, but their cups of joy are full only when the results of their studies find practical applications"

Louis Pasteur

**Aos meus pais Alquimedes e Lourdinha
Aos meus irmãos Ana e Arnaldo**

Com amor, dedico-lhes esta Dissertação de Mestrado

AGRADECIMENTOS

- ✚ Agradeço a Deus por guiar meus passos, por indicar sempre o melhor caminho a ser seguido.
- ✚ Aos meus pais pelo amor, incentivo e credibilidade. Aos meus irmãos por serem grandes amigos.
- ✚ Aos meus orientadores, Marta, Denisse e Fernando pela acolhida e ensinamentos.
- ✚ A FEA/UNICAMP, ao CPQBA, ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade de Córdoba e ao grupo de pesquisa HIBRO por possibilitarem e fornecerem recursos para a realização deste trabalho.
- ✚ A banca examinadora, pelas contribuições e sugestões para a melhoria do trabalho.
- ✚ As minhas companheiras de mestrado Débora e Flávia pelo carinho, por todas as palavras de apoio e pelos momentos de descontração.
- ✚ Agradeço especialmente ao querido Henrique, por ser meu amigo de todas as horas durante esta etapa, por sua presença confortante e divertida, por toda a ajuda durante os estudos e a escrita desta dissertação.
- ✚ A Rapha e Ana Paula pela amizade de sempre, por me acolherem em Campinas e estarem presentes na minha vida todos os dias.
- ✚ Aos funcionários da FEA, em especial ao Cosme, Marcos e a Bianca pela ajuda e paciência.
- ✚ Aos professores do Programa de Mestrado em Ciência de Alimentos pelos ensinamentos.
- ✚ Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida e ao Banco Santander pela bolsa de mobilidade acadêmica internacional para a realização do projeto na Espanha.

Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Plantas aromáticas estudadas. (a) *T. vulgaris*; (b) *C. martinii*; (c) *C. citratus*; (d) *O. gratissimum*. (Fonte: CPMA) 21
- Figura 2-** Produtos cárneos à base de peito de peru utilizados no estudo. 26
- Figura 3-** Contaminação artificial das lâminas de corte. 35
- Figura 4-** Procedimento experimental para o estudo do comportamento de *S. Enteritidis* nas fatias dos produtos cárneos. (a) fatiamento dos produtos; (b) fatias obtidas; (c) fatias em placas de petri previamente a inoculação. 38
- Figura 5-** Halos de inibição formados devido a ação dos óleos essenciais em meio PCA previamente inoculado com *S. Enteritidis*. (TV= óleo essencial de *T. vulgaris*; OG= óleo essencial de *O. gratissimum*; CC= óleo essencial de *C. citratus*; CM= óleo essencial de *C. martinii*; C= controle negativo). 49
- Figura 6-** Histograma de frequência relativa (%) de valores hedônicos atribuídos no teste de aceitação de amostras dos produtos cárneos de diferentes tratamentos de óleo essencial de *T. vulgaris*. (■) amostra controle (▣) 5MIC (▤) 50MIC..... 56
- Figura 7-** Histograma de frequência relativa (%) de valores hedônicos atribuídos no teste de aceitação das amostras de diferentes tratamentos de óleo essencial de *T. vulgaris*. (a) amostra controle; (b) amostra tratada com 5MIC; (c) amostra tratada com 50MIC; (▣) produto A; (■) produto B. 58
- Figura 8-** Fatias revestidas com soluções contendo diferentes concentrações de amido de milho (2,5; 5,0; 7,5 %), após 10 dias de armazenamento a 25 °C. (a) revestimento sem óleo essencial de *T. vulgaris*; (b) revestimento com óleo essencial de *T. vulgaris* (0,08 % v/m). 59
- Figura 9-** Representação gráfica da redução dos níveis de *S. Enteritidis* nas superfícies de aço inoxidável inoculadas com os diferentes substratos, após ajuste do modelo Weibull aos dados de sobrevivência. (a) caldo de carne, produto A; (b) caldo de carne, produto B; (c) caldo artificial BHI; (d) solução salina; (♦) dados experimentais; (—) modelo Weibull ajustado aos dados. 63

Figura 10- Visão geral dos dados de sobrevivência de *S. Enteritidis* em diferentes substratos inoculados em superfícies de aço inoxidável. (- - -) caldo de carne, produto A; (----) caldo de carne, produto B; (— · ·) caldo artificial, BHI; (.....) solução salina. 65

Figura 11- Transferência (log UFC/cm²) de *S. Enteritidis* de lâminas de corte inoculadas a produtos cárneos à base de peito de peru, não revestidos. (a) produto A; (b) produto B; (▲) dados experimentais; (—) ajuste do modelo Weibull aos dados. 66

Figura 12- Transferência (log UFC/cm²) de *S. Enteritidis* de lâminas de corte inoculadas a produtos cárneos a base de peito de peru revestidos e não revestidos. (a) produto A; (b) produto B; (▲) dados experimentais de produtos não revestidos previamente com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*; (●) dados experimentais de produtos previamente revestidos (0,08 % v/m); (----) ajuste do modelo Weibull aos dados de fatias com revestimento; (—) ajuste do modelo Weibull aos dados de fatias sem revestimento.... 73

Figura 13- Representação do crescimento de *S. Enteritidis* nas primeiras 72 horas de análises, nos diferentes produtos cárneos fatiados estudados: (— · ·) produto A; (.....) produto B; (- - -) produto C; (— · —) produto D..... 81

Figura 14- Dados de crescimento (log UFC/g) de *S. Enteritidis* em fatias dos produtos cárneos em função do tempo (h). (a) produto A; (b) produto B; (c) produto C; (d) produto D; (▲) dados experimentais (—) ajuste do modelo de crescimento de Baranyi e Roberts aos dados. 82

Figura 15- Fatias dos produtos avaliados, não inoculadas com *S. Enteritidis*, após 12 dias de armazenamento a 25 °C. (a) produto A; (b) produto B; (c) produto C; (d) produto D.... 83

Figura 16- Fatias do produto A e B inoculadas com *S. Enteritidis*, após 12 dias de armazenamento a 25 °C. (a) produto não revestido; (b) produto revestido com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* (0,08 % v/m)..... 86

Figura 17- Representação gráfica dos dados de crescimento de *S. Enteritidis* (log UFC/g) nas fatias dos produtos revestidos ou não com emulsão contendo óleo essencial de *T. vulgaris* (0,08 % v/m), armazenadas a 25 °C. (a) produto A; (b) produto B; (▲) dados experimentais de produtos não revestidos; (●) dados experimentais de produtos revestidos; (----) ajuste do modelo aos dados de fatias com revestimento; (—) ajuste do modelo aos dados de fatias sem revestimento. 87

Figura 18- Fatias do produto A inoculadas com <i>S. Enteritidis</i> , após 18 dias de armazenamento a 10 °C. (a) produto não revestido; (b) produto revestido com emulsão de óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> (0,08 % v/m).....	90
Figura 19- Representação gráfica dos dados de crescimento de <i>S. Enteritidis</i> nas fatias do produto A revestido ou não com emulsão de óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> (0,08 % v/m), armazenadas a 10 °C. (▲) dados experimentais de produtos não revestidos; (●) dados experimentais de produtos revestidos; (- - - - -) ajuste do modelo aos dados de fatias com revestimento; (—) ajuste do modelo aos dados de fatias sem revestimento.....	91
Figura 20- Perfil de sobrevivência de <i>S. Enteritidis</i> nas fatias dos produtos, armazenados a 10 °C, após ajuste do modelo Weibull aos dados experimentais. (- - - - -) produto B; (- - - - -) produto C; (— · —) produto D.	96
Figura 21- Representação gráfica dos dados de sobrevivência de <i>S. Enteritidis</i> (log UFC/g) nas fatias dos produtos armazenados a 10 °C em função do tempo de armazenamento (h). (a) produto B; (b) produto C; (c) produto D; (▲) dados experimentais; (—) ajuste do modelo Weibull aos dados experimentais.	98
Figura 22- Fatias do produto B inoculadas com <i>S. Enteritidis</i> , após 18 dias de armazenamento a 10 °C. (a) Fatia de produto não revestido; (b) Fatia de produto revestido com emulsão de óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> (0,08 % v/m).....	102
Figura 23- Representação gráfica dos dados de sobrevivência de <i>S. Enteritidis</i> nas fatias do produto B revestido ou não com emulsão contendo óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> (0,08 % v/m), armazenadas a 10 °C. (▲) dados experimentais de produtos não revestidos; (●) dados experimentais de produtos revestidos; (- - - - -) com revestimento; (—) sem revestimento.	103
Figura 24- Crescimento de <i>S. Enteritidis</i> nas fatias do produto A imersas em óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> , armazenadas a 10 °C. (▲) dados experimentais de produtos não revestidos; (●) dados experimentais de produtos revestidos com emulsão de óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> (0,08 % v/m).....	106
Figura 25- Ficha utilizada para o teste triangular.	121
Figura 26- Ficha utilizada para o teste de ordenação.	122
Figura 27- Ficha utilizada para a análise sensorial.....	123

Figura 28- Cromatogramas obtidos por CG para os óleos essenciais extraídos das plantas em estudo. (a) <i>T. vulgaris</i> ; (b) <i>C. martinii</i> ; (c) <i>C. citratus</i> ; (d) <i>O. gratissimum</i>	125
---	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição centesimal e características dos diferentes produtos cárneos à base de peito de peru selecionados para este estudo.....	26
Tabela 2- Aditivos contidos nos produtos cárneos à base de peito de peru de acordo com informações dos fabricantes.	27
Tabela 3- Compostos presentes nos óleos essenciais utilizados neste trabalho, de acordo com análise por CG-EM.	44
Tabela 4- Diâmetros dos halos de inibição formados no teste de difusão em disco.	48
Tabela 5- Concentração Mínima Inibitória – MIC dos óleos essenciais contra <i>S. Enteritidis</i>	50
Tabela 6- Características dos julgadores participantes da análise sensorial.....	54
Tabela 7- Escores médios atribuídos pelos julgadores às amostras durante o teste de aceitação de produtos cárneos de peito de peru tratados com óleo essencial de <i>T. vulgaris</i>	54
Tabela 8- Sumário dos dados de sobrevivência ($\log \text{UFC/cm}^2$) de <i>S. Enteritidis</i> obtidos nas superfícies de aço inoxidável contendo diferentes substratos, nos diferentes tempos de amostragem.....	61
Tabela 9- Perfil observado para os dados experimentais obtidos durante o estudo do comportamento de <i>S. Enteritidis</i> nos diferentes produtos cárneos avaliados.	77
Tabela 10- Parâmetros cinéticos de crescimento de <i>S. Enteritidis</i> nas fatias dos produtos A, B, C e D, não revestidos, armazenados a 25 °C.	79
Tabela 11- Parâmetros cinéticos de crescimento de <i>S. Enteritidis</i> nas fatias dos produtos A e B, revestidos e não revestidos com emulsão de óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> (0,08 % v/m), armazenadas a 25 °C.	84

Tabela 12- Parâmetros cinéticos de crescimento de <i>S. Enteritidis</i> nas fatias do produto A, revestidas e não revestidas com emulsão de óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> (0,08 % v/m), armazenadas a 10 °C.	88
Tabela 13- Sumário dos dados de sobrevivência de <i>S. Enteritidis</i> nas fatias dos diferentes produtos, armazenados durante 18 dias, a 10 °C.	93
Tabela 14- Taxas de redução média dos níveis de <i>S. Enteritidis</i> nas fatias, nos diferentes tempos de amostragem, durante o armazenamento a 10 °C, em log UFC/g.h.	95
Tabela 15- Reduções nos níveis de <i>S. Enteritidis</i> (log UFC/g) verificados nos diferentes dias da vida útil das fatias do produto B, revestidas e não revestidas com emulsão de óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> (0,08 % v/m), armazenadas a 10 °C.	100
Tabela 16- Principais compostos presentes nos óleos essenciais das plantas aromáticas utilizadas no estudo.	126
Tabela 17- Parâmetros estatísticos de ajuste dos modelos de transferência por contaminação cruzada.	129
Tabela 18- Regulamento técnico sobre o padrão microbiológico de produtos cárneos, de acordo com RDC nº 12, da ANVISA (BRASIL).	131
Tabela 19- Padrão microbiológico de produtos cárneos, de acordo com Regulamento 1441/2007 (ESPANHA).	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AQRM – Análises Quantitativas de Risco Microbiológico

A_w = Atividade de água

BHI – “Brain Heart Infusion” (caldo infusão de cérebro e coração)

C. citratus – *Cymbopogon citratus*

C. jejuni – *Campylobacter jejuni*

C. martinii – *Cymbopogon martinii*

CDC – “Centers for Disease Control and Prevention”

CECT – Coleção Espanhola de Cultivos Tipo

CG-EM - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CPMA – Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas

CPQBA - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

CTT – Cloreto de trifenil tetrazólio

DCTA – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

E. coli – *Escherichia coli*

EPS - Exopolissacarídeos

FDA – “Food and Drug Administration”

FSA – “Food Safety Agency”

GRAS – “Generally Recognized As Safe” (geralmente reconhecido como seguro)

IR – Índice de retenção

ISO – “International Organization for Standardization”

L. monocytogenes – *Listeria monocytogenes*

lag – Tempo de latência do crescimento microbiano

MIC – “Minimal Inhibitory Concentration” (concentração inibitória mínima)

MM – Massa molecular

MSE – “Mean Square Error” (erro quadrado médio)

NA – Não adicionado

ND – Não detectado

N_D – Número total de células presente na superfície doadora

N_T – Número de células transferidas por contaminação cruzada

O. gratissimum – *Ocimum gratissimum*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – “Phosphate Buffer Solution” (Solução tampão fosfato)

PCA – “Plate Count Agar” (ágar de contagem padrão)

R² - Coeficiente de Determinação

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. Enteritidis – *Salmonella Enteritidis*

S. Typhimurium – *Salmonella Typhimurium*

S_f - Concentração de *S. Enteritidis* detectada no tempo final de amostragem

S_i – Concentração de *S. Enteritidis* detectada no tempo inicial de amostragem

S_{máx} – Densidade populacional máxima de *S. Enteritidis*

T. vulgaris – *Thymus vulgaris*

t_R – Tempo de retenção na coluna cromatográfica

TSB – “Tryptone Soy Broth” (caldo de triptona de soja)

TT – Taxa de Transferência

UCO – Universidade de Córdoba

UFC – Unidade formadora de colônia

UV – Ultravioleta

VRBL – “Violet Red Bile Lactose” (ágar vermelho violeta bile lactose)

WHO – “World Health Organization”

XLD – “Xylose Lysine Deoxycholate” (ágar xilose lisina desoxicolato)

1. Introdução

O aumento do consumo de produtos cárneos processados prontos para o consumo tem sido verificado mundialmente nas últimas décadas (BASU, 2014; WANG et al., 2014b). Este aumento se justifica pelo fato de que estes produtos representam praticidade ao consumidor, que em um mundo cada vez mais globalizado, prima pela conveniência e economia de tempo em realizar operações como desossa, cozimento e fatiamento de carnes obtidas *in natura* (SORIANO-SANTOS, 2010).

Paralelamente, os consumidores estão cada vez mais preocupados com os aspectos nutricionais dos alimentos, optando por produtos mais naturais, que possuam concentrações reduzidas de ingredientes como o sal e a gordura em suas formulações (ZANELLO et al., 2014). A presença ou ausência de aditivos químicos como conservantes também são fatores fundamentais para a escolha do consumidor (HYGREEVA; PANDEY; RADHAKRISHNA, 2014).

Neste contexto, produtos cárneos processados a base de peito de peru são enquadrados como produtos mais saudáveis e naturais. Carnes de aves, como o peito de peru, são uma boa escolha de fonte proteica para uma alimentação saudável e, produtos à base destas matérias-primas geralmente são formulados com reduzidas concentrações de sal e gordura, para atender a demanda por produtos mais saudáveis (SORIANO-SANTOS, 2010).

No entanto, produtos processados e que possuem concentrações reduzidas de ingredientes e aditivos que atuam como conservantes, são mais susceptíveis à contaminação por micro-organismos deterioradores e patogênicos, o que diminui a vida útil dos produtos

e coloca em risco a segurança do consumidor. As operações realizadas em plantas de processamento de alimentos exigem a manipulação excessiva das matérias-primas e procedimentos como os cortes levam ao extravasamento de fluidos internos, favorecendo a contaminação cruzada (ABADIAS et al., 2008).

Procedimentos de limpeza e desinfecção em superfícies, equipamentos e instalações de processamento muitas vezes não são realizados apropriadamente, o que também facilita a contaminação de alimentos (CARRASCO; MORALES-RUEDA; GARCÍA-GIMENO, 2012). Particularmente, a etapa de fatiamento de produtos cárneos, etapa prévia ao envase, merece atenção devido ao risco de contaminação cruzada, já que posteriormente os produtos fatiados não são submetidos a nenhum tratamento letal para micro-organismos patogênicos (CHEN; ZHAO; DOYLE, 2014).

A *Salmonella*, bactéria geralmente patogênica ao homem, é comumente isolada de carnes de aves, como a carne de peru, e é um dos principais micro-organismos relacionados a surtos de origem alimentar que têm como veículos carnes vendidas prontas para o consumo (MCKEE, 2012). Por ser uma bactéria muito adaptável é capaz de sobreviver em equipamentos e demais superfícies que entram em contato com alimentos, sendo facilmente transferida destas a produtos não contaminados (CARRASCO; MORALES-RUEDA; GARCÍA-GIMENO, 2012).

Neste cenário, estratégias são necessárias para aumentar a vida útil de produtos cárneos processados à base de peito de peru, bem como a segurança associada ao seu consumo. O uso de conservantes naturais em detrimento do uso de substâncias químicas e o desenvolvimento de embalagens ativas são alternativas interessantes e atendem a demanda do consumidor por produtos mais naturais (JAYASENA; JO, 2013). As embalagens ativas, dentre elas os revestimentos biodegradáveis, além de proteger os produtos das influências

ambientais externas, interagem com eles, conferindo uma característica desejável no intuito de preservar a sua qualidade (CAMILLOTO et al., 2009).

A incorporação de substâncias naturais em revestimentos comestíveis, para a preservação da qualidade de produtos cárneos, vem sendo investigada atualmente (GOSWAMI; HAN; HOLLEY, 2009). Óleos essenciais, produtos do metabolismo secundário de plantas, apresentam importantes propriedades funcionais já reconhecidas, como a antimicrobiana e antioxidante, de extremo interesse para a indústria de alimentos (BURT, 2004; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

O desenvolvimento de um revestimento incorporado com óleo essencial, para ser aplicado a produtos à base de peito de peru, é justificado para atender a demanda do consumidor por produtos mais saudáveis, naturais e seguros. O potencial antimicrobiano deste contra micro-organismos patogênicos que representam ameaças à saúde pública, como a *S. Enteritidis*, pode diminuir o risco de ocorrência de doenças de origem alimentar. Além disso, a avaliação e modelagem da transferência de *S. Enteritidis* aos produtos cárneos durante o fatiamento e o estudo do comportamento deste micro-organismo nas fatias durante a vida útil, podem ser inseridos nas análises de riscos associados ao consumo destes produtos, contribuindo para a segurança do consumidor.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e aplicar um revestimento incorporado com óleo essencial como antimicrobiano em produtos cárneos à base de peito de peru e avaliar sua atividade contra *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, simulando um sistema de embalagem ativa. Além disso, quantificar a transferência deste patógeno por contaminação cruzada durante o fatiamento dos produtos (revestidos ou não) e avaliar o seu comportamento nas fatias durante armazenamento a diferentes temperaturas.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* contra *S. Enteritidis* de quatro óleos essenciais extraídos de espécies de plantas aromáticas;
- Aplicar e avaliar a atividade de revestimento incorporado com óleo essencial em produtos cárneos à base de peito de peru.
- Avaliar a aceitação de produtos cárneos à base de peito de peru contendo o revestimento incorporado com óleo essencial, por meio de análise sensorial realizada por potenciais consumidores;
- Avaliar a capacidade de sobrevivência de *S. Enteritidis* em superfícies de aço inoxidável, simulando condições de limpeza e não higienização na indústria de produtos cárneos;
- Quantificar e modelar a transferência de *S. Enteritidis* a produtos cárneos, revestidos e não revestidos, durante a etapa de fatiamento;

- Estudar o comportamento de *S. Enteritidis* em produtos cárneos fatiados à base de peito de peru, revestidos e não revestidos, durante vida útil a diferentes temperaturas de armazenamento;
- Avaliar o efeito de diferentes composições de produtos cárneos à base de peito de peru no comportamento de *S. Enteritidis* durante armazenamento de fatias a diferentes temperaturas.

3. Revisão de Literatura

3.1. *Salmonella*

A *Salmonella* é uma bactéria do tipo bastonete, Gram-negativa, não esporulada, geralmente mesófila, anaeróbia facultativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Seus principais reservatórios são o homem e os animais (JAY, 2005). Este micro-organismo causa infecção veiculada por alimentos, a chamada salmonelose, caracterizada por causar sintomas como a gastroenterite, dor de cabeça, dores abdominais, diarreia, calafrios e vômitos (JAY, 2005). Manifestações menos comuns de infecções por *Salmonella* são septicemia e infecções focais como endocardite e meningite (KRTINIĆ; DURIC; ILIĆ, 2010).

O nível de infecção mínimo necessário para causar uma salmonelose varia em torno de 10^5 células e depende do hospedeiro e do tipo de alimento ingerido. Porém surtos ocasionados por uma quantidade relativamente baixa de células já foram registrados (JAY, 2005; KRTINIĆ; DURIC; ILIĆ, 2010). O período de incubação para *Salmonella* é de 12 a 72 horas após a exposição. O tempo de recuperação é, em média, de 4 a 7 dias. Casos em que a bactéria perfura a parede intestinal e migra até a corrente sanguínea podem ser fatais, se não houver tratamento adequado, geralmente realizado pelo uso de antibióticos (JAY, 2005; WHO, 2015).

Salmonella é um dos principais patógenos relacionados a surtos de doenças de origem alimentar, representando uma séria ameaça à saúde pública em países desenvolvidos e não desenvolvidos (AKBAR; ANAL, 2014). Por ser uma bactéria muito adaptável, é capaz de sobreviver em condições ambientais extremas, expressando diversos

mecanismos como resposta ao estresse ambiental, ou seja, a condições de adversidade (SHEN; FANG, 2012; SPECTOR; KENYON, 2012). Atualmente, já foram identificados mais de 2500 sorotipos de *Salmonella*, sendo que destes os mais comumente associados a doenças transmitidas por alimentos são *Salmonella enterica* serovar Enteritidis e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (LEE et al., 2015).

Na indústria de alimentos, salmoneloses são transmitidas quando células viáveis de *Salmonella* são introduzidas em ambientes de processamento (CARRASCO; MORALES-RUEDA; GARCÍA-GIMENO, 2012). Alimentos frequentemente envolvidos em surtos causados por esta bactéria são alimentos de origem animal, como produtos lácteos, carnes e ovos, ainda que nas últimas décadas o número de surtos relacionados a frutas e hortaliças tenha aumentando consideravelmente (IMEN et al., 2012; SAGDIC; OZTURK; TORNUK, 2013). Fatores como multiplicação em alimentos devido a temperaturas inadequadas de estocagem, tempo de cozimento insuficiente e contaminação cruzada são frequentemente relacionados à ocorrência de surtos de origem alimentar causados por este micro-organismo (DE SOUZA SANT'ANA, 2012; NØRRUNG; BUNCIC, 2008).

Muitos estudos mostram que *Salmonella* spp. é comumente isolada de carnes e produtos cárneos, incluindo produtos de *delicatessen* prontos para o consumo. *Salmonella* Enteritidis é o principal sorovar isolado de produtos cárneos (AKBAR; ANAL, 2014; SREY; JAHID; HA, 2013). Além disso, estudos mostram que carnes de aves representam uma fonte importante deste patógeno e a sua recontaminação durante o processamento pode ser considerada um fator de risco ao consumidor (FOLEY et al., 2011). Exemplos de autores que conduziram estudos recentemente para avaliar a presença e prevalência deste patógeno em produtos cárneos são Kramarenko et al. (2014), Sallam et al. (2014) e Wang et al. (2015).

3.2. Contaminação cruzada

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, EUA) existem cinco fatores de risco principais que contribuem para a ocorrência de surtos de origem alimentar. Incluem-se a obtenção de alimentos de fontes não seguras, higiene pessoal precária de manipuladores, cozimento inadequado, manipulação inadequada de alimentos e, finalmente, contaminação de superfícies e equipamentos utilizados para o processamento (SREY; JAHID; HA, 2013). Estes últimos fatores estão relacionados ao risco de ocorrência de contaminação cruzada de alimentos.

De acordo com Pérez-Rodríguez e Valero (2008) o termo contaminação cruzada é *“um termo geral que se refere à transferência, direta ou indireta, de micro-organismos de um produto contaminado para um produto não contaminado”*.

Micro-organismos em alimentos ou ingredientes podem ser transferidos durante o contato com equipamentos ou superfícies em plantas de processamento e, posteriormente, produtos isentos de tais micro-organismos podem ser contaminados ao serem processados nestes ambientes (GIBSON et al., 2013).

Manipuladores de alimentos exercem um papel crítico na transmissão de patógenos durante operações em estabelecimentos de processamento, sendo a fonte primária do patógeno quando entram no ambiente de trabalho portando bactérias (GIBSON et al., 2013). Estudos de práticas de manipulação em plantas de processamento identificaram comportamentos que contribuem para a ocorrência de contaminação cruzada e incluem: lavagem de mãos não adequada, manipulação de produtos crus ou matérias-primas, manipulação de utensílios, e uso de balanças para pesagem de matérias-primas (GIBSON et al., 2013; SOARES et al., 2012).

A contaminação cruzada é um dos fatores mais importantes que contribuem para a ocorrência de surtos de origem alimentar originados em plantas de processamento de alimentos. Nestes ambientes, o risco de contaminação é elevado devido ao contato de alimentos com superfícies contaminadas, como lâminas de corte, facas e demais equipamentos (CARRASCO; MORALES-RUEDA; GARCÍA-GIMENO, 2012).

Na indústria de produtos cárneos, o corte das matérias-primas é reconhecido como uma das principais etapas em que ocorre contaminação cruzada, especialmente no caso de produtos que podem ser vendidos já fatiados, como presuntos, mortadelas e demais carnes processadas (CHEN; ZHAO; DOYLE, 2014). Estima-se que a maioria dos casos de contaminação de carnes de *delicatessen* ocorre durante o fatiamento nos ambientes de processamento (FDA, 2013).

O fatiamento é uma etapa que deve ser bem controlada para prevenir a contaminação cruzada, pois no caso de produtos cárneos vendidos prontos para o consumo ela representa a última etapa do processamento (SHEEN; HWANG, 2008). Porém, o fatiamento realizado em ambientes como supermercados, açougues e outros estabelecimentos geralmente é realizado à temperatura ambiente, em equipamentos higienizados de maneira aleatória e não frequente (CHEN; ZHAO; DOYLE, 2014; SHEEN; HWANG, 2008).

Análises das superfícies de lâminas de corte por Microscopia Eletrônica de Varredura revelaram que, até mesmo as lâminas de aço inoxidável novas que ainda não foram utilizadas para o fatiamento, possuem numerosas microcavidades, e que o uso repetido e os procedimentos de limpeza aumentam ainda mais sua rugosidade (VORST; TODD; RYSER, 2006). Estas cavidades possibilitam a adesão e multiplicação de micro-

organismos com a consequente formação de biofilmes, o que permite a transferência deles aos alimentos durante o fatiamento de produtos não contaminados (GIBSON et al., 2013).

Listeria monocytogenes, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* O157:H7 são os patógenos mais comumente transferidos durante a contaminação cruzada que ocorre em ambientes de processamento (CARRASCO; MORALES-RUEDA; GARCÍA-GIMENO, 2012). Surtos causados por estes micro-organismos, devido ao consumo de produtos cárneos contaminados durante o fatiamento já foram registrados mundialmente (CAMPBELL; HOWLETT; EL AKKAD, 2008; CHEN; ZHAO; DOYLE, 2014; WILLIAMS et al., 2000).

De acordo com rastreabilidade realizada para a determinação da fonte de contaminação após a ocorrência de surtos, a transferência de *Salmonella* spp. presente em biofilmes de superfícies de contato com alimentos têm sido considerada uma das principais causas da ocorrência de doenças de origem alimentar associados ao consumo de carnes de aves (SREY; JAHID; HA, 2013; WANG et al., 2015).

A importância da contaminação cruzada durante o fatiamento e demais operações realizadas em plantas de processamento de alimentos levou pesquisadores a quantificar e modelar a transferência de patógenos de superfícies aos alimentos e, inserir estes modelos nas chamadas Avaliações Quantitativas de Risco Microbiológico (AQRM), para reduzir o risco de exposição dos consumidores a estes micro-organismos durante o consumo de produtos processados (GIBSON et al., 2013; LIN et al., 2006; SHEEN; HWANG, 2008).

Modelos que descrevem o comportamento de patógenos em produtos contaminados durante vida útil e armazenamento a diferentes temperaturas, também são inseridos nas AQRM, tendo sempre em vista a segurança do consumidor (PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2008).

3.3. Produtos prontos para o consumo

Atualmente, existe uma crescente demanda por produtos vendidos prontos para o consumo, os chamados produtos “ready-to-eat” (CAMPOS et al., 2013). As matérias-primas *in natura* são transformadas, processadas e os produtos deste processamento são disponibilizados no mercado, prontos para serem consumidos. Incluem-se nesta modalidade de alimentos os pratos prontos, frutas e verduras minimamente processados, carnes de *delicatessen*, entre outros. A obtenção de alimentos prontos para o consumo representa economia de tempo para realização de operações como desossa, corte e cozimento de carnes, bem como operações de lavagem, descascamento e corte de frutas e verduras, sendo, portanto, conveniente para os consumidores (ABADIAS et al., 2008; CAMPOS et al., 2013).

O processamento de alimentos realizado para obtenção de produtos prontos para o consumo exige a manipulação excessiva das matérias-primas e operações como o corte expõem a estrutura das mesmas, rompendo tecidos e causando a liberação de fluidos internos de carnes, frutas e vegetais (MURIEL-GALET et al., 2012). Dessa forma, o corte pode facilitar a contaminação por micro-organismos deterioradores, bem como acelerar outros processos de deterioração como a oxidação lipídica, com consequente redução da vida de prateleira dos alimentos processados (FRANCIS et al., 2012).

Além disso, estes produtos geralmente não são submetidos a tratamentos letais para patógenos previamente ao consumo e a recontaminação deles por micro-organismos patogênicos após o processamento representa um risco para o consumidor (SREY; JAHID; HA, 2013). Por esta razão, a ingestão de produtos prontos para o consumo contaminados com micro-organismos patogênicos, incluindo produtos de origem animal ou vegetal, já foi

relacionada a um grande número de surtos de origem alimentar (CDC, 2015; CAMPOS et al., 2013; GIBSON et al., 2013).

3.4. Carne de peru

O consumo per capita de carne de peru aumentou de 0,5 para 1,8 kg/pessoa no Brasil, entre os anos de 2003 e 2012. Além disso, o Brasil é um dos cinco países que mais produzem carne de peru no mundo. No cenário mundial, o consumo de carne de frango e de peru, aumentou aproximadamente em 7 %, de 2010 a 2013. As carnes de aves, em geral, estão se popularizando devido ao preço mais baixo e por serem consideradas carnes mais saudáveis, em relação a outras carnes disponíveis no mercado (SORIANO-SANTOS, 2010).

O crescimento no consumo também foi facilitado pela diversificação da forma do produto, obtido a partir da carcaça inteira tradicional para muitos tipos de itens in natura e processados encontrados no varejo. Muitos destes produtos são vendidos prontos para o consumo e atendem aos requerimentos dos consumidores por produtos saudáveis, e, geralmente, possuem concentrações reduzidas de sal e gordura, sendo muitas vezes isentos de conservantes químicos em suas formulações (KARADAL et al. 2014, SMITH, 2012).

Nutricionalmente, a carne de peru, com exceção da pele, possui alto teor de proteínas de elevado valor. Carne de frango e peru possuem níveis mais elevados de proteínas e níveis mais reduzidos de gordura, em comparação às carnes vermelhas. A carne de peru, também é uma boa fonte de selênio, zinco, niacina, vitaminas B6 e B12 (SORIANO-SANTOS, 2010).

A perecibilidade da carne de peru, como também de outros tipos de carne, tornou necessária a busca por alternativas para o aumento da sua vida útil. As principais causas da

deterioração da qualidade desta carne são a contaminação microbiana e a oxidação. Embalagens que ajudam a prevenir a contaminação por micro-organismos deterioradores e patogênicos têm sido desenvolvidas para manter a qualidade da carne de peru durante o armazenamento. Tecnologias desenvolvidas recentemente, incluindo o uso de compostos naturais, como antioxidantes e antimicrobianos, e aplicação de pressão hidrostática, também estão sendo aplicadas à carne de peru e produtos à base de carne de peru (PÉREZ-CHABELA, 2012).

Micro-organismos deterioradores comumente isolados de carne de peru pertencem aos gêneros *Pseudomonas* e *Lactobacillus*. Micro-organismos patogênicos de preocupação pertencem aos gêneros/espécies *Campylobacter* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., entre outros. Estudos mostram que um grande número de sorotipos de *Salmonella* isolados de carne de peru é resistente a antibióticos, o que traz à tona novamente a necessidade de investigação de novas substâncias antimicrobianas (PÉREZ-CHABELA, 2012).

3.5. Embalagens ativas

Embalagem ativa é definida como uma embalagem que além de promover uma barreira contra influências externas, confere aos alimentos alguma característica desejável. Portanto, além de proteger os produtos, uma embalagem ativa interage com eles, com o objetivo de manter a qualidade nutricional, sensorial, o frescor e a segurança (SÁNCHEZ-ORTEGA et al., 2014).

O desenvolvimento de embalagens ativas para a preservação da qualidade de produtos prontos para o consumo é de grande importância, já que a demanda por estes produtos processados, tem imposto novos requerimentos às embalagens, que devem

assegurar a eles uma vida de prateleira adequada. Em particular, filmes e revestimentos comestíveis são tipos de embalagens ativas que têm demonstrado proteger alimentos da deterioração precoce e do crescimento de patógenos (MURIEL-GALET et al., 2010, 2012; RAYBAUDI-MASSILIA; MOSQUEDA-MELGAR; MARTÍN-BELLOSO, 2008).

Revestimentos comestíveis são camadas finas de soluções de material comestível, constituídas por substâncias GRAS (Geralmente Reconhecidas como Seguras), aprovadas pela “Food and Drug Administration” (FDA) e que estejam em conformidade com os regulamentos aplicados aos produtos a serem revestidos (CAMPOS; GERSCHENSON; FLORES, 2010). Eles podem representar uma barreira à umidade, ao oxigênio e impedir a perda de massa, contribuindo para a manutenção das características do produto fresco. Materiais comumente empregados no desenvolvimento destas embalagens ativas são amidos, quitosana, celulose, alginato, emulsificantes, entre outros. Os revestimentos são aplicados diretamente na superfície do produto por imersão, aspersão ou espalhamento, para criar uma atmosfera modificada (SÁNCHEZ-ORTEGA et al., 2014).

A quitosana é a base mais comumente utilizada para a confecção de revestimentos comestíveis para aplicação em produtos cárneos (DUAN; CHERIAN; ZHAO, 2010). Porém, o amido, polissacarídeo de reserva de cereais, raízes e tubérculos, possui algumas vantagens em relação a outras bases comumente utilizadas, por se tratar de um material renovável e altamente disponível, além de largamente utilizado industrialmente. Além disso, o amido é biodegradável, apresenta baixo custo e boas propriedades mecânicas (CAMPOS; GERSCHENSON; FLORES, 2010). Muitos autores têm experimentado o uso de emulsões que também atuam como um revestimento para manter a qualidade do produto fresco por um período de tempo maior, além de mantê-lo seguro para o consumidor (LANDRY et al., 2014; OTONI et al., 2014).

Embalagens ativas também podem ser carreadoras de substâncias antimicrobianas. Nestes casos, é possível verificar o efeito inibitório destas substâncias contra micro-organismos deterioradores e patogênicos. Componentes antimicrobianos são embutidos na matriz dos revestimentos e filmes de onde migram até a superfície do alimento, ou para o “*headspace*” da embalagem primária do produto no caso de compostos voláteis, interagindo com os micro-organismos durante a vida útil do produto ou parte dela. Agentes antimicrobianos geralmente empregados em revestimentos são: ácidos orgânicos, ésteres de ácidos graxos, polipeptídios, óleos essenciais, nitritos e sulfatos, entre outros (CAMPOS; GERSCHENSON; FLORES, 2010).

A eficiência de embalagens ativas contendo substâncias antimicrobianas, desenvolvidas para preservar a qualidade de produtos cárneos e mantê-los seguros para o consumidor, já foi documentada por muitos autores (JUCK; NEETOO; CHEN, 2010; LIANG et al., 2011; SÁNCHEZ-ORTEGA et al., 2014).

3.6. Óleos essenciais como antimicrobianos naturais

De acordo com Solórzano-Santos e Miranda-Novales (2012), os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário de plantas que podem ser extraídos de frutas, flores, cascas, ou de plantas inteiras. Metabólitos secundários são compostos presentes em células especializadas que não são diretamente essenciais ao metabolismo das plantas, mas podem ser requeridos para a sua sobrevivência no ambiente em que se encontram (CHEYNIER et al., 2013).

Os óleos essenciais podem ser extraídos por diferentes métodos como a utilização de solventes orgânicos, gorduras, CO₂ supercrítico, hidrodestilação e destilação por arraste de vapor (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012). A caracterização

química dos óleos essenciais pode ser realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas – CG-EM. Estes podem ser constituídos por mais de 45 compostos diferentes (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

O acúmulo de óleos essenciais nos tecidos das plantas é uma estratégia de adaptação, sobretudo em condições de estresse. A nível celular, o acúmulo dos compostos presentes nos óleos essenciais é devido ao aumento da atividade de enzimas como a fenilalanina amônia liase, a chalcona sintase, entre outras. A atividade de fosfoenolpiruvato carboxilase também aumenta, sugerindo sua atuação em processos no apoio à defesa e reparação das plantas. Portanto, os compostos presentes em óleos essenciais conferem várias funções fisiológicas para que as plantas possam sobreviver e se adaptarem a distúrbios ambientais (CHEYNIER et al., 2013).

Muitos fatores interferem na produção de óleos essenciais pelas plantas, bem como em sua composição. Dentre os fatores abióticos podem-se destacar a temperatura, mudanças climáticas como variações de pluviosidade, quantidade e comprimento de onda da luz incidida, disponibilidade de água e poluentes presentes na atmosfera. O ataque às plantas por insetos ou micro-organismos representa um fator biótico que também interfere na composição e produção de óleos essenciais. Portanto, o óleo essencial produzido por plantas de mesma espécie pode sofrer variações na composição, de acordo com fatores bióticos e abióticos (SILVA et al., 2011).

Na indústria de alimentos, os óleos essenciais são usados como aromatizantes. Na indústria farmacêutica são utilizados na formulação de medicamentos analgésicos, antissépticos, sedativos, expectorantes, estimulantes, estomáquicos, etc. As atividades biológicas dos óleos essenciais, dentre elas a antimicrobiana, são atribuídas à grande variedade de compostos que os constituem (CHEYNIER et al., 2013).

Os compostos ativos presentes em óleos essenciais podem ser divididos em quatro grupos principais: terpenos, terpenoides, fenilpropanoides e outros. A atividade bacteriostática e/ou bactericida é exercida principalmente pelos compostos terpenoides. Particularmente, a ação antimicrobiana dos compostos fenólicos monoterpênicos timol e do seu isômero carvacrol tem chamado a atenção de microbiologistas. Acredita-se que o efeito antimicrobiano de óleos essenciais é potencializado pelo sinergismo entre os diferentes compostos que os constituem (BURT, 2004; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

A hidrofobicidade dos óleos essenciais permite que os mesmos interajam com os lipídeos da membrana celular bacteriana e mitocondrial, alterando a organização das estruturas celulares, tornando-as permeáveis. Esta alteração leva ao intenso extravasamento de moléculas, prejudica o metabolismo energético, a entrada de nutrientes, o transporte de elétrons e influencia a síntese do material genético, fatores que levam à morte celular dos micro-organismos (BURT, 2004; GIBRIEL et al., 2013).

Estudos desenvolvidos no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias (CPQBA/UNICAMP) mostraram que óleos essenciais apresentaram capacidade de controlar o crescimento de diversos micro-organismos (DUARTE et al., 2005, 2007, 2012). Em geral, o uso de produtos naturais de plantas tem recebido atenção, porque muitos deles apresentam propriedades funcionais adicionais já reconhecidas, como atividade anticâncer e antioxidante (JAYASENA; JO, 2013, 2014).

As espécies aromáticas selecionadas para este estudo serão brevemente descritas a seguir.

3.6.1. *Thymus vulgaris* L.

O *Thymus vulgaris* é uma planta aromática da família Lamiaceae, popularmente conhecida como tomilho, originária da Europa e cultivada no sul e sudeste do Brasil. Esta planta, que é aplicada na indústria de alimentos como condimento, apresenta sabor muito pronunciado, balsâmico e picante (ROCHA, 2012). A aplicação do óleo essencial do *T. vulgaris* em alimentos como um aditivo natural, individualmente ou associado a outros tratamentos que objetivam impedir o crescimento microbiano, tem sido explorada por muitos autores em virtude do seu potencial antimicrobiano já comprovado (HAN et al., 2015; HYUN et al., 2015; JAYASENA; JO, 2013; KARABAGIAS; BADEKA; KONTOMINAS, 2011; KOSTAKI et al., 2009). O elevado potencial antioxidante do óleo essencial de *T. vulgaris* também é de grande interesse, sobretudo na indústria de produtos cárneos (JAYASENA; JO, 2014)

3.6.2. *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Will. Watson

O *Cymbopogon martinii*, popularmente conhecido como palmarosa, é um capim originário da Índia pertencente à família Poaceae e possui aroma floral semelhante ao aroma do óleo de rosas. O óleo essencial de *C. martinii* é amplamente usado em perfumaria, na produção de sabões, aroma para perfumes, preparações de cosméticos, para mascarar o odor de pesticidas e na fabricação de produtos repelentes para insetos. Na medicina, o óleo volátil é usado como um medicamento natural contra uma série de moléstias (RAO et al., 2005). Poucos autores documentaram estudos de aplicação de óleo essencial de *C. martinii* em alimentos. Raybaudi-Massilia et al. (2008) estudaram a aplicação deste óleo em um sistema de embalagem ativa para melões e obtiveram

resultados positivos contra *S. Enteritidis* e micro-organismos deterioradores, além do aumento da vida de prateleira destes frutos.

3.6.3. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

O *Cymbopogon citratus*, pertence à família Poaceae, é originário da Índia e cultivado em todos os países na região dos trópicos (MARTINS, 2000). O nome popular desta espécie aromática no Brasil é capim-limão. Estudos que avaliaram a aplicação do óleo essencial de *C. citratus* em produtos alimentícios já foram relatados. Por exemplo, Barbosa et al. (2009) estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial desta espécie aromática contra micro-organismos patogênicos e deterioradores em carne moída. Leandro et al. (2013) e Ahmad et al., (2012) também avaliaram a atividade antimicrobiana de óleo essencial de *C. citratus* em produtos cárneos e verificaram a extensão da vida útil dos produtos devido a ação antimicrobiana desta substância.

3.6.4. *Ocimum gratissimum* L.

O alfavacão, alfavaca ou alfavaca-cravo, é uma planta aromática pertencente à família Lamiaceae, provavelmente originária da Índia e subespontânea em todo o Brasil. Extratos obtidos da planta têm sido usados popularmente para fins medicinais. Por apresentar sabor e odor semelhantes ao do cravo-da-índia, é utilizado também como condimento na culinária (MORAES et al., 2011). Estudos que visam a aplicação do óleo essencial de *O. gratissimum* em alimentos são necessários, tendo em vista que o seu potencial antimicrobiano *in vitro* já foi extensamente avaliado e reconhecido (DUARTE et al., 2005; JAYASENA; JO, 2013; SARTORATTO et al., 2004).

4. Material e Métodos

4.1. Matéria-prima vegetal

A atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais das espécies aromáticas exóticas *Thymus vulgaris* (tomilho), *Ocimum gratissimum* (alfavacão), *Cymbopogon martinii* (palmarosa) e *Cymbopogon citratus* (capim-limão), contra *S. Enteritidis* foi estudada. As plantas escolhidas para estudo (Figura 1) pertencem à Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA/CPQBA) e foram selecionadas por apresentarem atividade contra outras cepas de *Salmonella* spp. em estudos conduzidos anteriormente por outros autores (AKIN-OSANAIYE; AGBAJI; DAKARE, 2007; LEANDRO et al., 2013; SARTORATTO et al., 2004; SCHERER et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2013).



Figura 1- Plantas aromáticas estudadas. (a) *T. vulgaris*; (b) *C. martinii*; (c) *C. citratus*; (d) *O. gratissimum*. (Fonte: CPMA)

4.2. Extração e determinação da composição química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais utilizados nos ensaios foram obtidos por hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger no CPQBA (DUARTE et al., 2007). Em seguida, foram submetidos à análise por Cromatografia Gasosa acoplada a detector seletivo de massas (CG-EM). A composição química deles foi determinada em cromatógrafo a gás “Hewlett-Packard” 6890, equipado com detector seletivo de massas “Hewlett-Packard” 5975, injetor *split/splitless*, utilizando-se uma coluna capilar “Hewlett-Packard”-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Temperaturas: injetor = 220 °C, detector = 250 °C, coluna = 60 °C, 3 °C/min, 240 °C. Vazão do gás de arraste (gás hélio super seco) = 1,0 mL/min.

Uma amostra de óleo essencial foi solubilizada em acetato de etila (15 mg/mL) para a análise. Os índices de retenção (IR's) foram determinados por meio da injeção de padrões de hidrocarbonetos e amostras de óleos essenciais nas mesmas condições descritas anteriormente. Os componentes dos óleos essenciais foram identificados por comparação com os dados descritos na literatura e os perfis na biblioteca espectral de massa NIST 05, bem como a comparação do índice de retenção de dados e espectros de massa relatados na literatura (ADAMS, 2007).

Os óleos essenciais foram transportados ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade de Córdoba (Espanha) (DCTA/UCO) (“Material Transfer Agreement n° 25/2013/CPQBA”). Todos os ensaios microbiológicos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Higiene de Alimentos, da referida universidade espanhola.

4.3. Micro-organismo e preparação do inóculo

A cepa *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis ATCC13076, referência para UNE-CEN ISO/TS 11133 (Microbiologia de Alimentos para Consumo Humano e Animal) e ISO 6579 (Microbiologia de Alimentos e Rações para Animais), foi selecionada para os experimentos e fornecida pela Coleção Espanhola de Cultivos Tipo (CECT). A cepa foi mantida a -18 °C em tubos criogênicos (Microbank®), contendo esferas plásticas (miçangas) e crioprotetores.

Dois dias antes de cada experimento, uma esfera foi transferida para um tubo contendo 4,5 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB, Oxoid) e este foi então incubado a 37 °C por 24 h. Em seguida, um volume de 0,5 mL da cultura inicial foi transferido a outro tubo contendo 4,5 mL de TSB e a incubação feita nas mesmas condições que a primeira (37 °C) até que a bactéria atingisse a fase estacionária de crescimento (~ 20 h). Em seguida, o TSB foi removido por meio de três lavagens consecutivas utilizando-se 5,0 mL de Solução Tampão Fosfato (PBS, Oxoid). Uma alíquota de 1,0 mL da solução foi diluída em água peptonada (0,1 % m/v) (Oxoid) e semeada em superfície em placas contendo o meio seletivo ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD, Oxoid) e o Ágar Padrão para Contagem (PCA, Oxoid).

Foi utilizada a metodologia de contagem em placas para determinar a concentração inicial da cultura utilizada (aproximadamente 10^9 UFC/mL). Diferentes concentrações de inóculo foram utilizadas nos diferentes experimentos descritos a seguir. Em todos os casos, para a obtenção do nível de inóculo desejado, diluições apropriadas foram realizadas em água peptonada (0,1 % m/v).

4.4. Testes de triagem de atividade antimicrobiana

4.4.1. Teste de Difusão em disco

Os óleos essenciais foram inicialmente submetidos ao teste qualitativo de Difusão em disco de acordo com metodologia de Burt e Reinders (2003). Para isto, 15 µL de cada óleo essencial foram pipetados em discos de papel de filtro estéreis de 6 mm de diâmetro cada, que foram posteriormente alocados em placas de ágar XLD e PCA. Tais placas foram inoculadas previamente, por semeadura em superfície, com 0,1 mL de uma cultura de *S. Enteritidis* com concentração de 10^6 UFC/mL. Um disco de papel de filtro sem adição de óleo essencial foi utilizado como controle negativo.

Após incubação a 37 °C por 24 h, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos. Este teste foi conduzido em duplicata, com duas repetições.

4.4.2. Teste de Microdiluição em caldo

Para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos óleos essenciais disponíveis contra a cepa de *S. Enteritidis* escolhida para este estudo foi realizado o teste de Microdiluição em Caldo segundo a Norma CLSI (2005). Nos orifícios de microplacas estéreis de 96 poços foram depositados 100 µL de caldo TSB. Na linha A foram adicionados 100 µL de soluções estoque dos óleos essenciais preparadas em caldo TSB contendo polisorbato 80 (Tween 80, Panreac) na concentração de 5,0 % (v/v).

Com o auxílio de uma pipeta multicanal, 100 µL do conteúdo dos orifícios homogeneizado da linha A foi transferido para os orifícios da linha seguinte (B), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter-se uma concentração decrescente do material em cada coluna (1,0 a 0,0078 % v/v ou 10.000 a 78 µL/L). Os 100 µL finais foram

desprezados. Em seguida, 100 µL do inóculo do micro-organismo, na concentração de 10^5 UFC/mL, foram adicionados nos orifícios.

Depois de homogeneizadas, as placas foram seladas com parafilm® e incubadas por 24 h a 37 °C. Após o período de incubação, foram adicionados nos orifícios 50 µL de uma solução “reveladora” de cloreto de trifenil tetrazólio - CTT (0,1 %) e as placas reincubadas por 3 h. A MIC foi definida como a menor concentração da amostra, capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória, isto é, quando houver crescimento do micro-organismo.

Foram também incluídos nos testes, controle do antibiótico cloranfenicol, bem como controle para confirmação da esterilidade do meio de cultura e do crescimento dos micro-organismos. De modo a confirmar o crescimento de *S. Enteritidis*, uma alíquota de 100 µL do primeiro orifício que apresentou coloração vermelha de cada coluna foi semeada em placas de XLD. Da mesma forma, o mesmo volume do último orifício de cada coluna em que não houve mudança de coloração foi semeado, para confirmar a inibição do micro-organismo pelo óleo essencial. Este teste foi realizado em triplicata para cada amostra de óleo essencial e em três repetições. A temperatura de realização dos testes foi 25 °C.

4.5. Produtos cárneos

Quatro formulações diferentes de produtos cárneos cozidos à base de peito de peru, produzidos pelas principais distribuidoras da Espanha, foram obtidas em supermercados locais de Córdoba (ES) e armazenadas a 4 °C até a realização dos experimentos. Os quatro produtos (Figura 2), identificados como Produtos A, B, C e D para fins comparativos, diferem em relação às suas concentrações de ingredientes como o sal e a gordura, bem

como em relação à presença de aditivos alimentares como conservantes, emulsificantes e antioxidantes.

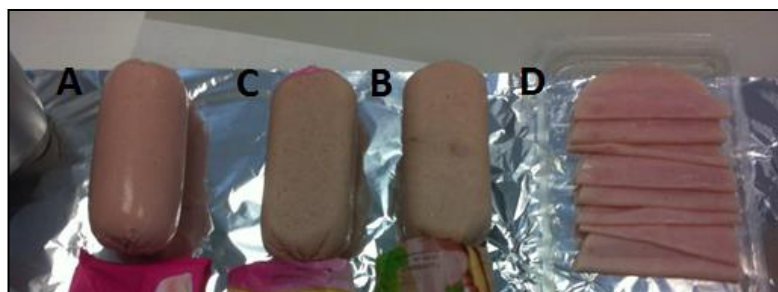


Figura 2- Produtos cárneos à base de peito de peru utilizados no estudo.

Todos os produtos possuem entre 55 e 65 % de peito de peru em suas formulações. A composição centesimal de acordo com informação dos fabricantes, o pH e a atividade de água (A_w) dos produtos cárneos são apresentados na Tabela 1. O pH foi determinado com auxílio de pHmetro (Basic 20, CRISON) e a A_w foi determinada utilizando-se o equipamento “Aqualab” (Lab Ferrer, Decagon Devices Inc.).

Tabela 1- Composição centesimal e características dos diferentes produtos cárneos à base de peito de peru selecionados para este estudo.

Composição centesimal	Produto			
	A	B	C	D
Valor energético (Kcal/100 g)	67,7	62,5	70,9	71,0
Lipídios (%)	0,5	0,5	0,5	1,0
Sal (NaCl) (%)	1,5	2,1	1,8	2,5
Carboidratos (%)	1,8	2,5	1,6	1,5
Proteínas (%)	14,0	12,0	15,0	14,0
A_w	$0,97 \pm 0,00$	$0,98 \pm 0,02$	$0,98 \pm 0,02$	$0,98 \pm 0,00$
pH	$6,45 \pm 0,02$	$6,23 \pm 0,01$	$6,34 \pm 0,01$	$6,15 \pm 0,03$

± Representa o desvio padrão da média.

A_w e pH monitorados neste estudo, previamente ao início dos experimentos.

Os principais aditivos presentes em cada produto, de acordo com informações fornecidas pelos fabricantes são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Aditivos contidos nos produtos cárneos à base de peito de peru de acordo com informações dos fabricantes.

Produto	Estabilizantes	Antioxidantes	Conservantes	Flavorizantes
A	Carragena Sorbitol Trifosfatos	Eritorbato de sódio Citrato de sódio	Nitrito de sódio	NA
B	Carragena Sorbitol Trifosfatos	NA	NA	Glutamato monossódico
C	Carragena Sorbitol Trifosfatos Goma xantana	Eritorbato de sódio Citrato de sódio	Nitrito de sódio	Glutamato monossódico
D	Carragenas	Ascorbato de sódio	NA	NA

Quantidade de cada aditivo não especificada.

NA= não adicionado.

Apenas o produto D já foi obtido na forma fatiada, porém envasado em atmosfera modificada. Os demais produtos cárneos (A, B e C) foram obtidos embalados a vácuo e a massa de cada peça foi igual a 0,4 kg.

Nos rótulos dos produtos A, B e C é exibida a informação “sem gordura”. Nos rótulos dos produtos A e C consta também a informação de que eles possuem uma concentração reduzida de sal. As informações “sem conservantes”, “sem fosfatos” e “sem corantes” são apresentadas no rótulo do produto D. Estas informações atraem a atenção dos consumidores ao aspecto saudável destes produtos.

Durante os ensaios microbiológicos conduzidos com os produtos cárneos neste trabalho foram feitas análises para verificar se estes se encontravam isentos do micro-organismo em estudo, como será descrito posteriormente.

4.6. Avaliação sensorial dos produtos tratados com óleo essencial

Ambas as análises sensoriais descritas a seguir foram realizadas em cabines individuais construídas apropriadamente no Laboratório de Análise Sensorial no DCTA/UCO (ES). O local era silencioso, bem iluminado e livre de odores, de modo a favorecer a concentração dos julgadores. A temperatura ambiente durante a realização das análises foi mantida a 25 °C.

4.6.1. Análise sensorial preliminar

Previamente ao início dos ensaios microbiológicos de aplicação do óleo essencial em produto cárneo de peito de peru foi realizada uma análise sensorial preliminar. Esta análise foi feita para verificar se os julgadores seriam capazes de distinguir sensorialmente as amostras tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial com maior atividade antimicrobiana em testes *in vitro*. Além disso, esta análise visou verificar a viabilidade sensorial da aplicação do óleo essencial de acordo com a opinião dos julgadores em relação ao aroma e sabor das amostras tratadas.

Fatias do produto cárneo de peito de peru (produto A) de aproximadamente 3 mm de espessura foram imersas em emulsões de óleo essencial de concentrações equivalentes a MIC, duas vezes a MIC (2MIC) e cinco vezes a MIC (5MIC). Após os tratamentos, as fatias foram mantidas acondicionadas em um recipiente com tampa, sob-refrigeração a 4 °C. Transcorrido um intervalo de aproximadamente 2 h as fatias foram então cortadas em

quatro partes iguais com auxílio de uma faca de aço inoxidável. Cada uma das quatro partes representou uma amostra e foi envolta em papel alumínio individualmente. Também foram preparadas amostras controle, ou seja, amostras das fatias que não receberam nenhum tratamento com óleo essencial. Às amostras de cada tratamento foram atribuídos códigos de três números, selecionados aleatoriamente (MINIM, 2013).

Os julgadores foram submetidos a dois testes discriminativos, o triangular e o de ordenação (MINIM, 2013). No teste triangular, os julgadores receberam três amostras: duas amostras com o mesmo tratamento e uma diferente. Cada julgador deveria identificar entre as três amostras provadas qual era a amostra diferente. O formulário utilizado pelos julgadores para este teste se encontra no Apêndice A (Figura 25).

No segundo teste, o de ordenação, cada julgador recebeu quatro amostras, uma de cada tratamento (1MIC, 2MIC, 5MIC, controle). Após provar as amostras, os julgadores tiveram que ordená-las de acordo com a intensidade de óleo essencial aplicada nas mesmas. O formulário utilizado pelos julgadores neste teste também se encontra no Apêndice A (Figura 26).

Os julgadores analisaram as amostras sem saber que a substância que agregava sabor e aroma às mesmas era um óleo essencial. Foram fornecidos água e pão aos participantes para a limpeza do palato entre a avaliação de amostras (EMBRAPA, 2007).

4.6.2. Análise sensorial

Foi conduzida uma análise sensorial dos produtos cárneos tratados com emulsão do óleo essencial que apresentou maior atividade antimicrobiana na triagem realizada previamente. O objetivo desta análise foi verificar a aceitação de consumidores pela

combinação “óleo essencial + produto cárneo à base de peito de peru”, por meio de um método sensorial afetivo (MINIM, 2013).

Para o preparo das amostras os produtos cárneos foram tratados com emulsões de diferentes concentrações de óleo essencial, partindo-se da MIC determinada previamente. O tratamento consistiu do espalhamento de 10 mL de emulsão de óleo essencial de diferentes concentrações na superfície dos produtos cárneos, seguido por “massageamento” do produto por 5 min. Após o tratamento, os produtos foram armazenados em recipientes com tampa, sob-refrigeração a 4 °C por 2 h e então submetidos ao fatiamento, obtendo-se fatias de aproximadamente 3 mm de espessura. Cada fatia foi cortada em quatro partes iguais e cada uma das partes foi envolvida em papel alumínio e mantida a 4 °C até o momento da análise, representando uma amostra. Às amostras de um mesmo tratamento foi atribuído um código de três números, selecionados de forma aleatória.

O teste sensorial foi um teste de aceitação utilizando-se de uma escala hedônica linear de 9 cm, na qual as respostas dos julgadores poderiam variar dos extremos “Desgostei extremamente” (menores notas) a “Gostei extremamente” (maiores notas). A ficha de avaliação preenchida pelos julgadores durante a análise sensorial se encontra no Apêndice A (Figura 27).

Cada julgador recebeu três amostras de cada produto (A e B), uma tratada com emulsão de concentração 5MIC, outra de concentração 50MIC (50 vezes a MIC) e uma amostra controle, totalizando seis amostras. Para a realização da análise, as amostras foram organizadas ao acaso. Foram fornecidos água e pão aos julgadores para a limpeza do palato entre a avaliação de amostras (EMBRAPA, 2007).

Os dados de aceitabilidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA). A análise comparativa dos resultados foi realizada por meio do teste Tukey HSD, ao nível de 5 % de significância, utilizando-se o software Statistica®, versão 8 (Statsoft, Portugal).

4.7. Preparo dos revestimentos contendo óleo essencial e testes preliminares

O amido de milho foi selecionado inicialmente como base para o revestimento comestível, neste estudo. Foram testadas soluções de amido de milho de diferentes concentrações (2,5; 5,0; 7,5 %), de acordo com metodologia de Bitencourt et al. (2014). As soluções foram aquecidas até gelatinização e redução da opacidade. Após o resfriamento a temperatura ambiente (25 °C), o óleo essencial foi adicionado.

Outro revestimento foi preparado e constituía-se de uma mistura obtida partindo-se de água esterilizada e de um emulsificante, o polisorbato 80, comumente utilizado na indústria de alimentos, a uma concentração de 1,0 % (v/v). Esta substância foi utilizada apenas para promover a mistura do óleo essencial e da água, levando à sua diluição. Após agitação vigorosa, por 2 min em vortex, obteve-se uma emulsão.

A concentração do óleo essencial de maior atividade contra *S. Enteritidis* aplicada nos revestimentos foi a máxima concentração sensorialmente aceita pelos consumidores, partindo-se do valor da MIC determinado previamente.

Os produtos cárneos foram introduzidos em bolsas de “stomacher” contendo 10 mL dos revestimentos e massageados por 10 min, para promover a interação do óleo essencial com a carne. Os produtos permaneceram dentro das bolsas, hermeticamente fechadas, armazenados sob-refrigeração a 4 °C, até o momento dos experimentos. O intervalo de tempo entre o revestimento dos produtos e o fatiamento foi de 2 h. As peças não foram

submetidas a nenhum processo mecânico de secagem, já que isto poderia levar a perda de compostos antimicrobianos por volatilização.

Os produtos revestidos foram fatiados, transferidos a placas de Petri estéreis e armazenados a 25 °C, por 10 dias, com o objetivo de avaliar o efeito dos revestimentos sobre a aparência das fatias. Produtos fatiados não revestidos também foram armazenados para que fosse possível comparar a aparência das fatias de ambos os tratamentos ao longo do período de armazenamento. Apenas as duas formulações dos produtos à base de peito de peru analisadas sensorialmente (A e B) foram revestidas.

4.8. Contaminação cruzada artificial dos produtos

4.8.1. Capacidade de sobrevivência de *S. Enteritidis* em superfícies de aço inoxidável

Neste teste, três diferentes substratos (solução salina, caldo nutritivo e caldo de carne) foram utilizados para contaminar superfícies de aço inoxidável, simulando diferentes condições em plantas de processamento de produtos cárneos, segundo metodologia de Pérez-Rodríguez et al. (2013). Solução salina (0,85 % m/v) (Oxoid) foi usada para simular uma condição de limpeza da superfície, enquanto o caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Oxoid) e caldo de carne foram utilizados para simular condições de não higienização. O BHI foi utilizado para avaliar se ele pode ser usado como modelo para reproduzir a sobrevivência bacteriana em superfícies não higienizadas, na indústria de produtos cárneos.

Para obter o caldo de carne, cortes em cubos dos produtos à base de peito de peru (2 x 2 x 2 cm) foram transferidos a uma bolsa de “stomacher” juntamente com 20 mL de solução salina e submetidos a homogeneização em equipamento “Stomacher” (400, IUL

Instruments), por 2 min. O caldo obtido foi esterilizado por filtração em filtros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore). Duas formulações dos produtos foram utilizadas para obtenção do caldo de carne, A e B, com base em testes preliminares que indicavam que nestes produtos o comportamento de *S. Enteritidis* era diferente, em determinadas condições.

Placas de aço inoxidável foram esterilizadas em autoclave e setores de 10 cm² (2 x 5 cm) foram delimitados nas mesmas. Uma placa foi utilizada para cada substrato separadamente. Nos setores delimitados foram adicionados 100 µL dos substratos contendo o inóculo ($\sim 10^8$ UFC/cm²). Um nível alto de inóculo foi fixado neste teste baseado para que fosse possível obter contagens de *S. Enteritidis* durante maior período de amostragem. Em seguida, os substratos foram coletados dos setores com auxílio de “swabs” de alginato de cálcio (Calgiswab, Puritan Medical Product LLC.), em diferentes tempos de amostragem após a inoculação das superfícies (0; 0,5; 1; 2; 6; 24 e 48 h). Os “swabs” foram então transferidos a tubos contendo água peptonada (0,1 % m/v) e agitados vigorosamente por 2 min em vortex para proporcionar o desprendimento das células para o meio.

O material foi semeado em placas de XLD e PCA utilizando-se o equipamento “Spiral Plater” (Eddy Jet, IUL), seguido por incubação (37 °C/24 h) e as contagens bacterianas foram determinadas para a obtenção e avaliação das curvas de sobrevivência de *S. Enteritidis* nas superfícies de aço inoxidável. Também foi feita semeadura em profundidade para diminuir o limite de detecção do micro-organismo nas superfícies inoculadas.

Os dados de sobrevivência foram expressos em log UFC/cm² versus tempo (h) e, subsequentemente o modelo Weibull foi ajustado aos mesmos, usando o GInaFiT toolbox, add-in implementado para Excel (GEERAERD; VALDRAMIDIS; VAN IMPE, 2005). Os valores de redução das concentrações do micro-organismo nos diferentes intervalos de

amostragem foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os grupos homogêneos foram estimados pelo teste Tukey HSD ($\alpha = 0,05$), por meio do software Statistica, versão 8.

4.8.2. Máquina fatiadora e contaminação artificial das lâminas de corte

Para os experimentos de contaminação cruzada foi utilizada uma máquina fatiadora doméstica (MAS6200, Bosch, Alemanha). Antes de utilizadas, a máquina e suas lâminas de corte de aço inoxidável foram lavadas, desinfetadas com etanol 70 % (v/v) (Panreac) (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2007) e submetidas à radiação ultravioleta (UV- 254 nm) por 10 min em câmara de fluxo laminar. Caldo de carne foi utilizado como veículo do inóculo para contaminação artificial das lâminas de corte, simulando condições de não higienização nas plantas de processamento. Para isso, caldo de carne foi obtido como descrito no item 4.8.1. e o inóculo adicionado ao mesmo, de modo a obter-se uma concentração de 10^8 UFC/mL. Este estudo foi desenhado para simular o pior cenário possível de contaminação cruzada do equipamento para o produto, durante o fatiamento (elevado nível de inóculo nas lâminas de corte).

Polisorbato 80 foi adicionado ao caldo de carne previamente a uma concentração de 10 % (v/v) para facilitar a dispersão do inóculo nas lâminas. Alíquotas de 0,5 mL do caldo contendo *S. Enteritidis* foram distribuídas uniformemente com auxílio de uma pipeta nas extremidades das lâminas de corte, que foram alocadas em câmara de fluxo laminar por 30 min, para que o inóculo pudesse aderir às mesmas (Figura 3) (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2007).

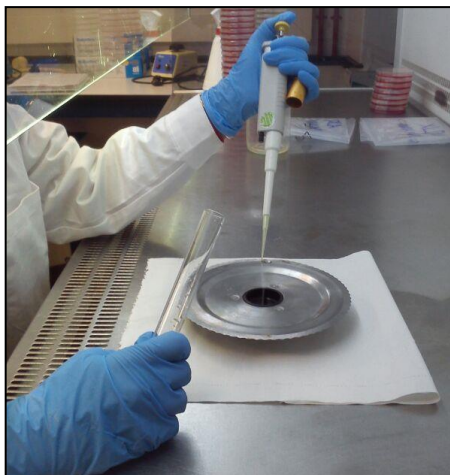


Figura 3- Contaminação artificial das lâminas de corte.

4.8.3. Transferência de *S. Enteritidis* de lâminas contaminadas para produtos cárneos à base de peito de peru durante o fatiamento

Depois de secas, as lâminas foram colocadas na máquina fatiadora, e os produtos cárneos fatiados 21 vezes (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2007), para que fossem obtidas fatias uniformes (14–16 g cada). A primeira fatia de cada produto não entrava em contato com o lado contaminado da lâmina, ou seja, com o inóculo e, portanto foi descartada durante as análises microbiológicas. Produtos revestidos e não revestidos, das formulações A e B, foram submetidos ao fatiamento.

O fatiamento dos produtos foi realizado em ambiente devidamente higienizado e bem controlado. A temperatura foi mantida a 25 °C e a umidade relativa variou entre 35 e 40 % no ambiente onde foram conduzidos os ensaios.

4.8.4. Quantificação da transferência de *S. Enteritidis*

Para estimar o número de células viáveis transferidas durante o fatiamento, cada fatia foi inserida independentemente em bolsas de “stomacher”. Água peptonada (1,0 % m/v) foi introduzida nas bolsas com auxílio do equipamento “Dilutor” (IUL, Instruments), de maneira que uma diluição decimal fosse alcançada. O conteúdo das bolsas foi homogeneizado em “stomacher” por 2 min. O material homogeneizado das primeiras seis fatias de cada produto foi diluído serialmente, previamente à semeadura. Em todos os casos, o material foi semeado em placas de XLD utilizando-se o equipamento “Spiral Plater”. O homogeneizado das últimas fatias foi submetido à filtração utilizando-se filtros de 0,22 µm. Os filtros foram então colocados em placas de XLD e incubados (24 h/ 37 °C), para que fosse possível enumerar o micro-organismo. Em todos os casos o número de células foi determinado. O limite de detecção do micro-organismo variou de acordo com o método de semeadura empregado.

A concentração do patógeno nas fatias foi expressa por cm² de área e logaritmicamente transformada no software Excel® (Microsoft Corporation). Os dados foram expressos em concentração versus número sequencial da fatia e posteriormente modelados usando o GInaFiT toolbox. A modelagem foi realizada para facilitar a observação da tendência dos dados de transferência. As taxas de transferência (TT) do patógeno das lâminas de corte aos alimentos foram calculadas de acordo com a Equação 1 (PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2008).

$$TT = \frac{N_T}{N_D} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde N_T representa o número de células transferidas às fatias e N_D o número de células total presente na superfície doadora.

Os dados de transferência foram analisados estatisticamente utilizando-se o software Statistica, versão 8.

4.9. Estudo do comportamento de *S. Enteritidis* em fatias de produtos cárneos à base de peito de peru durante vida útil

Antes de cada experimento a máquina fatiadora foi higienizada e desinfetada (item 4.8.2.). Os produtos foram submetidos ao fatiamento (com exceção do produto D, já obtido na forma fatiada), obtendo-se fatias uniformes com massa variando entre 14 e 16 g. Cada fatia foi transferida independentemente a uma placa de Petri estéril com o auxílio de pinças de aço inoxidável, logo após o fatiamento. As fatias do produto D também foram inseridas em placas de Petri estéreis previamente à inoculação.

O fatiamento dos produtos cárneos foi realizado em ambiente controlado e apropriadamente higienizado. A superfície de contato com a máquina fatiadora foi desinfetada previamente com etanol (70 %). A temperatura ambiente foi mantida a 25 °C e a umidade relativa variou entre 35 e 40 %.

Alíquotas de 100 µL de uma cultura de *S. Enteritidis*, de concentração ajustada a 10^5 UFC/mL foram dispersas nas superfícies das fatias utilizando-se uma pipeta e, finalmente, o inóculo foi distribuído uniformemente com o auxílio de alça de Drigalski. A inoculação das fatias foi feita em câmara de fluxo laminar.

As fatias inoculadas foram então armazenadas, em condições de assepsia, a duas diferentes temperaturas, 10 °C e 25 °C. As condições de temperatura fixadas para o armazenamento das fatias refletem as condições observadas em ambientes domésticos e em estabelecimentos como supermercados, açougues ou demais cenários de processamento de produtos cárneos, onde ocorre o fatiamento.

Um esquema do procedimento experimental é apresentado na Figura 4.

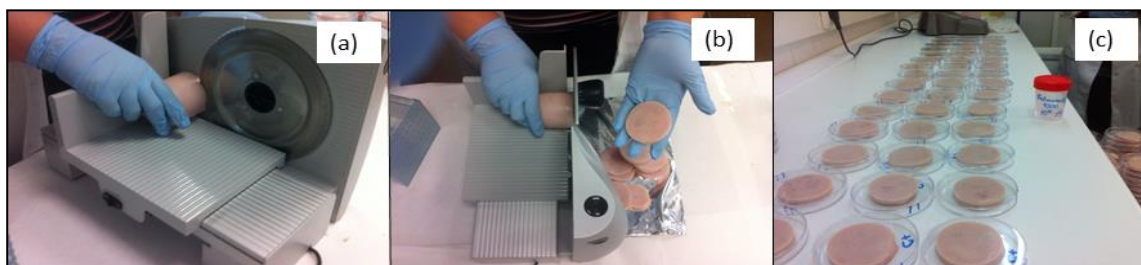


Figura 4- Procedimento experimental para o estudo do comportamento de *S. Enteritidis* nas fatias dos produtos cárneos. (a) fatiamento dos produtos; (b) fatias obtidas; (c) fatias em placas de petri previamente a inoculação.

Quatro formulações (A, B, C e D) não revestidas foram utilizadas nos ensaios descritos neste tópico, para que fosse possível avaliar como a composição do produto interfere no comportamento de *S. Enteritidis* durante a vida útil. Além disso, os produtos cárneos A e B revestidos foram submetidos aos ensaios, para que fosse possível comparar o comportamento do patógeno nos diferentes tratamentos (com revestimento e sem revestimento).

4.9.1. Análises microbiológicas das fatias armazenadas a diferentes temperaturas

As fatias armazenadas a diferentes temperaturas foram recolhidas e analisadas em diferentes intervalos durante a vida útil (0, 1, 2, 5, 8, 12, 15 e 18 d). Para isso, elas foram colocadas em bolsas de “stomacher” e, água peptonada (0,1 % m/v) foi introduzida nas bolsas com auxílio do equipamento “Dilutor”, alcançando uma diluição decimal. Após homogeneização em “stomacher” por 2 min e diluições apropriadas, o homogeneizado foi

semeado em placas de XLD com o equipamento “Spiral Plater”. Testes preliminares indicaram que a 10 °C ocorria a diminuição da concentração de *S. Enteritidis* em fatias de alguns produtos durante o armazenamento. Portanto, o método de semeadura em profundidade também foi empregado para análises das fatias armazenadas a esta temperatura, com o objetivo de diminuir o limite de detecção (1 log UFC/g). Células viáveis foram enumeradas por contagem em placas posteriormente a incubação a 37 °C, por 24 h. Análises foram conduzidas em duplicata para cada temperatura de armazenamento e os experimentos realizados três vezes em dias diferentes, para capturar a variabilidade biológica.

Fatias que não foram inoculadas com *S. Enteritidis* foram analisadas no tempo 0 de amostragem, para verificar se inicialmente os produtos cárneos estavam isentos do micro-organismo de interesse. Nestes casos, as análises microbiológicas foram realizadas de maneira semelhante à descrita para as fatias inoculadas com o patógeno, com semeadura em superfície de 0,1 mL do material diluído e homogeneizado em placas de ágar XLD. Em casos em que foi verificado o crescimento de colônias não características em meio XLD após 24 h de incubação a 37 °C (colônias amarelas ou sem cor), estas foram coletadas das placas com auxílio de uma alça bacteriológica de platina estéril e imediatamente realizou-se o espalhamento do coletado em placas contendo ágar Vermelho Violeta Bile Lactose (VRBL, Oxoid) formando-se estrias, para verificar a presença de coliformes totais. As placas foram incubadas por 24 h, a 35 °C. Da mesma forma, em todos os tempos de amostragem durante o período de armazenamento, foi realizada a semeadura em placas de PCA, para quantificação de mesófilos aeróbios em fatias dos produtos não inoculados com *S. Enteritidis*.

4.9.2 Análise dos dados de comportamento de *S. Enteritidis* em fatias armazenadas a diferentes temperaturas

Os dados de concentração de *S. Enteritidis* foram logaritmicamente transformados em Microsoft Excel 2010® (Microsoft Corporation, EUA) e expressos em função do tempo de armazenamento. Modelos matemáticos foram ajustados aos dados, para facilitar o entendimento do comportamento do patógeno a diferentes temperaturas de estocagem, para todas as formulações avaliadas, revestidas ou não com óleo essencial. Diferentes ferramentas foram utilizadas para modelar os dados de acordo com o perfil dos mesmos, como será descrito a seguir. Além disso, os dados obtidos para todos os diferentes tratamentos foram submetidos a análises estatísticas utilizando o software Statistica, versão 8.

4.9.2.1. Dados de crescimento durante vida útil

O modelo primário de crescimento de Baranyi e Roberts (1994) foi ajustado aos dados de crescimento, por meio do DMFit Add-In desenvolvido para o software Excel (Institute of Food Research, Reino Unido). Esta ferramenta estima três parâmetros cinéticos de crescimento: tempo de duração da fase de latência (lag, h), taxa máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) e a densidade populacional máxima (S_f , log UFC/g). Os parâmetros estatísticos MSE (“Mean square error” - Erro quadrado médio) e o R^2 (Coeficiente de determinação) foram analisados, para determinar se o modelo se ajustou ou não bem aos dados experimentais. Quanto maior o valor do R^2 (quanto mais próximo de 1), mais adequado é o modelo. Em relação ao MSE, quanto menor for o seu valor, melhor é o ajuste do modelo aos dados.

4.9.2.2. Dados de sobrevivência durante vida útil

O modelo Weibull foi ajustado aos dados de sobrevivência do patógeno nas fatias durante armazenamento, para descrever o decréscimo da concentração como função do tempo. A ferramenta GInaFiT, citada anteriormente (item 4.8.4.), foi utilizada para o ajuste. Os parâmetros estatísticos MSE e R^2 foram analisados para verificar se o modelo selecionado foi adequado aos dados obtidos.

5. Resultados e Discussão

5.1. Composição química dos óleos essenciais utilizados

Os resultados de composição química dos óleos essenciais, obtidos por meio da análise por CG-EM estão apresentados na Tabela 3. Os compostos majoritários estão destacados em negrito. Os cromatogramas e as estruturas moleculares dos compostos presentes em maior concentração nos óleos essenciais se encontram no Apêndice B (Figura 28 e Tabela 16, respectivamente).

De acordo com os resultados obtidos por CG-EM o geraniol constituiu quase 80 % da composição total do óleo essencial de *C. martinii*, sendo o acetato de geranila o segundo composto presente em maior concentração (12,80 %). Estes dados estão de acordo com os dados de Rao et al. (2005) e Scherer et al. (2009), que encontraram concentrações entre 78 e 85 % de geraniol e entre 3,0 e 12 % de acetato de geranila, em diferentes amostras de óleo essencial de *C. martinii*. Duarte et al. (2005) avaliaram a composição do óleo essencial de *C. martinii* e, diferentemente dos resultados determinados neste estudo, autores detectaram o geraniol na concentração de 63 % do total e 28 % de acetato de geranila.

Em estudo anterior conduzido no CPQBA (DUARTE et al., 2007) constatou-se que o geraniol, quando utilizado isoladamente apresenta atividade similar à do antibiótico cloranfenicol, apresentando elevada atividade antimicrobiana contra diferentes sorotipos da bactéria *E. coli*. Por ser o constituinte majoritário no óleo essencial de *C. martinii*, acredita-se que o potencial antimicrobiano deste óleo é fortemente ligado a presença do geraniol.

Tabela 3- Compostos presentes nos óleos essenciais utilizados neste trabalho, de acordo com análise por CG-EM.

t_R (min.)	MM	% relativa				Compostos identificados
		<i>C. martinii</i>	<i>C. citratus</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>O. gratissimum</i>	
4,92	136	-	-	0,645	0,283	α -tujeno
5,09	136	-	-	0,333	-	α -pineno
6,17	128	-	-	0,984	0,532	1-octen-3-ol
6,40	126	-	0,596	-	-	6-metil-5-hepten-2-ona
6,51	136	-	12,598	0,878	0,299	mirceno
7,55	134	-	-	16,961	-	ρ -cimeno
7,75	154	-	-	-	1,932	1,8-cineol
7,98	136	-	-	-	13,570	(Z)-ocimeno
8,30	136	1,221	0,359	-	0,508	(E)-ocimeno
8,67	136	-	-	6,628	0,369	γ -terpineno
10,13	154	3,874	-	2,083	-	linalol
11,85	152	-	0,361	-	-	exo-isocitral
12,18	154	-	0,540	0,825	-	iso-mentona
12,64	154	-	-	0,881	-	borneol
13,12	154	-	-	0,685	0,949	terpinen-4-ol
13,37	152	-	1,816	-	-	(E)-isocitral
15,25	154	-	1,113	-	-	nerol
15,87	152	-	31,431	-	-	neral
16,41	154	79,652	9,28	-	-	geraniol
17,15	152	-	39,129	-	-	geranial
15,87	164	-	-	1,153	-	metil éster carvacrol
18,03	150	-	-	60,594	-	timol
18,33	150	-	-	3,801	-	carvacrol
20,75	164	-	-	-	70,452	eugenol
21,29	204	-	-	-	1,087	α -copaeno
21,71	196	12,803	-	-	-	acetato de geranila
23,02	204	2,450	-	1,488	2,288	(E)-cariofileno
25,51	204	-	-	-	5,742	γ -muroleno
25,68	204	-	-	-	0,489	γ -himachaleno
27,19	204	-	-	-	0,485	δ -cadineno

T_R = tempo de retenção na coluna em min.; MM = massa molecular do composto identificado; Compostos majoritários presentes nos óleos essenciais indicados em negrito.

O linalol e o (E)-cariofileno também foram os compostos majoritários presentes no óleo essencial de *C. martinii*. A presença de linalol também foi relatada por Rao et al. (2005) neste óleo, em concentração equivalente a 2,3 % do total. No óleo utilizado neste trabalho, o linalol representou cerca de 4,0 % da composição total. Quando avaliado isoladamente, este composto apresentou atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Typhimurium* (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

O óleo essencial de *C. citratus* utilizado neste trabalho apresentou como constituintes majoritários os compostos geranial (39,13 %) e neral (31,43 %). De acordo com Martins (2000), o principal componente do óleo essencial de *C. citratus* é o citral, que se constitui de uma mistura de isômeros, conhecida como citral A ou isômero E (geranial) e citral B ou isômero Z (neral).

O citral atua causando danos nas membranas celulares microbianas e, sua ação já foi comprovada por uma série de autores, contra fungos, leveduras e bactérias, como o *Aspergillus fumigates*, *C. albicans*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *S. aureus* (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). O citral apresentou ainda propriedade larvívica e repelente de insetos (MARTINS, 2000).

A concentração de mirceno presente no óleo de *C. citratus* (12,6 %) foi cerca de três vezes superior à concentração deste composto relatada em um estudo similar (3,9 %) (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). Porém, como citado anteriormente, a composição química do óleo pode ser bastante variável em função das condições ambientais, da diversidade genética, do cultivo da planta, entre outros fatores. Como exemplo, podemos citar que, em função da maior ou menor concentração de mirceno no

óleo essencial de *C. citratus*, distinguem-se dois tipos comerciais do mesmo, o “East Indian” e o “Weast Indian” (MARTINS, 2000).

Além disso, na descrição dos constituintes do óleo essencial de *C. citratus* originário da Etiópia foi mencionado como principal constituinte do óleo, o geraniol e não o citral, correspondendo a 40 % da composição total do óleo (MARTINS, 2000). No entanto, no óleo utilizado neste trabalho, o geraniol, apesar de ser um dos compostos majoritários (9,28 %), não foi o constituinte predominante.

O timol, o carvacrol, o γ -terpineno e o p -cimeno foram os quatro compostos presentes em maior concentração no óleo essencial de *T. vulgaris* (Tabela 3). A composição deste óleo foi semelhante à composição relatada na literatura por outros autores (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

O timol, composto majoritário (~ 60 %) do óleo essencial do *T. vulgaris*, exibiu atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas e foi constatado também que, este composto, assim como seu isômero carvacrol, interage com a membrana celular microbiana, causando danos estruturais e funcionais (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). A importância da presença do grupo hidroxila nestes compostos já foi confirmada e parece ser fundamental para sua atividade microbiana (BURT, 2004).

O monoterpeno p -cimeno não é um eficiente antimicrobiano quando avaliado separadamente *in vitro*, porém acredita-se que ele potencia o efeito de outros compostos que possuem ação antimicrobiana como o carvacrol (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010). O γ -terpineno, assim como o p -cimeno, não é efetivo como antimicrobiano. Em ensaios *in vitro* onde foi avaliado separadamente, este composto não foi efetivo contra *E. coli* e *S. aureus*, o que foi

evidenciado pelos elevados valores de MIC verificados (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Entre os constituintes químicos do óleo essencial de *O. gratissimum*, extraído para ser testado neste trabalho, foi observada alta concentração de eugenol (70,45 %). Elevada concentração deste composto também foi detectada por Borges et al. (2012) em óleo essencial extraído desta planta (87,38 %).

O eugenol quando testado individualmente exibiu atividade contra muitos micro-organismos de interesse em alimentos, como *Aspergillus niger*, *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, entre outros. Dentre os mecanismos de ação do eugenol em células microbianas foi observada a inibição de enzimas como a ATPase e o extravasamento de ATP e íons de potássio, causado por alterações na permeabilidade da membrana (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Oliveira (2011) determinou a composição do óleo essencial de *O. gratissimum*, sendo que os compostos majoritários detectados foram o eugenol (61,28 %) e o timol (8,07 %). Além destes compostos, o γ -terpineno e o p -cimeno estavam presentes nas concentrações de 8,88 % e 5,23 %, respectivamente. De acordo com Hyldgaard et al. (2012), os compostos γ -terpineno e o p -cimeno também estiveram entre os majoritários no óleo essencial de *O. gratissimum*, em concentrações 25,7 % e 7,3 %.

Apesar do eugenol ter sido o composto majoritário identificado no óleo essencial de *O. gratissimum* usado neste trabalho, os demais compostos majoritários detectados por outros autores e mencionados anteriormente (timol, γ -terpineno e p -cimeno) não estavam presentes no mesmo em concentrações significativas ou detectáveis. Outros compostos

presentes em maiores quantidades foram o (Z) ocimeno, o γ -muroleno e o (E) cariofileno, em concentrações apresentadas na Tabela 3.

5.2. Atividade anti-*S. Enteritidis* dos óleos essenciais

5.2.1. Teste de Difusão em disco

Inicialmente, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais estudados foi confirmada por teste de difusão em disco. Os tamanhos dos halos de inibição formados, expressos em mm (incluindo o diâmetro do papel de filtro), nas placas dos diferentes meios de cultura utilizados durante o teste de difusão em disco são exibidos na Tabela 4.

Pode-se perceber por meio deste teste qualitativo que, entre os quatro óleos avaliados, o óleo essencial de *T. vulgaris* foi o mais ativo contra a cepa de *S. Enteritidis*, e o óleo essencial de *C. martinii* foi o segundo mais ativo. Os demais óleos avaliados, de *O. gratissimum* e *C. citratus*, também exibiram atividade antimicrobiana, porém menores halos de inibição foram verificados.

Tabela 4- Diâmetros dos halos de inibição formados no teste de difusão em disco.

Espécie medicinal	Diâmetro dos halos de inibição (mm)	
	Meio geral (PCA)	Meio seletivo (XLD)
<i>T. vulgaris</i> (tomilho)	37,0 $\pm$ 1,4	42,5 $\pm$ 0,7
<i>C. martinii</i> (palmarosa)	23,0 $\pm$ 1,4	25,0 $\pm$ 1,4
<i>C. citratus</i> (capim-limão)	15,5 $\pm$ 3,5	14,0 $\pm$ 2,8
<i>O. gratissimum</i> (alfavacão)	11,0 $\pm$ 0,0	11,5 $\pm$ 2,1

Os halos de inibição do crescimento de *S. Enteritidis* formados em placa contendo ágar PCA podem ser visualizados na Figura 5.

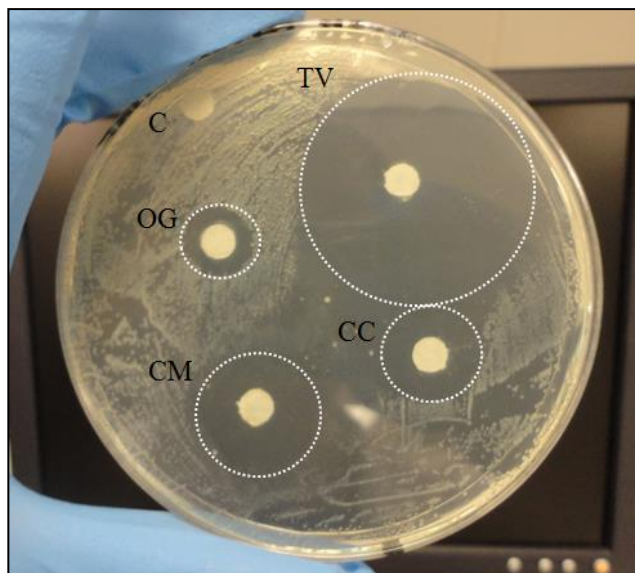


Figura 5- Halos de inibição formados devido a ação dos óleos essenciais em meio PCA previamente inoculado com *S. Enteritidis*. (TV= óleo essencial de *T. vulgaris*; OG= óleo essencial de *O. gratissimum*; CC= óleo essencial de *C. citratus*; CM= óleo essencial de *C. martinii*; C= controle negativo).

Em placas contendo ágar XLD (meio seletivo), os halos de inibição formados foram ligeiramente maiores (exceto *C. citratus*) que os halos formados em meio PCA. Um micro-organismo submetido a condições de estresse, como a presença de substâncias antimicrobianas, é recuperado mais facilmente em meio geral que em meio seletivo. Células de *Salmonella* injuriadas, como resultado da exposição ao estresse, tem a permeabilidade da membrana citoplasmática aumentada, tornando-se mais susceptíveis aos agentes seletivos presentes no meio XLD, que têm a função de suprimir o crescimento de outros micro-organismos competidores (WESCHE; RYSER, 2013).

5.2.2. Teste de Microdiluição em caldo

Em seguida, a atividade anti-*S. Enteritidis* dos óleos essenciais foi avaliada por meio do teste de Microdiluição em caldo. Os valores de MIC obtidos estão apresentados na

Tabela 5. Pode-se notar por meio do teste quantitativo que, de fato, o óleo essencial de *T. vulgaris* foi o mais ativo, sendo que a MIC deste óleo, necessária para inibir o crescimento de *S. Enteritidis* foi menor que as concentrações empregadas dos demais óleos essenciais estudados. O segundo óleo mais ativo contra a bactéria foi o óleo essencial de *C. martinii*, também em conformidade com o teste de difusão em disco.

Tabela 5- Concentração Mínima Inibitória – MIC dos óleos essenciais contra *S. Enteritidis*.

Espécie medicinal	MIC (µL/L)
<i>T. vulgaris</i> (tomilho)	625
<i>C. martinii</i> (palmarosa)	1250
<i>C. citratus</i> (capim-limão)	2500
<i>O. gratissimum</i> (alfavacão)	10000

O óleo essencial de *T. vulgaris* é reconhecido por sua atividade antimicrobiana contra uma grande variedade de micro-organismos. Em estudo de Burt e Reinders (2003), a atividade antimicrobiana de cinco óleos essenciais oriundos de diferentes espécies aromáticas foi avaliada contra *E. coli* O157:H7. Entre todos os óleos avaliados o mais ativo contra este patógeno foi o óleo essencial de *T. vulgaris*.

Em um estudo realizado por Rota et al. (2008), a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais extraídos de três diferentes espécies de *Thymus* foi avaliada contra 10 espécies de micro-organismos patogênicos. Dentre as espécies, a *T. vulgaris* foi a mais ativa. Porém, o valor de MIC do óleo essencial de *T. vulgaris* contra *S. Enteritidis* reportado no estudo foi menor que o determinado neste trabalho. Isto pode ser devido a diferenças na resistência das cepas utilizadas em ambos os ensaios, bem como diferentes proporções de compostos antimicrobianos presentes nos diferentes óleos avaliados.

Dentre as espécies de *Cymbopogon* estudadas, o óleo essencial de *C. martinii* foi o que apresentou maior atividade antimicrobiana. A maior atividade do óleo essencial de *C. martinii* contra *S. Enteritidis* pode ser devida a elevada concentração de geraniol encontrada no óleo essencial desta espécie (79,65 %) em comparação a concentração do mesmo composto encontrada no óleo essencial de *C. citratus* utilizado neste trabalho (9,28 %).

Finalmente, o óleo essencial de *O. gratissimum* foi o menos ativo contra *S. Enteritidis* (Tabela 6). A MIC foi verificada a uma alta concentração deste óleo e, provavelmente, sua aplicação em uma matriz alimentar seria inviável por alterar demasiadamente as características sensoriais do produto, o que também ocorreria no caso da aplicação dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. martinii*.

É importante salientar neste ponto, que os testes utilizados para a triagem da atividade antimicrobiana são rápidos e práticos para verificar a atividade de um grande número de compostos antimicrobianos potenciais, além de óleos essenciais. Porém, estes testes não levam em consideração os efeitos da matriz alimentar. Matrizes alimentares atuam como barreiras para proteger as células bacterianas de substâncias inibidoras. Além disso, a variedade de nutrientes disponível nos alimentos em comparação a meios de cultura permite a recuperação de células bacterianas danificadas. Portanto, a concentração de óleos essenciais necessária a ser incorporada em um alimento para inibir o crescimento microbiano é, geralmente, muito maior que a MIC determinada *in vitro*, como já foi relatado por diversos autores (BURT, 2004; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010).

Por exemplo, Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn (2010) relataram que foi necessária uma concentração de óleo essencial de coentro equivalente a 17 vezes a sua MIC determinada *in vitro*, para inibir o crescimento de *C. jejuni* em carne de frango. Em outros

alimentos essa concentração pode chegar até 100 vezes a MIC verificada em ensaios *in vitro* (BURT, 2004).

Devido a maior atividade antimicrobiana do óleo essencial de *T. vulgaris*, este foi selecionado para os ensaios posteriores em carne de peru processada. A menor MIC observada para este óleo essencial indicou que seu emprego seria o que menos alteraria a qualidade sensorial do produto cárneo. Além disso, esta espécie já é empregada como aromatizante, ou como erva fina, em produtos cárneos, mostrando que a combinação “carne e tomilho” já é aceita pelos consumidores.

5.3. Análise sensorial dos produtos tratados com óleo essencial de *T. vulgaris*

5.3.1. Análise sensorial preliminar

Os 10 julgadores que foram submetidos aos testes sensoriais triangular e de ordenação afirmaram que o sabor e o aroma das amostras de produto cárneo de peito de peru que continham o óleo essencial eram agradáveis. Alguns julgadores não reconheceram o sabor de tomilho inicialmente, por não terem hábito de consumir esta planta aromática. Por outro lado, alguns julgadores reconheceram o sabor e afirmaram consumir, frequentemente, produtos cárneos contendo tomilho, ou aromatizados com tomilho.

Os julgadores não foram capazes de diferenciar as amostras nos testes triangular e de ordenação. Nenhum deles foi capaz de ordenar todas as amostras em ordem crescente de concentração de óleo essencial de *T. vulgaris* aplicada, e tampouco de diferenciar uma amostra diferente entre três amostras avaliadas durante o teste triangular. Portanto, pequenos incrementos na concentração de óleo essencial de *T. vulgaris* aplicada nos

produtos cárneos não causaram alterações perceptíveis nas características sensoriais das amostras.

A partir dos resultados desta análise sensorial preliminar, concluiu-se que a aplicação do óleo essencial de *T. vulgaris* em produtos cárneos a base de peito de peru poderia ser bem sucedida, por não ter causado nenhuma sensação desagradável aos julgadores. Decidiu-se então conduzir uma análise sensorial com número maior de julgadores, ou seja, um número representativo de consumidores. Conduzir uma análise sensorial com um número grande de julgadores para avaliar a aceitação da combinação “óleo essencial + produto cárneo de peito de peru”, antes que fosse realizada uma análise sensorial preliminar como a descrita, poderia representar uma perda desnecessária da substância antimicrobiana avaliada, em caso de má aceitação por parte dos julgadores.

5.3.2. Análise sensorial

Esta análise sensorial contou com um número de 74 julgadores, com as características exibidas na Tabela 6.

Em relação ao sexo, o número de julgadores selecionados para a análise sensorial foi homogêneo. Já em relação à idade, houve a participação de pessoas de diferentes idades, sendo a idade mais frequente entre 20 e 24 anos. Apenas um dos julgadores afirmou não consumir o produto, sendo sua frequência de consumo representada pelo grupo “nunca”. A maioria das pessoas selecionadas para a análise sensorial afirmou consumir o produto frequentemente, o que é representativo, já que estes já estavam habituados ao produto e, conseqüentemente notariam se a presença do óleo essencial contribuiria de forma positiva ou negativa sensorialmente.

Tabela 6- Características dos julgadores participantes da análise sensorial.

		Número	Porcentagem
Sexo	Masculino	39	52,7
	Feminino	35	47,3
Idade	15-19	15	20,27
	20-24	38	51,35
	25-29	7	9,46
	30-40	9	12,16
	>40	5	6,76
Frequência de consumo	Nunca	1	1,35
	De vez em quando	20	27,03
	Frequentemente	44	59,46
	Sempre	9	12,16

Os escores médios atribuídos pelos julgadores na análise sensorial de produtos cárneos de peito de peru tratados com óleo essencial de *T. vulgaris* são apresentados na Tabela 7. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre a aceitação das três amostras de um mesmo produto (A ou B). O fato de não haver diferenças significativas entre a aceitabilidade dos consumidores pelas amostras sem óleo essencial e as amostras com óleo essencial demonstra a viabilidade da aplicação deste nos produtos cárneos de peito de peru, do ponto de vista sensorial.

Tabela 7- Escores médios atribuídos pelos julgadores às amostras durante o teste de aceitação de produtos cárneos de peito de peru tratados com óleo essencial de *T. vulgaris*.

Produto	Amostras		
	Controle	5MIC	50MIC
A	$5,34 \pm 1,66^{aA}$	$5,57 \pm 1,71^{aA}$	$5,11 \pm 1,76^{aA}$
B	$5,44 \pm 2,01^{aA}$	$5,68 \pm 1,80^{aA}$	$5,23 \pm 1,90^{aA}$

± Representa o desvio padrão da média.

Letras minúsculas (a) em uma mesma linha e letras maiúsculas (A) em uma mesma coluna representam os grupos homogêneos de acordo com o teste Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

5MIC e 50MIC = amostras dos tratamentos equivalentes a 5 e 50 vezes a MIC de óleo essencial de *T. vulgaris* determinada *in vitro* contra *S. Enteritidis*.

Apesar de não diferir significativamente dos outros tratamentos, a amostra tratada com emulsão contendo 5MIC apresentou maior índice médio de aceitação, para as duas formulações avaliadas, o que mostra que a combinação “produto cárneo de peito de peru + tomilho” foi bem aceita pelos consumidores. Em relação às amostras tratadas, verificou-se que o aumento da concentração de óleo essencial aplicada ocasionou a redução dos escores médios atribuídos pelos consumidores (Tabela 7) e, provavelmente, concentrações maiores que 50MIC aplicadas aos revestimentos levariam à rejeição dos produtos cárneos tratados, pelo forte sabor e odor conferidos aos produtos por esta substância.

De acordo com a Tabela 7, também não foram detectadas diferenças significativas entre os escores de aceitação atribuídos para amostras de mesmo tratamento, porém de formulações diferentes ($p > 0,05$), ou seja, diferenças na composição dos produtos A e B não interferiram na aceitabilidade das amostras. Todavia, verificou-se que os escores médios atribuídos às amostras do produto B foram um pouco maiores que os observados para as amostras do produto A. O produto B é aromatizado e contém especiarias. A combinação dos componentes aromatizantes presentes neste produto com o óleo essencial de *T. vulgaris* parece ser satisfatória, sensorialmente.

Na Figura 6 são apresentados os histogramas de frequência relativa (%) de notas atribuídas durante a análise sensorial das amostras dos produtos A e B. Para as amostras dos produtos A e B revestidas com emulsão contendo 5MIC os escores mais frequentes atribuídos pelos julgadores situaram-se na faixa entre 6,0 e 6,9 (na escala hedônica: gostei ligeiramente a gostei moderadamente).

Em relação às amostras tratadas com 50MIC de óleo essencial de *T. vulgaris*, nota-se que para o produto A, as notas mais frequentes variaram entre 5,0 a 5,9 enquanto para o produto B, as notas mais frequentes para esta amostra variaram entre 5,0 e 6,9 (Figura 6).

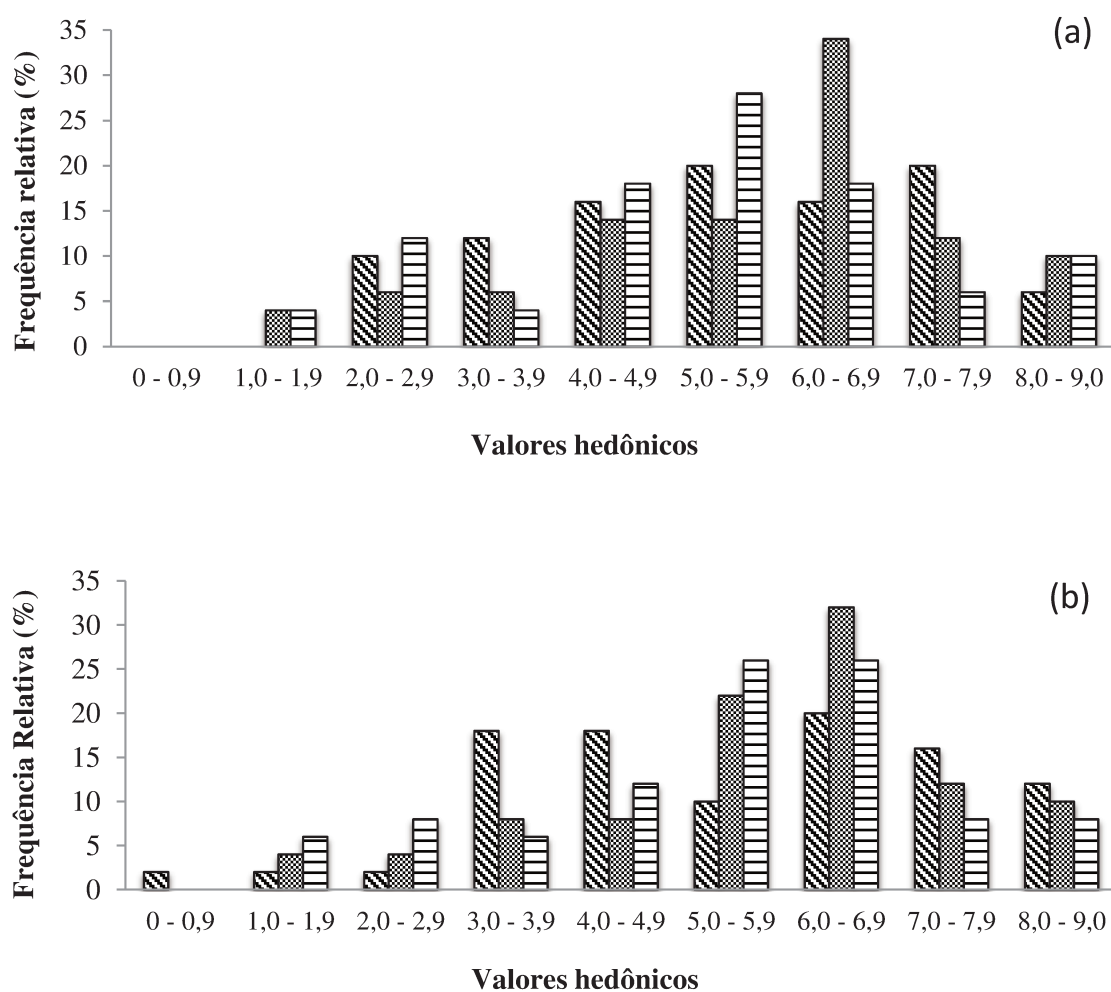


Figura 6- Histograma de frequência relativa (%) de valores hedônicos atribuídos no teste de aceitação de amostras dos produtos cárneos de diferentes tratamentos de óleo essencial de *T. vulgaris*. (▨) amostra controle (▩) 5MIC (≡) 50MIC.

Outro aspecto interessante é que alguns julgadores rejeitaram as amostras com nenhum tratamento de óleo essencial, ou seja, as amostras controle de ambas as formulações avaliadas, ainda que estes tenham alegado consumir produtos à base de peito de peru. Nestes casos, os escores atribuídos variaram entre 0 e 4,9 (Figura 6). Na escala hedônica estes valores estão na faixa entre “desgostei extremamente” e “indiferente”.

Na Figura 7 são apresentados os histogramas de frequência relativa (%) de notas atribuídas pelos julgadores durante a análise sensorial das amostras de um mesmo tratamento, porém de formulações diferentes. Verifica-se que em relação às amostras controle (Figura 7a), a frequência de atribuição de notas entre 4,0 - 4,9; 5,0 - 5,9; 6,0 - 6,9 e 7 - 7,9 variou entre 15 e 20 %, para ambos os produtos avaliados, o que mostra a variabilidade do índice de aceitação destas amostras pelos diferentes consumidores considerados.

A frequência relativa de notas dadas pelos julgadores às amostras tratadas com 5MIC de óleo essencial de *T. vulgaris* nos diferentes blocos (intervalos de valores hedônicos) foi praticamente igual para as duas formulações A e B, como pode ser verificado na Figura 7b. Pode-se observar também que a maior diferença entre a frequência relativa de atribuição de notas às amostras tratadas com 50MIC de óleo essencial de *T. vulgaris* de ambos os produtos considerados se encontra no bloco correspondente a 6,0- 6,9 dos valores hedônicos (Figura 7c).

No geral, os escores médios atribuídos durante a avaliação sensorial foram baixos e isto pode estar relacionado ao fato de que 36 % dos julgadores afirmaram “não ter fome” no momento da análise sensorial. Porém, como as notas atribuídas para as diferentes amostras tratadas com óleo essencial de *T. vulgaris* não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) das notas verificadas para as amostras controle, conclui-se que a aceitabilidade das mesmas foi semelhante.

Portanto, definiu-se que a concentração correspondente a 50MIC seria aplicada nos revestimentos para os produtos cárneos. A concentração definida representa, de acordo com

as peças de produtos cárneos de peito de peru obtidos para este trabalho e o volume de emulsão aplicado, um total de 0,08 % (v/m) dos produtos.

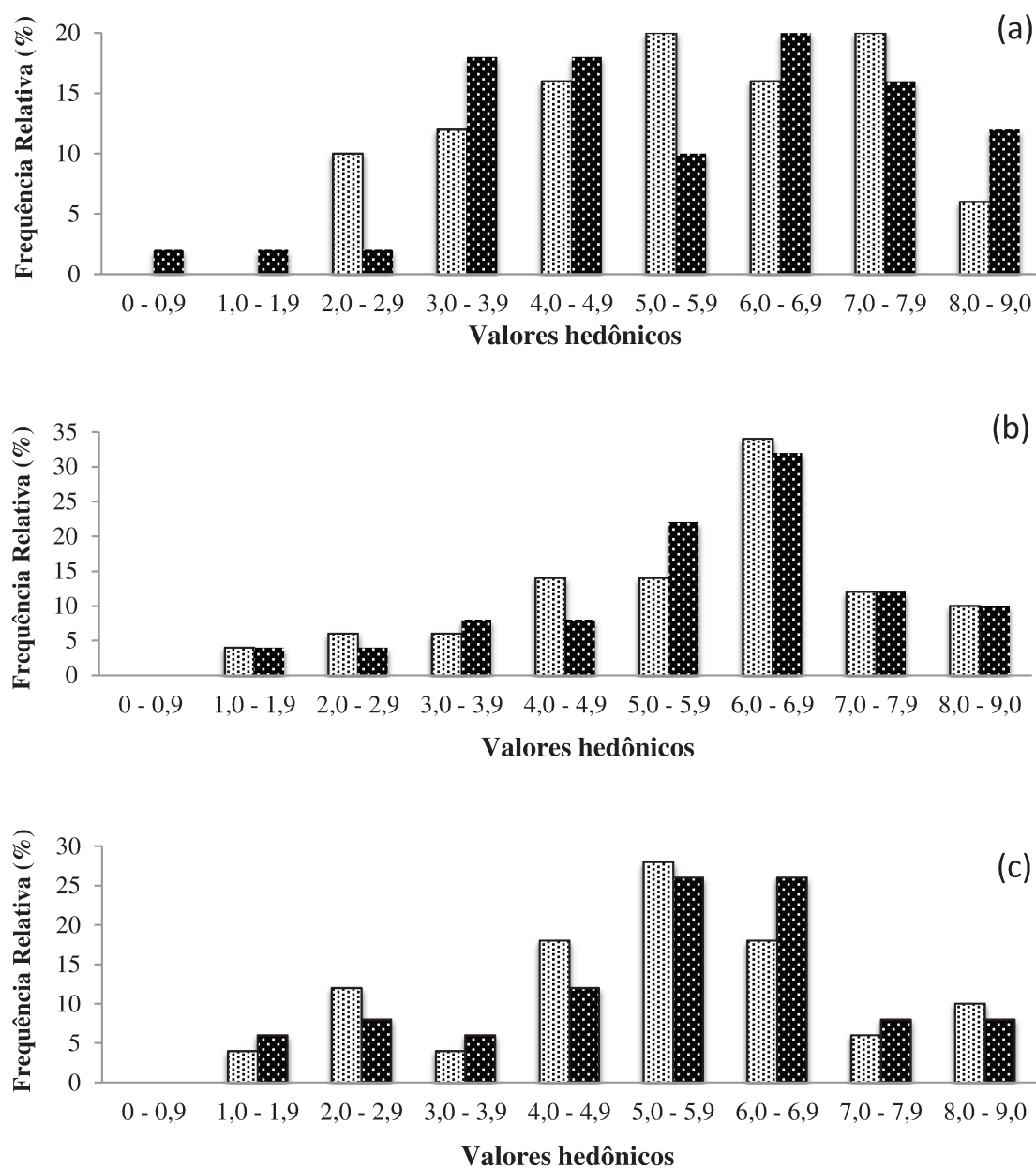


Figura 7- Histograma de frequência relativa (%) de valores hedônicos atribuídos no teste de aceitação das amostras de diferentes tratamentos de óleo essencial de *T. vulgaris*. (a) amostra controle; (b) amostra tratada com 5MIC; (c) amostra tratada com 50MIC; (▨) produto A; (■) produto B.

5.4. Testes dos revestimentos contendo óleo essencial de *T. vulgaris* em produtos cárneos fatiados

As fatias revestidas ou não revestidas com solução de amido a diferentes concentrações (2,5; 5,0; 7,5 %), contendo óleo essencial de *T. vulgaris* (0,08 %), após 10 dias de armazenamento estão ilustradas na Figura 8.

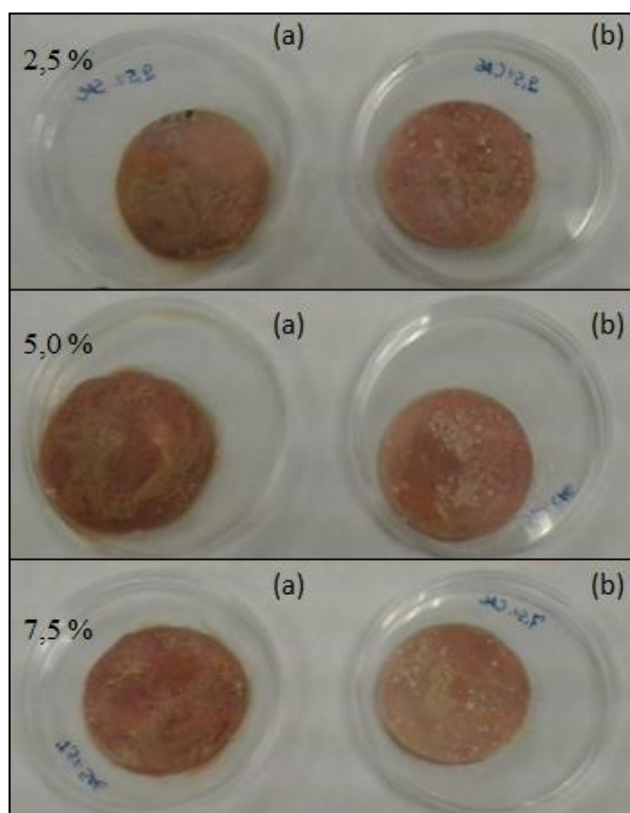


Figura 8- Fatias revestidas com soluções contendo diferentes concentrações de amido de milho (2,5; 5,0; 7,5 %), após 10 dias de armazenamento a 25 °C. (a) revestimento sem óleo essencial de *T. vulgaris*; (b) revestimento com óleo essencial de *T. vulgaris* (0,08 % v/m).

Os resultados deste teste mostraram que os revestimentos de amido de milho quando aplicados aos produtos cárneos causavam uma impressão visual desagradável, pois

independente da concentração de amido experimentada, eles conferiam às fatias um aspecto limoso.

Além disso, os revestimentos de amido de milho incorporados com o óleo essencial de *T. vulgaris* não contribuíam para a melhoria da aparência das fatias ao longo da vida útil, pois a presença do amido pareceu favorecer o crescimento de micro-organismos deterioradores. O fato de que não foi feita a secagem das peças após a aplicação do revestimento de amido de milho também pode ter favorecido o crescimento de micro-organismos deterioradores, devido à umidade remanescente nos produtos cárneos fatiados.

Resultados satisfatórios foram obtidos por outros autores, ao aplicarem revestimentos de amido incorporados com óleo essencial de *T. vulgaris* para a preservação da qualidade de peito de frango, durante vida útil (GOSWAMI; HAN; HOLLEY, 2009).

Por outro lado, a emulsão contendo óleo essencial de *T. vulgaris* não alterou negativamente o aspecto das fatias dos produtos cárneos e, 2 horas após o revestimento as peças já se encontravam visualmente secas.

Descartou-se então o uso do revestimento à base de amido de milho e optou-se pelo uso da emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* para revestir os produtos cárneos processados a base de peito de peru. É válido ressaltar que o uso destes revestimentos não dispensa a embalagem primária do produto, eles são um complemento para conferir uma característica de interesse.

5.5. Contaminação cruzada dos produtos cárneos

5.5.1. Capacidade de sobrevivência de *S. Enteritidis* em superfícies de aço inoxidável

As reduções nas contagens de *S. Enteritidis* nos substratos avaliados nos ensaios de “swab”, nos diferentes tempos de amostragem, bem como os resultados das análises estatísticas dos dados estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8- Sumário dos dados de sobrevivência (log UFC/cm²) de *S. Enteritidis* obtidos nas superfícies de aço inoxidável contendo diferentes substratos, nos diferentes tempos de amostragem.

Parâmetro	Substrato			
	Produto A	Produto B	Caldo BHI	Solução salina
Si	5,89 ± 0,08 ^a	5,93 ± 0,07 ^a	6,05 ± 0,04 ^{ab}	6,12 ± 0,05 ^b
Sf	1,74 ± 0,37 ^a	1,82 ± 0,45 ^a	0,74 ± 0,00 ^b	0,96 ± 0,00 ^b
ΔS0,17h	0,64 ± 0,47 ^a	0,61 ± 0,16 ^a	0,15 ± 0,02 ^a	0,36 ± 0,39 ^a
ΔS0,50h	1,42 ± 0,23 ^a	2,22 ± 0,38 ^b	0,69 ± 0,13 ^c	2,01 ± 0,15 ^{ab}
ΔS1h	2,72 ± 0,18 ^a	2,57 ± 0,31 ^a	1,97 ± 0,65 ^a	4,52 ± 0,11 ^b
ΔS2h	3,36 ± 0,22 ^a	2,98 ± 0,07 ^a	4,67 ± 0,68 ^b	5,16 ± 0,05 ^b
ΔS6h	4,10 ± 0,38 ^a	4,06 ± 0,42 ^a	5,32 ± 0,04 ^b	-
R ²	0,94	0,94	0,97	0,94
MSE	0,26	0,22	0,20	0,33

± Representa o desvio padrão da média.

As letras (a, b, c) em uma mesma linha representam os diferentes grupos homogêneos reportados pelo teste Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

Si e Sf correspondem às concentrações (log UFC/cm²) detectadas no tempo inicial e final de amostragem, respectivamente; ΔS0,17h, ΔS0,5h, ΔS1h, ΔS2h, ΔS6h são as reduções logarítmicas nos diferentes tempos de amostragem (0,17h; 0,5h; 1h; 2h; 6h).

R² e MSE são os parâmetros estatísticos de ajuste do modelo Weibull aos dados experimentais.

Por meio dos resultados de análises de superfícies de aço inoxidável (Tabela 8), *S. Enteritidis* pôde ser detectada durante várias horas nas superfícies de aço inoxidável, o que demonstra que em ambientes de processamento de carnes e alimentos em geral este micro-organismo pode permanecer viável por muito tempo e ser transferido a alimentos não contaminados, representando um risco à segurança do consumidor.

Quando o substrato utilizado foi o caldo de carne, preparado a partir dos produtos A e B, *S. Enteritidis* pôde ser detectada nas superfícies durante as primeiras 6 horas de amostragem, apresentando níveis finais de $1,74 \pm 0,37$ e $1,82 \pm 0,45$ log UFC/cm², respectivamente. Isso significa que nas seis primeiras horas houve uma redução de aproximadamente 4,08 log UFC/cm² nos níveis do micro-organismo contido nos substratos de ambas as formulações, em relação aos níveis detectados no tempo inicial.

De acordo com a ANOVA, não houve diferenças significativas nas reduções da bactéria nos diferentes substratos de caldo de carne (produtos A e B), durante todo o período de amostragem, com exceção do tempo 0,5 h. Estes resultados sugerem que a formulação dos produtos utilizados para a obtenção do caldo de carne não foi um fator determinante para a capacidade de sobrevivência do patógeno em superfícies de aço inoxidável.

Na Figura 9 estão representados graficamente os dados de sobrevivência de *S. Enteritidis* nas superfícies de aço inoxidável em log UFC/cm² versus tempo (h), além do ajuste do modelo Weibull aos dados experimentais. Os parâmetros estatísticos de ajuste do modelo aos dados experimentais, R^2 e MSE estão apresentados na Tabela 8.

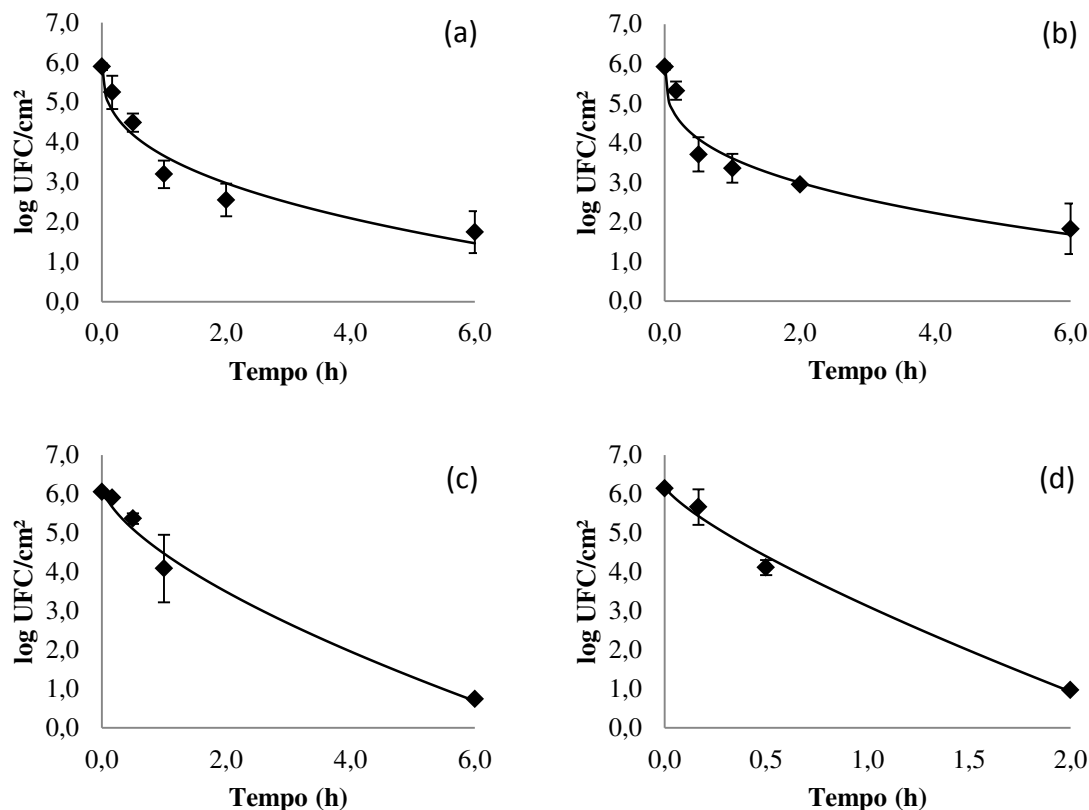


Figura 9- Representação gráfica da redução dos níveis de *S. Enteritidis* nas superfícies de aço inoxidável inoculadas com os diferentes substratos, após ajuste do modelo Weibull aos dados de sobrevivência. (a) caldo de carne, produto A; (b) caldo de carne, produto B; (c) caldo artificial BHI; (d) solução salina; (♦) dados experimentais; (—) modelo Weibull ajustado aos dados.

O modelo Weibull tem sido aplicado para representar o processo logarítmico de inibição microbiana. De acordo com este modelo, a sobrevivência bacteriana pode ser vista como uma falha dos micro-organismos em resistir a condições de adversidade. Além disso, este modelo leva em consideração a existência de subpopulações dentro de uma população bacteriana, que apresentam diferentes níveis de sensibilidade a agentes letais, ou seja, diferentes resistências a condições de adversidade (PELEG, 2006).

Quando o caldo BHI foi utilizado como substrato, *S. Enteritidis* também foi detectada até o tempo 6 h de amostragem, em uma concentração final de $0,74 \pm 0,00$ log

UFC/cm². Análises estatísticas indicaram que a redução do patógeno neste substrato é significativamente diferente ($p \leq 0,05$) das reduções verificadas em caldo de carne e solução salina, em quase todos os tempos de amostragem. Isto demonstra que o caldo BHI não pode ser usado satisfatoriamente para reproduzir a sobrevivência desta cepa, em superfícies comumente utilizadas na indústria de produtos cárneos.

A solução salina foi o que proporcionou menor sobrevivência de *S. Enteritidis*, sendo que esta pôde ser detectada até as duas primeiras horas de amostragem. Deve-se considerar que os outros substratos apresentam maior concentração de nutrientes, que podem ser utilizados pelo patógeno para o seu metabolismo e aumentam sua capacidade de sobrevivência, atuando como protetores por reduzir a intensidade do processo de dissecação devido às condições do ambiente.

Uma visão geral dos resultados obtidos é apresentada no gráfico de concentração (log UFC/g) em função do tempo (h) (Figura 10), que representa apenas o modelo Weibull ajustado aos dados, onde se pode ver claramente a diferença de comportamento do patógeno nos diferentes substratos.

No geral, a capacidade de sobrevivência da cepa de *S. Enteritidis* foi baixa quando comparada a outros estudos (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2013; DE CÉSARE et al., 2003), em todos os substratos avaliados. No entanto, a maioria dos resultados obtidos por outros autores para a capacidade de sobrevivência de micro-organismos patogênicos em superfícies de aço inoxidável, não são comparáveis aos dados obtidos nos ensaios conduzidos neste trabalho, em virtude de que as condições experimentais e os métodos de amostragem utilizados são diferentes.

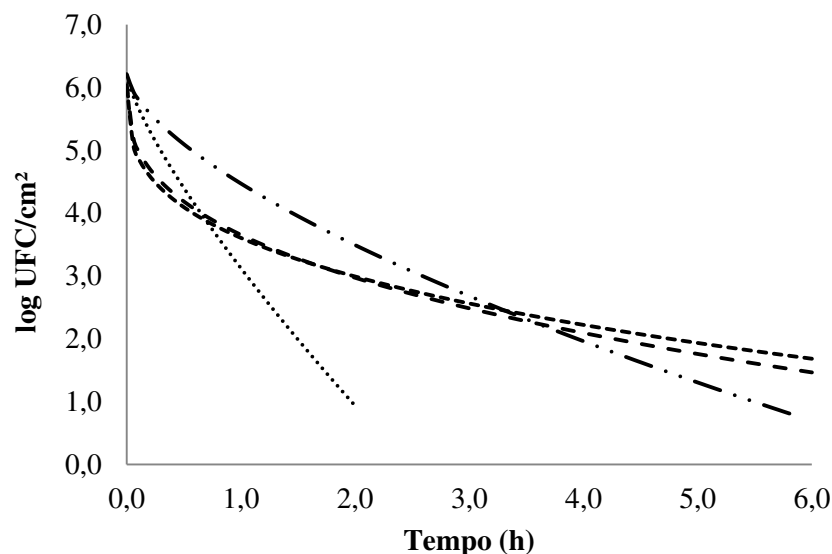


Figura 10- Visão geral dos dados de sobrevivência de *S. Enteritidis* em diferentes substratos inoculados em superfícies de aço inoxidável. (---) caldo de carne, produto A; (----) caldo de carne, produto B; (- · -) caldo artificial, BHI; (.....) solução salina.

A menor capacidade de sobrevivência de *S. Enteritidis* verificada neste trabalho pode estar relacionada à baixa umidade relativa no ambiente experimental (35-40 %) e também a uma temperatura ambiente elevada (entre 25 e 30 °C) que levam a secagem rápida das superfícies. O processo de secagem implica na redução do conteúdo de água que causa a morte ou injúrias nas células (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2013).

Além disso, é possível que a própria cepa de *S. Enteritidis* utilizada possa ser mais sensível ao estresse ambiental, em comparação a cepas de patógenos utilizadas em outros estudos (POSADA-IZQUIERDO et al., 2013; DE CÉSARE et al., 2003).

A filtração do caldo de carne previamente a inoculação também pode ter reduzido a capacidade de sobrevivência do micro-organismo nas superfícies de aço inoxidável. A filtração remove pequenas partículas orgânicas (insolúveis) do caldo de carne, que poderiam exercer um efeito protetor contra o estresse hídrico sofrido pelas células.

Os resultados apresentados neste tópico reforçam a importância da realização de procedimentos de limpeza e desinfecção para reduzir ou eliminar micro-organismos patogênicos em ambientes de processamento de alimentos. Estudos devem ser conduzidos neste sentido, para que seja possível analisar e reduzir os riscos associados à contaminação cruzada de alimentos.

5.5.2. Contaminação cruzada artificial dos produtos

Na Figura 11 estão expressos os resultados de transferência de *S. Enteritidis* (log UFC/cm²) em função do número da fatia analisada (n = 20), durante o fatiamento dos produtos A e B não revestidos com emulsão de óleo essencial. Estes dados são relevantes, pois refletem uma situação que poderia ocorrer rotineiramente em estabelecimentos onde é feito o fatiamento destes alimentos.

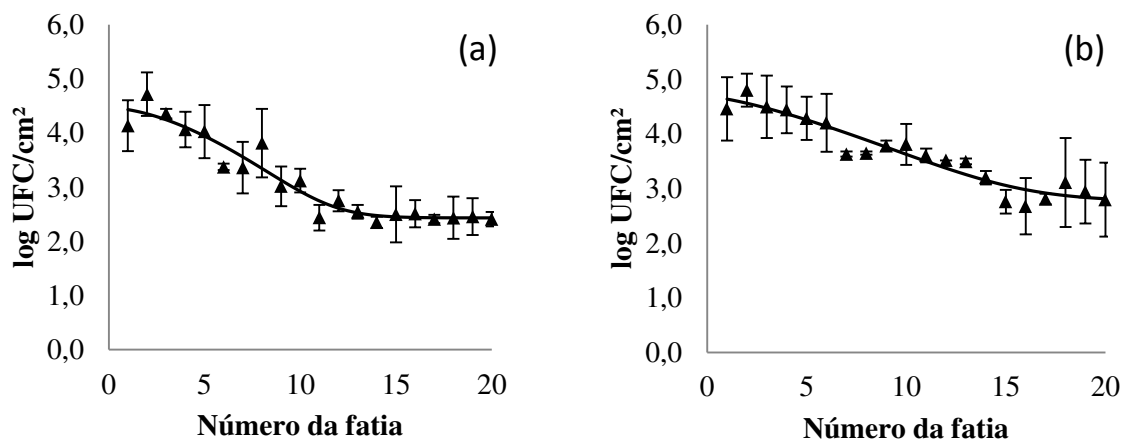


Figura 11- Transferência (log UFC/cm²) de *S. Enteritidis* de lâminas de corte inoculadas a produtos cárneos à base de peito de peru, não revestidos. (a) produto A; (b) produto B; (▲) dados experimentais; (—) ajuste do modelo Weibull aos dados.

Optou-se pelo ajuste do modelo Weibull também aos dados de transferência de *S. Enteritidis* por contaminação cruzada durante o fatiamento. Este modelo apresentou melhores índices estatísticos de ajuste (R^2 ajustado $\geq 0,9$ e $MSE \leq 0,1$) aos dados experimentais obtidos. Além disso, escolheu-se o modelo Weibull porque este é fundamentado em conceitos que permitem a modelagem dos processos que ocorrem durante a transferência de bactérias entre superfícies.

Para facilitar o entendimento, distribuições de Weibull são geralmente aplicadas a objetos com um grande número de ligações, cada uma das quais tem certa probabilidade de serem rompidas. Em muitos casos, quando apenas uma ligação se rompe, o objeto pode apresentar falhas (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2007; ALBERT; MAFART, 2005).

A população bacteriana inicial sobre uma superfície estabelece interações com o substrato através de contato. No caso de biofilmes bacterianos essas interações são reforçadas pela produção de exopolissacarídeos (EPS). Para que haja a transferência bacteriana entre a superfície de contato e um alimento, por exemplo, é necessário que estas interações do micro-organismo com o substrato deixem de existir, e as bactérias possam ser transferidas a partir de uma superfície para outra, ou seja, é necessário que as interações falhem (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2007).

Na Figura 11 observou-se que o número de células transferidas decresceu em cada fatia analisada sequencialmente para cada produto, ou seja, ao longo dos ensaios. A mesma tendência foi observada em outros estudos de transferência de patógenos de superfícies a produtos cárneos (SHEEN; HWANG, 2008; WANG et al., 2014a). Uma possível explicação para isto, é que ocorra simultaneamente à transferência, a redução logarítmica da concentração de micro-organismos presentes na superfície doadora, ou seja, nas

superfícies das lâminas de corte. Portanto, a tendência verificada pode ser o resultado de dois fenômenos, transferência e inativação microbiana na superfície.

A média dos valores de transferência do patógeno às cinco primeiras fatias do produto A não revestido foi de $4,26 \pm 0,29 \log \text{ UFC/cm}^2$, para o produto B não revestido este valor foi de $4,49 \pm 0,19 \log \text{ UFC/cm}^2$. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os níveis de *S. Enteritidis* transferidos das lâminas de corte às primeiras cinco fatias dos produtos A e B não revestidos, fatias que apresentaram maiores níveis de contaminação. O risco de ocorrer infecção no hospedeiro seria maior ao ingerir tais fatias, em comparação às fatias subsequentes. Este fato é ainda mais relevante no caso de patógenos como *S. Enteritidis*, que devem ser ingeridos em elevadas concentrações para que ocorra infecção no hospedeiro.

As taxas de transferência médias para a primeira e a última fatia do produto A não revestido foram 0,79 e 0,01, respectivamente, o que indica que de todo o inóculo presente na lâmina de corte, 0,79 % foi transferido à primeira fatia em média, e apenas 0,01 % foi transferido à última. Para o produto B, estes valores médios foram de 0,84 e 0,02, para a primeira e a última fatia, respectivamente.

É perceptível também que nas últimas fatias de um mesmo produto não houve diferenças significativas entre os níveis de *S. Enteritidis* transferidos ($p > 0,05$). Este efeito é mais facilmente visualizado nas fatias do produto A, em que os níveis oscilaram entre valores médios de 2,40 a 2,50 $\log \text{ UFC/cm}^2$, da fatia número 15 até a fatia número 20. Em virtude deste efeito, o modelo Weibull modificado com uma cauda se adequou melhor aos dados experimentais (Figura 11).

As características do produto cárneo podem influenciar no processo de transferência. Entre elas se enquadram a textura, umidade, concentração de gordura e

ingredientes presentes na formulação. Wang et al. (2015) estudaram a transferência de *Salmonella* spp. presentes em biofilmes formados em superfícies de aço inoxidável a cinco diferentes produtos cárneos. Os resultados sugeriram que as taxas de transferência do patógeno por contaminação cruzada foram significativamente dependentes do tipo de produto cárneo considerado.

No produto cárneo B foi verificada maior transferência de *S. Enteritidis* ($p \leq 0,05$) em relação ao produto A, em 8 das 20 fatias avaliadas. Isto não foi verificado em uma sequência definida de fatias (por exemplo, da fatia 2 a 9), mas sim aleatoriamente, o que leva a crer que esta diferença parece não estar relacionada à composição do produto, mas às condições experimentais.

Além da composição do produto, outros fatores podem influenciar na transferência de micro-organismos para um alimento durante o fatiamento. Vorst; Todd e Ryser (2006). avaliaram a transferência de *L. monocytogenes* durante o fatiamento de peito de peru, mortadela tipo "bologna" e salame. Além da composição dos produtos, a força aplicada durante o fatiamento também afetou significativamente a transferência do patógeno.

A força aplicada se encaixa em uma série de fatores que interferem na transferência de micro-organismos aos alimentos durante o fatiamento, chamados de parâmetros de operação. Outros parâmetros de operação são a velocidade da lâmina de corte (número de rotações por minuto), o diâmetro da lâmina de corte, a sua rugosidade e o material que a constitui, o ângulo de contato do produto com a lâmina, área e espessura da fatia. Por exemplo, para a obtenção de fatias mais finas é necessário que uma força maior seja aplicada durante o fatiamento, além de que o tempo de contato entre o produto e a lâmina de corte é maior, favorecendo a transferência (CHAITIEMWONG et al., 2014; SHEEN; HWANG, 2008).

As características do micro-organismo talvez sejam os principais fatores que influenciam na contaminação cruzada durante o fatiamento. A fase de crescimento na qual este se encontra na lâmina de corte contaminada, concentração em que está presente na superfície, tipo da cepa, a capacidade de adaptação a diferentes situações de estresse e a capacidade de adesão do micro-organismo à superfície são alguns fatores que interferem na transferência (SHEEN; HWANG, 2008). Por exemplo, Pérez-Rodríguez et al. (2007) após avaliarem a transferência de *S. aureus* e *E. coli* O157:H7 a presunto cozido durante o fatiamento, verificaram que o tipo de micro-organismo interferiu significativamente nas taxas de transferência verificadas.

No presente estudo, partiu-se de um nível elevado de contaminação das lâminas de corte ($\sim 8 \log$ UFC/lâmina). É possível presumir, com base no que é relatado na literatura, que menores níveis de contaminação inicial levariam a menor transferência do patógeno das lâminas às fatias (AARNISALO et al., 2007; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2007; SHEEN; HWANG, 2008).

As condições ambientais de temperatura e umidade são também fundamentais para o perfil de transferência de um micro-organismo de uma superfície a um produto. Tais condições podem influenciar na capacidade de sobrevivência dos micro-organismos na superfície de aço inoxidável, como citado anteriormente, levando ao estresse hídrico das células, causando injúrias, interferindo na adesão microbiana e, portanto, na transferência de micro-organismos a alimentos não contaminados (SHEEN; HWANG, 2008).

Se as condições de realização dos experimentos não são reproduzidas fielmente em cada repetição, maior variabilidade dos dados é verificada. Porém, ainda que todas as condições sejam controladas e reproduzidas fielmente, trata-se uma situação em que é difícil controlar todos os fatores que podem interferir na transferência. Isto é comprovado

pela alta variabilidade dos dados observada nestes ensaios (Figura 11), que foi também verificada em ensaios similares, realizados por outros autores (AARNISALO et al., 2007; CHAITIEMWONG et al., 2014; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2007; SHEEN; HWANG, 2008).

Provavelmente, nem todos os fatores mencionados interferem conjuntamente na transferência de um patógeno durante o fatiamento ou eventos de contaminação cruzada, e é difícil afirmar com certeza quais irão influenciar e em qual grau, dependendo de cada situação. Para ilustrar esta afirmação pode-se citar o estudo de Sheen e Hwang (2008), que não verificaram diferenças significativas dos níveis de *L. monocytogenes* transferidos a fatias de diferentes espessuras (1,0 a 3,0 mm) durante o procedimento de fatiamento, demonstrando que em seu estudo o fator espessura da fatia não foi determinante para a transferência.

Outro fator que pode interferir na recuperação das células de micro-organismos transferidos aos produtos cárneos durante o fatiamento é a presença de substâncias antimicrobianas, por representar um fator de estresse adicional. Devido à pressão e à força aplicadas sobre os produtos contra as lâminas durante o procedimento mecânico para obtenção das fatias, as células das bactérias podem sofrer injúrias (LIN et al., 2006). Nesta situação, o número de células viáveis que podem ser contadas em placas após a incubação, provavelmente seja menor que o número de células que é realmente transferido. Quando há a presença de substâncias como um óleo essencial, é como se um obstáculo a mais fosse imposto às células injuriadas, o que pode levá-las a morte.

Na Figura 12, além da representação gráfica de produtos não revestidos já apresentados anteriormente, estão representados graficamente os dados de transferência de

S. Enteritidis (log UFC/cm²) em função do número da fatia analisada (n = 20), durante o fatiamento dos produtos A e B, revestidos com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*.

Diferenças significativas entre os níveis da bactéria não foram detectadas ($p > 0,05$) em fatias dos produtos A, revestidos e não revestidos com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* (Figura 12). As médias dos dados de transferência às fatias do produto A não revestido foram maiores, porém a grande variabilidade dos dados impediu que diferenças significativas fossem detectadas. Diferenças significativas foram detectadas ($p \leq 0,05$) entre os dados de transferência de *S. Enteritidis* às fatias do produto B não revestido e revestido com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* (Figura 12).

A média dos níveis de bactéria detectados nas cinco primeiras fatias do produto A revestido foi de $3,58 \pm 0,09$ log UFC/cm². Este valor foi de $4,26 \pm 0,29$ log UFC/cm² nos ensaios com o produto A não revestido, ou seja, houve uma diferença de mais de 0,5 log UFC/cm² entre os tratamentos aplicados em uma mesma formulação.

Nas últimas fatias do produto A revestidos também ocorreu o efeito de cauda, discutido para os produtos não revestidos, com concentrações de *S. Enteritidis* nas últimas fatias variando em torno de $2,24 \pm 0,40$ UFC/cm².

As taxas de transferência médias de *S. Enteritidis* para a primeira e a última fatia do produto A revestido foram de 0,41 e 0,003, respectivamente, valores menores em relação aos observados para os produtos não revestidos, citados anteriormente (0,79 e 0,01, respectivamente). Para o produto B, as diferenças entre as taxas de transferência médias verificadas entre os tratamentos com revestimento e sem revestimento foram ainda maiores. Para os produtos revestidos, os valores foram 0,19 (primeira fatia) e 0,001 (última fatia), enquanto que para os produtos não revestidos esses valores foram de 0,84 e 0,02, respectivamente.

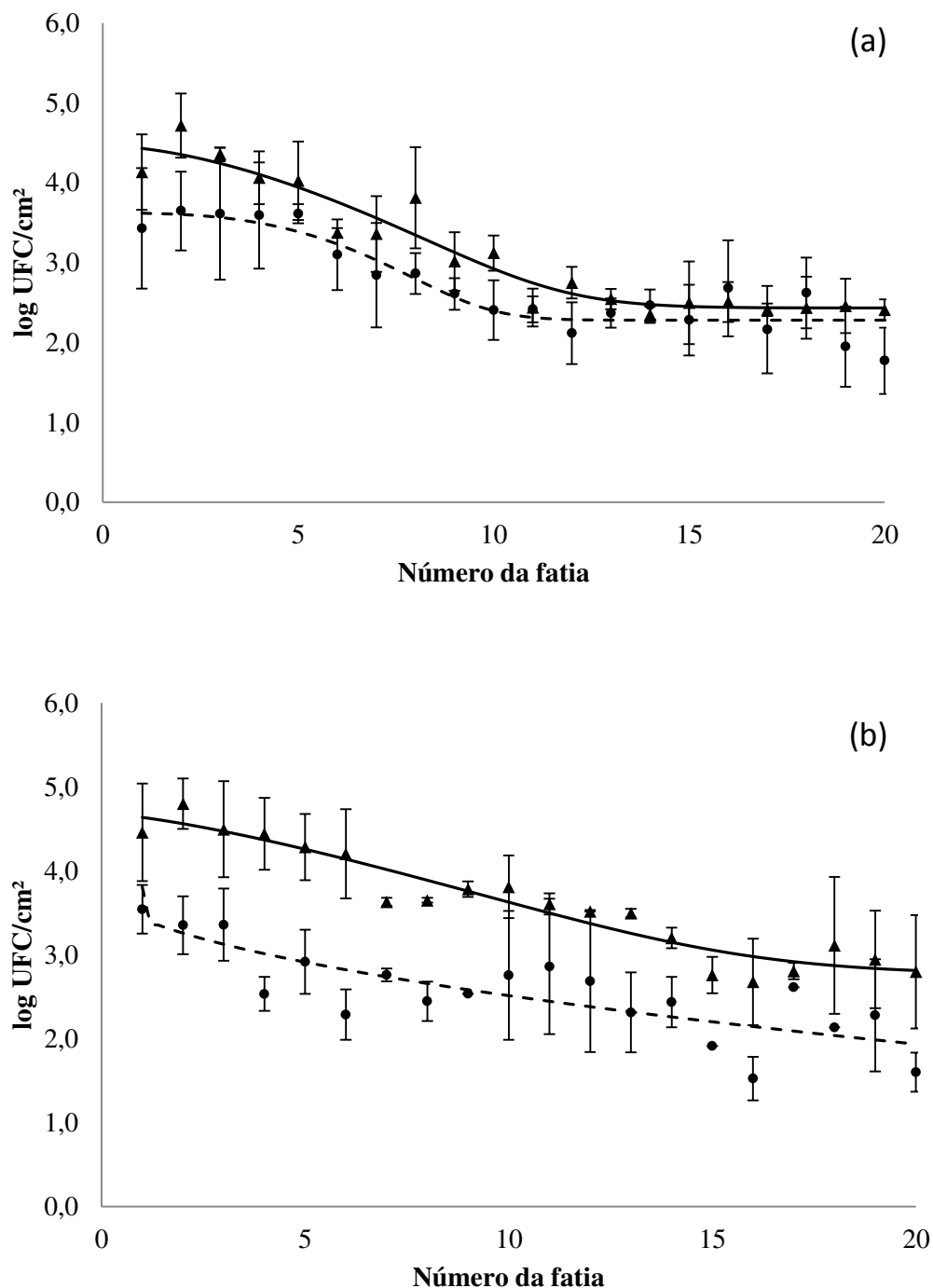


Figura 12- Transferência (log UFC/cm²) de *S. Enteritidis* de lâminas de corte inoculadas a produtos cárneos a base de peito de peru revestidos e não revestidos. (a) produto A; (b) produto B; (▲) dados experimentais de produtos não revestidos previamente com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*; (●) dados experimentais de produtos previamente revestidos (0,08 % v/m); (-----) ajuste do modelo Weibull aos dados de fatias com revestimento; (—) ajuste do modelo Weibull aos dados de fatias sem revestimento.

Os valores de concentração do patógeno nas fatias do produto B revestido e não revestido diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$) durante todo o ensaio. Ao contrário dos outros tratamentos, o modelo Weibull não apresentou bons índices de ajuste aos dados de transferência de *S. Enteritidis* ao produto B revestido previamente com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* ($R^2 = 0,69$ e $MSE = 0,10$). A transferência de células, neste caso, não seguiu uma tendência clara.

No caso do produto B revestido com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* pode-se inferir que, menores contagens microbianas foram devidas a presença do óleo essencial aliada à composição do produto, já que nos ensaios discutidos nos tópicos subsequentes será demonstrado que esta composição foi a que menos propiciou o crescimento de *S. Enteritidis*, em diferentes condições.

Os valores dos índices estatísticos de ajuste dos modelos ajustados para os dados de transferência, dos produtos A e B, revestidos e não revestidos com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* se encontram no Apêndice C (Tabela 17).

De modo geral, todas as fatias foram contaminadas durante o fatiamento, independente da formulação avaliada e presença de revestimento. O risco de ocorrência de doença ao ingerir fatias contaminadas seria aumentado se as condições de armazenamento das fatias, como temperatura, umidade e tempo possibilitassem o crescimento do patógeno, até mesmo nas fatias com menor nível de contaminação (geralmente as últimas fatias).

A aplicação de modelos de transferência, como o modelo Weibull ajustado aos dados obtidos no presente estudo pode contribuir para uma melhor quantificação da influência e do impacto que a transferência de patógenos causa no risco final associado ao consumo de determinado alimento. A compreensão do risco envolvido ajuda no

desenvolvimento de medidas higiênico-sanitárias de controle para reduzir a contaminação cruzada dos alimentos (CHAITIEMWONG et al., 2014).

Diante dos dados obtidos neste e em outros trabalhos, algumas informações merecem atenção. Baseado no guia “Food Code” do FDA, os equipamentos utilizados para a preparação de alimentos, ou seja, que entram em contato direto com o alimento devem ser limpos a cada 24 h se são manipulados a temperaturas menores que 5 °C, ou a cada 10 h se manipulados a temperaturas entre 10 °C e 12,8 °C (VORST; TODD; RYSER, 2006). Estes intervalos claramente permitem que a bactéria encontre condições para se aderir às superfícies, cresça e seja transferida subsequentemente a produtos não contaminados. Fatiadores de frios demandam atenção redobrada quanto à higienização, pois possuem inúmeros componentes, que são difíceis de limpar e onde a presença de sujidades e contaminação não é facilmente visualizada.

No Brasil, alguns estudos indicam falhas nas condições de higiene durante o processamento e distribuição de produtos cárneos fatiados. Fai et al. (2011), ao avaliarem a ocorrência de *Salmonella* spp. em presunto suíno cozido, comercializado fatiado em supermercados de Fortaleza (CE), constataram que 30 % do total de amostras analisadas (40 amostras de 8 diferentes marcas comerciais, obtidas em 26 estabelecimentos distintos) estavam contaminadas com *Salmonella* spp..

Pires et al. (2005) avaliaram a superfície de fatiadores de frios de estabelecimentos de Viçosa (MG) e concluíram, através de análises microbiológicas tradicionais, que todas apresentavam condições higiênicas insatisfatórias. As elevadas contagens de *Staphylococcus* spp. verificadas indicaram más condições higiênicas dos manipuladores e a possibilidade de contaminação dos alimentos fatiados.

No referido estudo também foi constatado que em muitos estabelecimentos a higienização de fatiadores era realizada apenas uma vez ao dia. Uma minoria utilizava cloro no processo de desinfecção. Em quase todos os estabelecimentos, o mesmo pano utilizado na limpeza dos fatiadores era também utilizado para a limpeza de outras superfícies, balcões e balanças, além de que os panos utilizados eram trocados com pouca frequência.

Serio et al. (2009) avaliaram presunto fatiado refrigerado vendido em 10 estabelecimentos de Fortaleza (CE), em embalagens de polietileno envoltas por filme PVC. Todos os presuntos avaliados continham coliformes a 35 °C. Estes valores indicam condições higiênico-sanitárias inadequadas durante o processamento, transporte ou distribuição dos presuntos. O mesmo foi verificado por Fachinello e Casaril (2013) ao avaliarem a qualidade microbiológica de presuntos comercializados em Francisco Beltrão (PR). Por eletromicrografias detectou-se a presença de um espesso biofilme recobrindo as superfícies das fatias dos presuntos, constituído de mucilagem e de numerosas bactérias de diferentes arranjos e formas.

Programas efetivos de segurança alimentar devem ser colocados em prática para reduzir a ocorrência de casos de doenças relacionados à contaminação cruzada de alimentos, além de programas efetivos de limpeza e desinfecção. Neste cenário, a educação e mudanças de comportamento de manipuladores são os mais importantes pré-requisitos para a redução dos riscos associados ao consumo deste tipo de alimentos.

5.6. Comportamento de *S. Enteritidis* nas fatias dos produtos armazenados a diferentes temperaturas durante a vida útil

A seguir, serão apresentados e discutidos os dados de comportamento de *S. Enteritidis* durante a vida útil das fatias oriundas dos produtos A e B, revestidos ou não com

emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* previamente ao fatiamento, e armazenadas a 10 e 25 °C. Além disso, informações acerca da microbiota dos produtos fatiados não inoculados com *S. Enteritidis* serão apresentadas.

Optou-se por estudar também o comportamento do patógeno em outras duas formulações de produtos cárneos a base de peito de peru, identificados e descritos anteriormente como produtos C e D. A análise do comportamento da bactéria em um número maior de formulações permite correlacionar mais precisamente a composição do produto com variações nos parâmetros de crescimento e sobrevivência do micro-organismo de interesse. Porém, o comportamento de *S. Enteritidis* foi avaliado nas formulações C e D apenas no que diz respeito à influência da temperatura, já que tais produtos não foram revestidos com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*. Um resumo do perfil dos dados experimentais obtidos é apresentado na Tabela 9 a seguir.

Tabela 9- Perfil observado para os dados experimentais obtidos durante o estudo do comportamento de *S. Enteritidis* nos diferentes produtos cárneos avaliados.

Temperatura	Produto	Tratamento*	Perfil observado	
			Crescimento	Sobrevivência
25 °C	A	Não revestido	✓	
		Revestido	✓	
	B	Não revestido	✓	
		Revestido	✓	
	C	Não revestido	✓	
	D	Não revestido	✓	
	A	Não revestido	✓	
		Revestido	✓	
10 °C	B	Não revestido		✓
		Revestido		✓
	C	Não revestido		✓
	D	Não revestido		✓

* Refere-se à aplicação da emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* (0,08 % v/m).

De acordo com o comportamento exibido por *S. Enteritidis* (crescimento ou sobrevivência) decidiu-se criar subtópicos para facilitar o entendimento. Inicialmente, serão descritos os dados de crescimento e, em seguida, os dados de sobrevivência, onde se verificou redução da concentração de *S. Enteritidis* ao longo do período de armazenamento dos produtos cárneos fatiados.

5.6.1. Comparação do comportamento de *S. Enteritidis* nos quatro produtos cárneos de peito de peru fatiados, não revestidos com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*, armazenados a 25 °C

Os parâmetros cinéticos de crescimento estimados após ajuste do modelo matemático de Baranyi e Roberts (1994) aos dados de crescimento de *S. Enteritidis* nas fatias a 25 °C estão apresentados na Tabela 10. Os parâmetros estatísticos de ajuste, MSE e R^2 , também se encontram na Tabela 10. Pode-se perceber que o modelo se ajustou satisfatoriamente aos dados obtidos, com $R^2 \geq 0,96$ e $MSE \leq 0,4$ para todos os casos, apesar de que um número maior de pontos analíticos seria mais adequado para descrever o comportamento do patógeno ao longo da vida útil, sobretudo nas primeiras 24 horas de análises, em que é verificado o crescimento exponencial.

Não foram detectadas diferenças estatísticas, ao nível de 5 % de significância, entre a concentração inicial detectada nas fatias das quatro formulações avaliadas. Isto sugere que no curto período entre a inoculação das fatias e as análises microbiológicas no tempo 0 de amostragem, a composição do produto não influenciou nas contagens de *S. Enteritidis*.

Tabela 10- Parâmetros cinéticos de crescimento de *S. Enteritidis* nas fatias dos produtos A, B, C e D, não revestidos, armazenados a 25 °C.

Parâmetro	Produto			
	A	B	C	D
$\mu_{\max}$ (h ⁻¹) ¹	0,24 ± 0,07 ^a	0,12 ± 0,02 ^b	0,16 ± 0,00 ^{ab}	0,12 ± 0,02 ^b
S ₀ (log UFC/g) ²	4,73 ± 0,57 ^a	4,02 ± 0,06 ^a	4,22 ± 0,03 ^a	4,61 ± 0,38 ^a
S _{máx} (log UFC/g) ³	9,83 ± 0,25 ^a	9,12 ± 0,24 ^b	9,55 ± 0,05 ^{ab}	9,29 ± 0,07 ^b
MSE	0,25	0,36	0,13	0,4
R ²	0,98	0,98	0,99	0,96

¹Taxa de crescimento máxima; ²Concentração inicial detectada nas fatias; ³Densidade populacional máxima. ± Representa o desvio padrão da média.

As letras (a, b) na mesma linha correspondem a diferentes grupos homogêneos de acordo com o teste Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

R² e MSE são os parâmetros estatísticos de ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais.

A taxa de crescimento de micro-organismos é limitada pela disponibilidade de nutrientes no meio em que se encontram (FDA, 2003). Fatores intrínsecos como a A_w e pH dos produtos também interferem nos parâmetros de crescimento de micro-organismos em alimentos (JAY, 2005). Os produtos cárneos utilizados neste estudo possuem pH entre 6 e 7, valor situado próximo à faixa ótima de pH para o crescimento do patógeno em estudo (7-7,5). Os valores da A_w dos produtos (Tabela 1), observados durante os estudos, também são próximos ao valor ótimo para o crescimento de *S. Enteritidis* (0,99).

Pode-se verificar, através da Tabela 10, que o produto A foi o mais susceptível ao crescimento do patógeno, sendo verificado neste produto o maior valor médio de taxa de crescimento máxima (0,24 ± 0,07 h⁻¹).

A maior taxa de crescimento no produto A pode estar associada à sua baixa concentração de sal (Tabela 1). A ausência de flavorizantes e antioxidantes, que poderiam atuar indiretamente como antimicrobianos, pode ter também facilitado o crescimento do patógeno (Tabela 2). Além disso, o nitrito de sódio empregado como conservante no produto A é considerado por alguns autores como sendo ineficaz contra enterobactérias,

como a *Salmonella* (JAY, 2005). O pH desta formulação também é ligeiramente mais elevado que o das demais formulações, sendo mais próximo da faixa de pH ótimo para o crescimento de *S. Enteritidis*.

Curiosamente, as taxas de crescimento nas fatias dos produtos B e D foram iguais em valor médio e assumem os menores valores, em comparação às formulações A e C. Nestes produtos também foram verificadas menores densidades populacionais máximas de *S. Enteritidis* após o estabelecimento da fase estacionária de crescimento ($p \leq 0,05$). Não houve diferenças significativas entre as taxas de crescimento médias nos produtos B, C e D, de acordo com o teste Tukey ($p > 0,05$).

O produto B apresenta maior concentração de sal em comparação aos produtos A e C e é o que apresenta maior concentração de carboidratos (Tabela 1). Açúcares e sais podem atuar de maneira a dificultar o crescimento bacteriano, ocasionando a redução da A_w das fatias ao longo do tempo de armazenamento (JAY, 2005). Apesar desta formulação não possuir conservantes e antioxidantes segundo informações do fabricante, ela possui glutamato monossódico, presente como realçador de sabor, especiarias e aromas não especificados, que também poderiam exercer atividade antimicrobiana. A concentração de proteína no produto B também é menor em relação à concentração presente nas demais formulações (Tabela 1), o que implica em menor quantidade de aminoácidos disponíveis como nutrientes no produto. Os fatores mencionados podem ter levado a uma menor taxa de crescimento de *S. Enteritidis* nas fatias deste produto.

O produto D é o que apresenta maior concentração de sal dentre os produtos cárneos estudados, fator limitante para o crescimento microbiano. Além disso, este produto possui o dobro de gordura em relação aos demais (1,0 %), o que provavelmente dificulta o acesso do micro-organismo aos nutrientes presentes no mesmo, representando uma barreira ao

crescimento. A presença do antioxidante ascorbato de sódio neste produto também pode influenciar nos parâmetros cinéticos de crescimento de *S. Enteritidis*, já que este, por se tratar de um sal, também atua indiretamente como antimicrobiano.

Os parâmetros de crescimento de *S. Enteritidis* no produto C pertencem aos dois grupos homogêneos identificados pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), ou seja, a taxa de crescimento máxima, concentração inicial e densidade populacional máxima do micro-organismo de interesse nas fatias, não diferiram estatisticamente dos valores destes parâmetros verificados para as demais formulações em estudo ($p > 0,05$).

O ajuste do modelo de crescimento de Baranyi e Roberts aos dados de concentração de *S. Enteritidis* (log UFC/g), nas primeiras 72 horas após inoculação das fatias, pode ser visualizado na Figura 13.

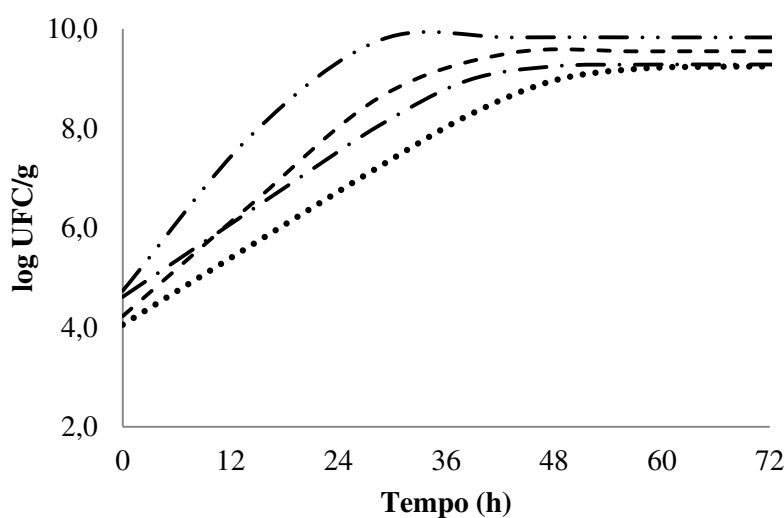


Figura 13- Representação do crescimento de *S. Enteritidis* nas primeiras 72 horas de análises, nos diferentes produtos cárneos fatiados estudados: (— - -) produto A; (.....) produto B; (- - -) produto C; (— · —) produto D.

A fase exponencial de crescimento nos quatro diferentes produtos, bem como diferenças entre as taxas de crescimento máximas podem ser observadas na Figura 13.

Na Figura 14 se encontram os gráficos de concentração média de *S. Enteritidis* (log UFC/g) versus tempo (h), para cada produto separadamente, após ajuste do modelo de crescimento de Baranyi e Roberts aos dados experimentais.

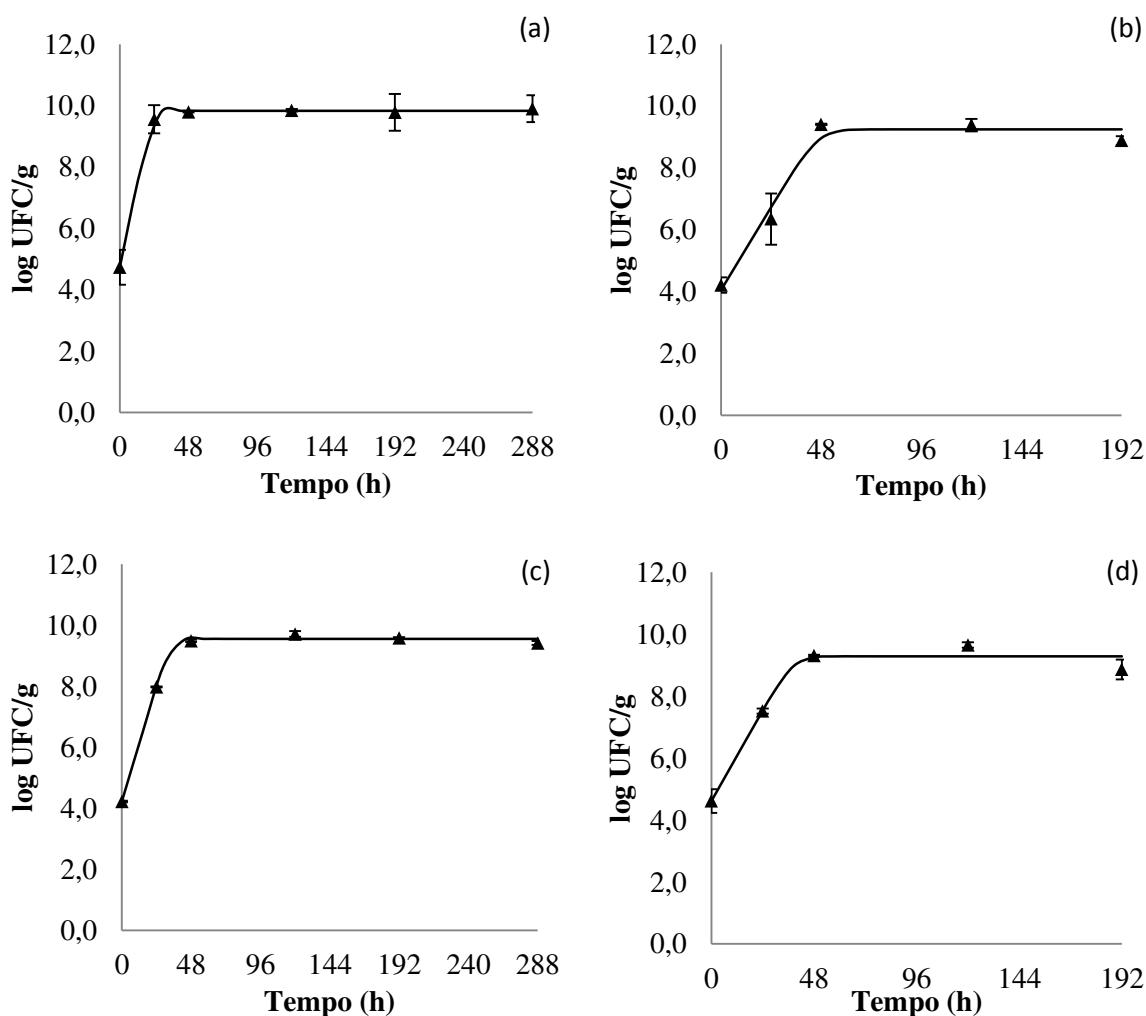


Figura 14- Dados de crescimento (log UFC/g) de *S. Enteritidis* em fatias dos produtos cárneos em função do tempo (h). (a) produto A; (b) produto B; (c) produto C; (d) produto D; (▲) dados experimentais (—) ajuste do modelo de crescimento de Baranyi e Roberts aos dados.

Nota-se que para os produtos B e D os gráficos ilustram somente os resultados de análises conduzidas nas primeiras 192 horas (8 dias) de armazenamento. Após este período verificou-se uma diminuição da concentração de *S. Enteritidis* nas fatias, o que interferia negativamente nos índices estatísticos de ajuste do modelo matemático de crescimento.

Em ensaios conduzidos pela FSA (“Food Standards Agency”), inoculou-se um coquetel contendo cinco cepas de *Salmonella* spp. ($\sim 10^5$ UFC/g) em peru cozido fatiado e observou-se que a concentração do patógeno também aumentou aproximadamente 6,0 unidades logarítmicas nas primeiras 72 horas de armazenamento, a 25 °C. Ainda no referido estudo, a taxa de crescimento máxima de *Salmonella* spp. nas fatias foi $0,24 \pm 0,00$ h⁻¹, de acordo com o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados (COMBASE, 2014).

Ilustrações das fatias não inoculadas com *S. Enteritidis*, após 12 dias de armazenamento a 25 °C estão apresentadas na Figura 15.

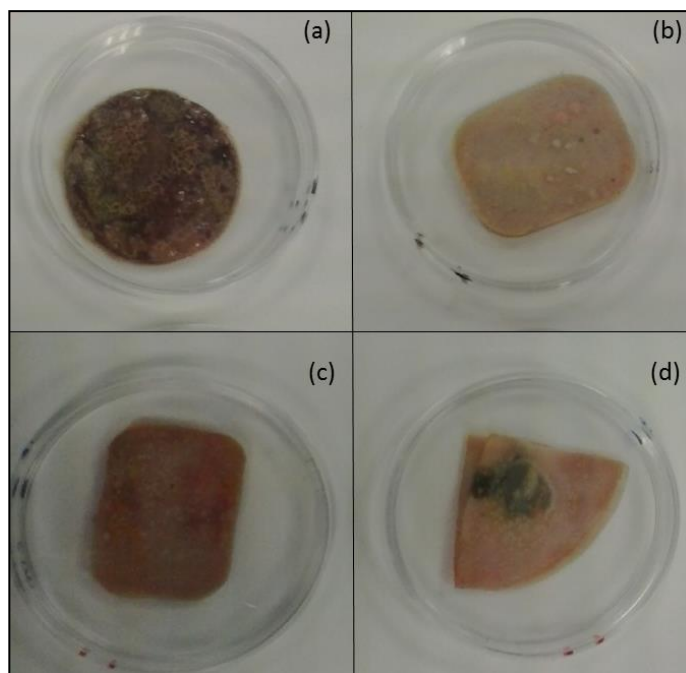


Figura 15- Fatias dos produtos avaliados, não inoculadas com *S. Enteritidis*, após 12 dias de armazenamento a 25 °C. (a) produto A; (b) produto B; (c) produto C; (d) produto D.

A fatia do produto A destaca-se pelo alto grau de deterioração, ou seja, este produto também é o mais susceptível ao crescimento de micro-organismos deterioradores. De todas as fatias, a menos deteriorada no fim do período de armazenamento foi a fatia do produto B, o que pode ser evidenciado na Figura 15 (b).

5.6.2. Comparação do comportamento de *S. Enteritidis* nos produtos cárneos fatiados A e B, com revestimento e sem revestimento de óleo essencial de *T. vulgaris*, armazenados a 25 °C

Os parâmetros cinéticos de crescimento e os parâmetros estatísticos de ajuste estimados após ajuste dos dados de crescimento de *S. Enteritidis* a 25 °C, nas fatias dos produtos A e B, revestidos e não revestidos com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*, são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11- Parâmetros cinéticos de crescimento de *S. Enteritidis* nas fatias dos produtos A e B, revestidos e não revestidos com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* (0,08 % v/m), armazenadas a 25 °C.

Parâmetro	Produto A		Produto B	
	Não revestido	Revestido	Não revestido	Revestido
$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$ ¹	0,24 ± 0,07 ^a	0,28 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,02 ^a	0,10 ± 0,01 ^a
$S_0 (\log \text{UFC/g})$ ²	4,73 ± 0,57 ^a	4,26 ± 0,25 ^a	4,02 ± 0,06 ^a	3,80 ± 0,22 ^a
$S_{\text{máx}} (\log \text{UFC/g})$ ³	9,83 ± 0,25 ^a	9,97 ± 0,09 ^a	9,12 ± 0,24 ^a	9,03 ± 0,15 ^a
MSE	0,25	0,17	0,36	0,51
R ²	0,98	0,99	0,98	0,95

¹Taxa de crescimento máxima; ²Concentração inicial detectada nas fatias; ³Densidade populacional máxima. ± Representa o desvio padrão da média.

As letras (a, b) em uma mesma linha, para um mesmo produto, correspondem a diferentes grupos homogêneos de acordo com o teste Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

R² e MSE são os parâmetros estatísticos de ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais.

Não houve diferenças estatísticas entre os parâmetros cinéticos de crescimento nas fatias do produto A revestido e não revestido ($p > 0,05$), armazenadas a 25 °C. O mesmo foi observado para o produto B. Isto pode ser justificado pelo fato de que a 25 °C pode ocorrer perda por volatilização de compostos presentes nos óleos essenciais que exercem atividade antimicrobiana. Nestes casos, a elevada temperatura de armazenamento aliada a um elevado nível inicial de inóculo possibilitou o crescimento acelerado do micro-organismo (altas taxas de crescimento máximas).

Portanto, a aplicação do óleo essencial não foi vantajosa para as fatias dos produtos armazenados a 25 °C, do ponto de vista microbiológico. Em relação à aparência, após 12 dias de armazenamento a 25 °C as fatias de ambos os produtos A e B (Figura 16), revestidas com emulsão de óleo essencial, apresentavam um aspecto de produto conservado, enquanto as fatias dos produtos não revestidos já se encontravam visualmente deterioradas. O crescimento de micro-organismos na fatia do produto A não revestida e a alteração da cor e perda de massa da fatia do produto B são visíveis.

Entre fatias não inoculadas com *S. Enteritidis* (Figura 15) e fatias inoculadas, ilustradas na Figura 16 a seguir, há uma grande diferença de aparência ao final do período de armazenamento. Esta bactéria parece competir com a microbiota deteriorante dos produtos quando presente nas fatias, fazendo com que o aspecto delas após 12 dias de armazenamento não seja tão ruim como no caso de fatias não inoculadas. A deterioração dos produtos é muito maior e visível quando não há a presença de *S. Enteritidis* como competidora.

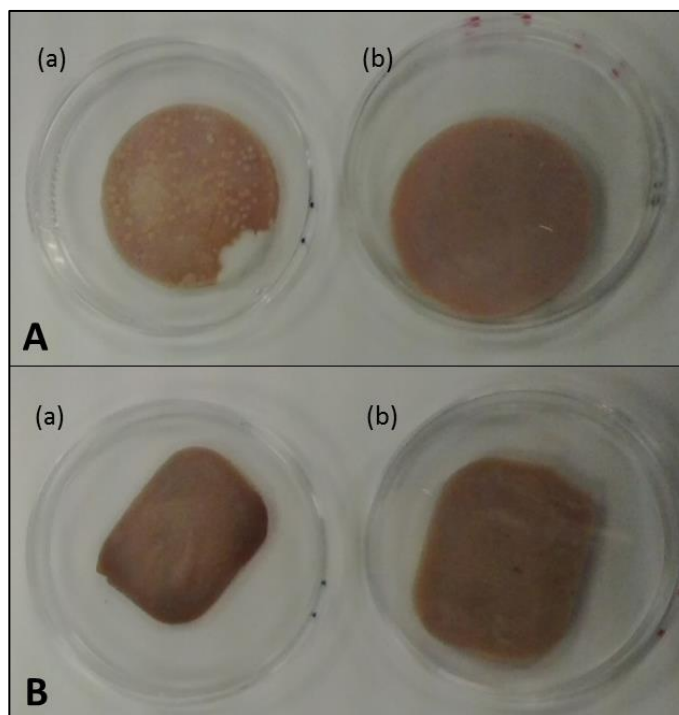


Figura 16- Fatias do produto A e B inoculadas com *S. Enteritidis*, após 12 dias de armazenamento a 25 °C. (a) produto não revestido; (b) produto revestido com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* (0,08 % v/m).

A taxa de crescimento máxima média de *S. Enteritidis* nas fatias do produto A revestido foi significativamente maior que nas fatias do produto B revestido ($p \leq 0,05$), resultado coerente de acordo com o discutido em tópico anterior, relacionando a composição dos produtos com a velocidade de crescimento do patógeno. A densidade populacional máxima de *S. Enteritidis* ($S_{m\acute{a}x}$) também diferiu estatisticamente entre os produtos A e B revestidos, sendo maior nas fatias do produto A (Tabela 11). A concentração inicial de inóculo (S_i) detectada nas fatias não foi diferente estatisticamente entre os produtos A e B revestidos.

Os gráficos de crescimento de *S. Enteritidis* nas fatias dos produtos A e B, com ou sem revestimento de óleo essencial de *T. vulgaris*, em função do tempo de armazenamento podem ser visualizados na Figura 17.

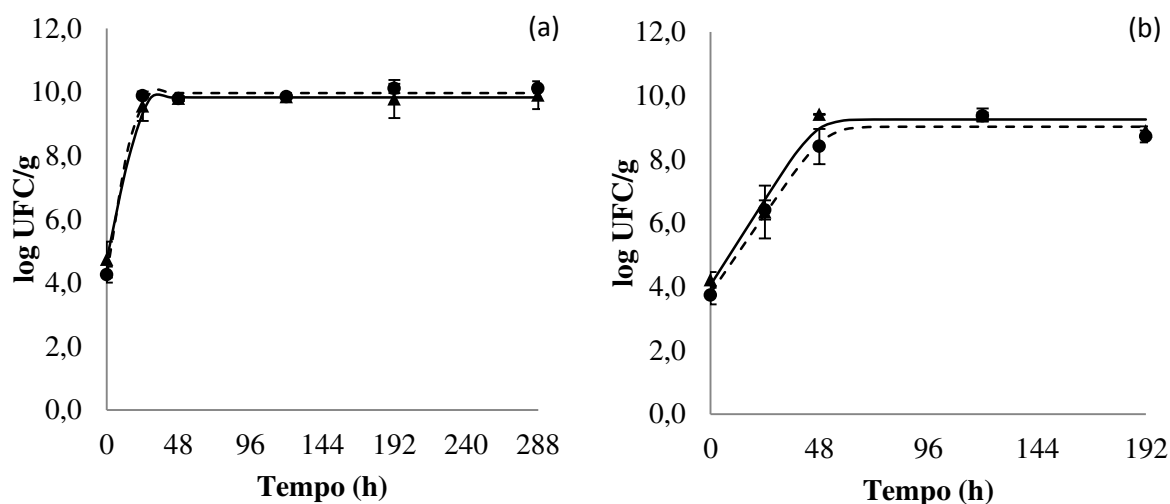


Figura 17- Representação gráfica dos dados de crescimento de *S. Enteritidis* (log UFC/g) nas fatias dos produtos revestidos ou não com emulsão contendo óleo essencial de *T. vulgaris* (0,08 % v/m), armazenadas a 25 °C. (a) produto A; (b) produto B; (▲) dados experimentais de produtos não revestidos; (●) dados experimentais de produtos revestidos; (- - - - -) ajuste do modelo aos dados de fatias com revestimento; (—) ajuste do modelo aos dados de fatias sem revestimento.

A partir da análise visual dos gráficos pode-se concluir que realmente o efeito da temperatura no crescimento foi significativo e fez com que o óleo essencial não exercesse atividade antimicrobiana nas fatias armazenadas a 25 °C.

5.6.3. Comparação do comportamento de *S. Enteritidis* no produto cárneo fatiado A com revestimento e sem revestimento de óleo essencial de *T. vulgaris*, armazenado a 10 °C

Os parâmetros cinéticos de crescimento de *S. Enteritidis* nas fatias do produto A armazenadas a 10 °C, revestidas e não revestidas com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*, bem como os parâmetros estatísticos de ajuste do modelo de crescimento de Baranyi e Roberts aos dados experimentais, estão organizados na Tabela 12.

O produto A foi o único dos produtos avaliados que possibilitou o crescimento de *S. Enteritidis* durante 18 dias de armazenamento a 10 °C, demonstrando que este produto foi o mais susceptível ao crescimento de micro-organismos.

Tabela 12- Parâmetros cinéticos de crescimento de *S. Enteritidis* nas fatias do produto A, revestidas e não revestidas com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* (0,08 % v/m), armazenadas a 10 °C.

Parâmetro	Tratamento	
	Não revestido	Revestido
lag (h) ¹	31,56 ± 16,37 ^a	48,70 ± 8,98 ^a
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) ²	0,04 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,02 ^b
S ₀ (log UFC/g) ³	4,81 ± 0,62 ^a	4,75 ± 0,67 ^a
S _{máx} (log UFC/g) ⁴	7,75 ± 0,36 ^a	6,97 ± 0,15 ^b
MSE	0,16	0,16
R ²	0,99	0,98

¹Fase lag de crescimento; ²Taxa de crescimento máxima; ³Concentração inicial de inóculo; ⁴Densidade populacional máxima.

± Representa o desvio padrão da média.

As letras (a, b) em uma mesma linha correspondem a diferentes grupos homogêneos de acordo com o teste Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

R² e MSE são os parâmetros estatísticos de ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais.

As curvas de crescimento de *S. Enteritidis* nas fatias do produto A apresentaram um período de adaptação, referente à fase lag, a 10 °C. Esta temperatura de armazenamento, por ser mais baixa, representa uma condição adversa para o crescimento do patógeno, que necessita adaptar-se antes de começar a multiplicar-se exponencialmente.

De acordo com os resultados de ANOVA, não há diferença significativa entre a duração da fase lag a 10 °C, ao nível de 5 % de significância, nas fatias do produto A revestido (48,70 h) e não revestido (31,56 h) com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*. Na maioria das repetições a fase lag foi mais longa para os casos em que os produtos estavam revestidos com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*, porém a grande variabilidade dos dados não permitiu que diferenças estatísticas significativas fossem detectadas ($p > 0,05$).

A maior duração da fase lag em produtos revestidos com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* é justificada pelo fato de que, além da temperatura baixa, a presença de substâncias antimicrobianas representa uma barreira adicional para a adaptação do micro-organismo ao meio, que demanda mais tempo para adaptar-se ao ambiente. Após adaptado, o micro-organismo se multiplica exponencialmente mais rapidamente, o que pode ser verificado pelas taxas de crescimento máxima do patógeno nas fatias do produto A, armazenados a 10 °C (0,09 em 0,04 h⁻¹ em fatias não revestidas e revestidas, respectivamente).

A análise estatística mostrou também que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o nível de inóculo inicial detectado nas fatias revestidas e não revestidas do produto A, ou seja, no curto período de tempo transcrito entre a inoculação e as análises microbiológicas das fatias conduzidas no tempo 0, o óleo essencial não exerceu atividade antimicrobiana.

Com relação à densidade populacional máxima de *S. Enteritidis* nas fatias, houve diferença significativa entre os níveis observados para o produto revestido e não revestido com emulsão contendo óleo essencial de *T. vulgaris*, de acordo com a ANOVA ($p \leq 0,05$), sendo que uma menor concentração do patógeno foi verificada nas fatias contendo o revestimento. Esta diferença equivale a mais de 0,5 unidade logarítmica.

Juneja (2007) avaliaram o crescimento de um coquetel de 5 cepas de *Salmonella* spp. inoculado em peito de frango, durante 7 dias de armazenamento a 10 °C. A taxa de crescimento máxima no referenciado estudo foi $0,03 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$ e a densidade populacional máxima foi $7,54 \pm 0,25 \text{ log UFC/g}$, resultados bastante similares aos obtidos para este trabalho nas fatias não revestidas do produto A ($0,04 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ e $7,75 \pm 0,36 \text{ log UFC/g}$, respectivamente), considerando também que a concentração inicial de inóculo no produto cárneo foi a mesma inoculada nas fatias no presente estudo.

As fatias dos produtos não revestidos com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* se encontravam visualmente mais deterioradas do que as fatias dos produtos revestidos, ao final do período de armazenamento (Figura 18). Isto demonstra que a aplicação do óleo essencial seria vantajosa nos produtos em relação ao aspecto sensorial.

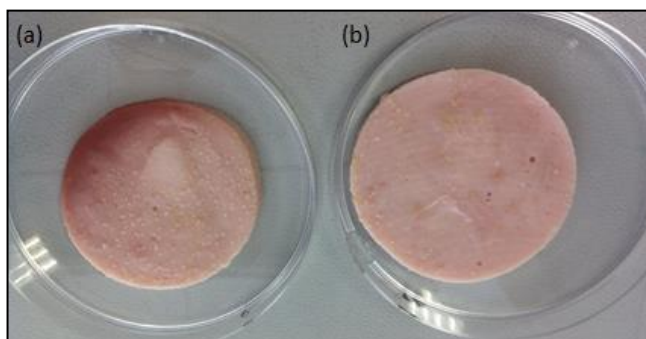


Figura 18- Fatias do produto A inoculadas com *S. Enteritidis*, após 18 dias de armazenamento a 10 °C. (a) produto não revestido; (b) produto revestido com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* (0,08 % v/m).

O gráfico de crescimento de *S. Enteritidis* (log UFC/g) em função do tempo (h) nas fatias do produto A é apresentado na Figura 19.

Nota-se que nas fatias do produto revestido, ainda que também tenha sido verificado crescimento, a densidade populacional máxima foi menor. Além disso, a densidade populacional máxima verificada para produtos revestidos e não revestidos com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*, armazenados a 10 °C, foi menor em relação ao valor verificado durante o armazenamento das fatias deste produto a 25 °C, mostrando que, obviamente, o crescimento de *S. Enteritidis* é mais propício a temperaturas mais elevadas de armazenamento.

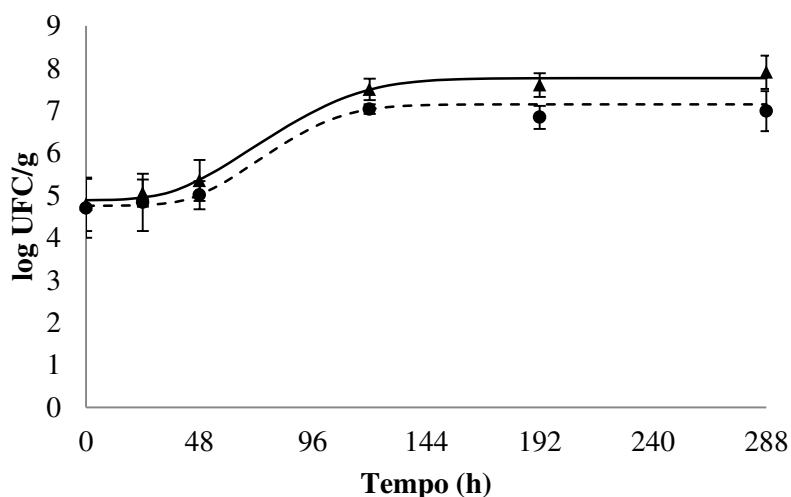


Figura 19- Representação gráfica dos dados de crescimento de *S. Enteritidis* nas fatias do produto A revestido ou não com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* (0,08 % v/m), armazenadas a 10 °C. (▲) dados experimentais de produtos não revestidos; (●) dados experimentais de produtos revestidos; (- - - - -) ajuste do modelo aos dados de fatias com revestimento; (—) ajuste do modelo aos dados de fatias sem revestimento.

Observa-se que o gráfico ilustra somente os resultados para os primeiros 12 dias (288 h) de armazenamento, apesar de que análises foram feitas até o décimo oitavo dia de armazenamento a 10 °C. Novamente foi verificada uma diminuição da concentração de salmonela após 12 dias de análise, o que interferia negativamente nos índices estatísticos de ajuste do modelo matemático de crescimento de Baranyi e Roberts.

Baseando-se nestes resultados é possível concluir que se este produto cárneo for contaminado durante alguma etapa do processamento, como o fatiamento, e não for submetido a tratamentos letais para eliminar micro-organismos patogênicos, o armazenamento em ambientes domésticos poderia permitir o crescimento destes micro-organismos, ainda que estivessem presentes em concentrações menores que a concentração inicial avaliada neste trabalho.

O crescimento microbiano pode ser facilitado por oscilações nas temperaturas de armazenamento, que geralmente são baixas em ambientes domésticos, bem como pela própria composição do produto. Portanto, o armazenamento de produtos fatiados em refrigeradores domésticos por longos períodos de tempo pode representar um risco à saúde do consumidor quando estes estiverem contaminados com micro-organismos patogênicos (VORST; TODD; RYSER, 2006).

5.6.4. Comparação do comportamento de *S. Enteritidis* nos produtos cárneos fatiados B, C, D, não revestidos com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*, armazenados a 10 °C

Como já discutido anteriormente, as fatias do produto A foram susceptíveis ao crescimento de *S. Enteritidis* a 10 °C, portanto, esta formulação não será citada neste

tópico, que discute particularmente a redução dos níveis do patógeno nas fatias das demais formulações durante armazenamento a esta temperatura.

Na Tabela 13 são apresentadas as reduções dos níveis *S. Enteritidis* nas fatias dos produtos B, C e D, armazenadas a 10 °C, durante 18 dias. Este período de armazenamento foi fixado com base em informações dos fabricantes em relação ao prazo de validade dos produtos. Análises de variância procedidas pelo teste Tukey ($\alpha = 0,05$) foram realizadas, para que fosse possível identificar os grupos homogêneos estatisticamente, de acordo com as formulações dos produtos.

Tabela 13- Sumário dos dados de sobrevivência de *S. Enteritidis* nas fatias dos diferentes produtos, armazenados durante 18 dias, a 10 °C.

Parâmetro	Produto		
	B	C	D
Si	4,63 ± 0,17 ^a	4,55 ± 0,09 ^a	4,49 ± 0,42 ^a
Sf	1,00 ± 0,00	2,17 ± 0,23	1,33 ± 0,33
Δ1d	0,95 ± 0,00 ^a	0,91 ± 0,01 ^a	-0,19 ± 0,35 ^b
Δ2d	1,21 ± 0,14 ^a	1,14 ± 0,12 ^a	0,99 ± 0,45 ^a
Δ5d	2,32 ± 0,12 ^a	1,50 ± 0,09 ^b	1,69 ± 0,4 ^{ab}
Δ8d	2,94 ± 0,08 ^a	2,02 ± 0,03 ^b	2,04 ± 0,65 ^b
Δ12d	3,03 ± 0,17 ^a	2,31 ± 0,09 ^a	2,62 ± 0,50 ^a
Δ15d	3,63 ± 0,17 ^a	2,36 ± 0,03 ^b	2,90 ± 0,30 ^b
Δ18d	ND	2,37 ± 0,14 ^a	3,16 ± 0,09 ^b
R ²	0,98	0,98	0,95
MSE	0,04	0,02	0,11

± Representa o desvio padrão da média.

As letras (a, b) em uma mesma linha representam os diferentes grupos homogêneos de acordo com o teste Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

Si e Sf correspondem às concentrações (log UFC/g) detectadas no tempo inicial e final de amostragem, respectivamente; ΔS1d, ΔS2d, ΔS5d, ΔS8d, ΔS12d, ΔS15d, ΔS18d são as reduções logarítmicas em diferentes dias durante a vida útil (1d, 2d, 5d, 8d, 12d, 15d, 18d).

ND = Não detectado.

R² e MSE são os parâmetros estatísticos de ajuste do modelo Weibull aos dados experimentais.

De acordo com os resultados da Tabela 13, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre a concentração de *S. Enteritidis* detectada nas fatias no tempo inicial (tempo 0 de amostragem) dos produtos B, C e D armazenadas a 10 °C, o que indica que houve um ajuste adequado do nível de inóculo e homogeneidade nas condições experimentais, além de que a composição dos produtos neste tempo de amostragem não interferiu na contagens de *S. Enteritidis*.

Após 24 h de armazenamento, verificou-se uma redução de aproximadamente 1,0 unidade logarítmica na concentração de *S. Enteritidis* detectada nos produtos cárneos fatiados B e C. No produto fatiado D não foi verificada redução dos níveis do patógeno no primeiro dia de armazenamento.

No tempo 2d não houve diferenças significativas nas reduções observadas nas fatias dos produtos B, C e D (Tabela 13). Porém, as reduções de concentração de *S. Enteritidis* foram estatisticamente maiores ($p \leq 0,05$) nas fatias do produto B, nos tempos de amostragem 8d e 15d. Esta formulação, além de ser menos susceptível ao crescimento de *S. Enteritidis* a 25 °C é a menos propícia à sobrevivência deste patógeno a 10 °C. A elevada concentração de sal e açúcares do produto, que leva a uma diminuição da A_w , parece exercer um efeito inibidor sobre o micro-organismo durante todo o período de armazenamento das fatias, a 10 °C.

Análises microbiológicas indicaram que no tempo 18d não foram quantificadas células nas fatias do produto B, devido ao fato de que o número de células provavelmente estava abaixo do limite de detecção da técnica empregada (plaqueamento em profundidade). Neste caso, pode-se afirmar que as células não puderam ser quantificadas, porém poderiam estar presentes nas fatias.

Em relação aos produtos C e D, não foram detectadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre as reduções dos níveis de *S. Enteritidis* nas fatias destes produtos, em praticamente todos os intervalos de tempo considerados durante a vida útil. Diferenças nas formulações destes produtos parecem não interferir no comportamento de *S. Enteritidis*, durante o armazenamento das fatias a 10 °C, assim como não foram detectadas diferenças estatísticas dos parâmetros de crescimento destas formulações armazenadas a 25 °C ($p > 0,05$).

A Tabela 14 apresenta a taxas de redução médias (log UFC/g.h) de *S. Enteritidis* nas fatias, nos diferentes tempos de amostragem, durante armazenamento a 10 °C.

Tabela 14- Taxas de redução média dos níveis de *S. Enteritidis* nas fatias, nos diferentes tempos de amostragem, durante o armazenamento a 10 °C, em log UFC/g.h.

Taxa de redução média (log UFC/g.h)							
Produto	$\Delta 1d$	$\Delta 2d$	$\Delta 5d$	$\Delta 8d$	$\Delta 12d$	$\Delta 15d$	$\Delta 18d$
B	0,040	0,025	0,019	0,015	0,011	0,010	-
C	0,038	0,024	0,012	0,011	0,008	0,007	0,005
D	0,009	0,012	0,010	0,009	0,008	0,008	0,007
redução ao longo do tempo →							

Nos produtos cárneos fatiados B e C foram verificadas taxas de redução médias de 0,040 e 0,038 log UFC/g.h, respectivamente, após 24 horas da inoculação das fatias, as maiores taxas de redução verificadas durante toda a vida útil dos produtos em estudo. Na formulação C, a presença de sal, conservantes e antioxidantes contendo sódio em sua estrutura exerceu um forte efeito inibidor sobre o patógeno durante armazenamento a 10 °C, sobretudo nas primeiras 24 horas de análises, assim como ocorreu nas fatias do produto B.

Na Figura 20 podem ser observadas as diferenças no comportamento de *S. Enteritidis* nas fatias dos produtos B, C e D, nas quais foi verificada redução do nível do patógeno ao longo dos 18 dias de armazenamento a 10 °C. Apenas os dados de ajuste do modelo Weibull estão ilustrados.

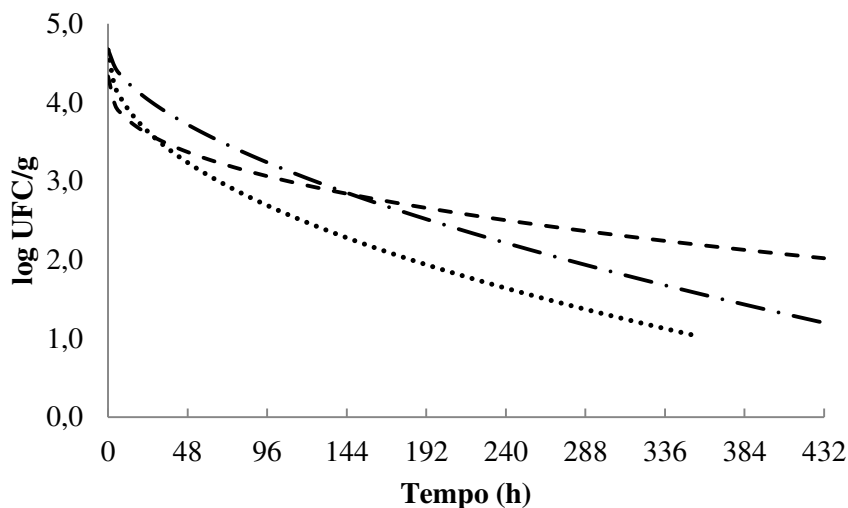


Figura 20- Perfil de sobrevivência de *S. Enteritidis* nas fatias dos produtos, armazenados a 10 °C, após ajuste do modelo Weibull aos dados experimentais. (.....) produto B; (----) produto C; (— · —) produto D.

Os resultados obtidos sugerem que o padrão de sobrevivência de *S. Enteritidis* nas fatias dos diferentes produtos avaliados neste tópico foi similar e reflete um decréscimo mais pronunciado dos níveis do micro-organismo nos primeiros dias de armazenamento a 10 °C, com maiores taxas de redução verificadas nas primeiras 48 horas de amostragem, seguido por uma desaceleração na redução nos dias subsequentes (menores taxas de redução).

O padrão observado reflete a existência de duas subpopulações dentro de uma mesma população microbiana. A primeira constituída por células mais sensíveis ao estresse aos quais foram expostas, neste caso a temperatura baixa, caracterizadas pelas elevadas taxas de redução (primeiras 48 h, Tabela 14). Por outro lado, as menores taxas de redução de *S. Enteritidis* nos últimos dias de amostragem, também apresentadas na Tabela 14, refletem a presença de outra subpopulação, porém mais resistente ao estresse conferido pelo ambiente e que conseguiu sobreviver por maior período de tempo. De fato, em um inóculo que consiste apenas de uma cepa de um determinado micro-organismo, as células podem apresentar diferentes resistências a situações de estresse (RODRIGUEZ-CATURLA et al., 2012).

De forma geral, as taxas de redução de *S. Enteritidis* sofreram um decréscimo durante toda a vida útil das fatias dos produtos B, C e D armazenados a 10 °C (Tabela 14), confirmando o perfil de sobrevivência discutido anteriormente, que pôde ser representado pelo modelo Weibull com bons índices de ajustes estatísticos (Tabela 13) em todos os casos.

Na Figura 21 são apresentados os gráficos de concentração de *S. Enteritidis* (log UFC/g) em função do tempo de armazenamento (h).

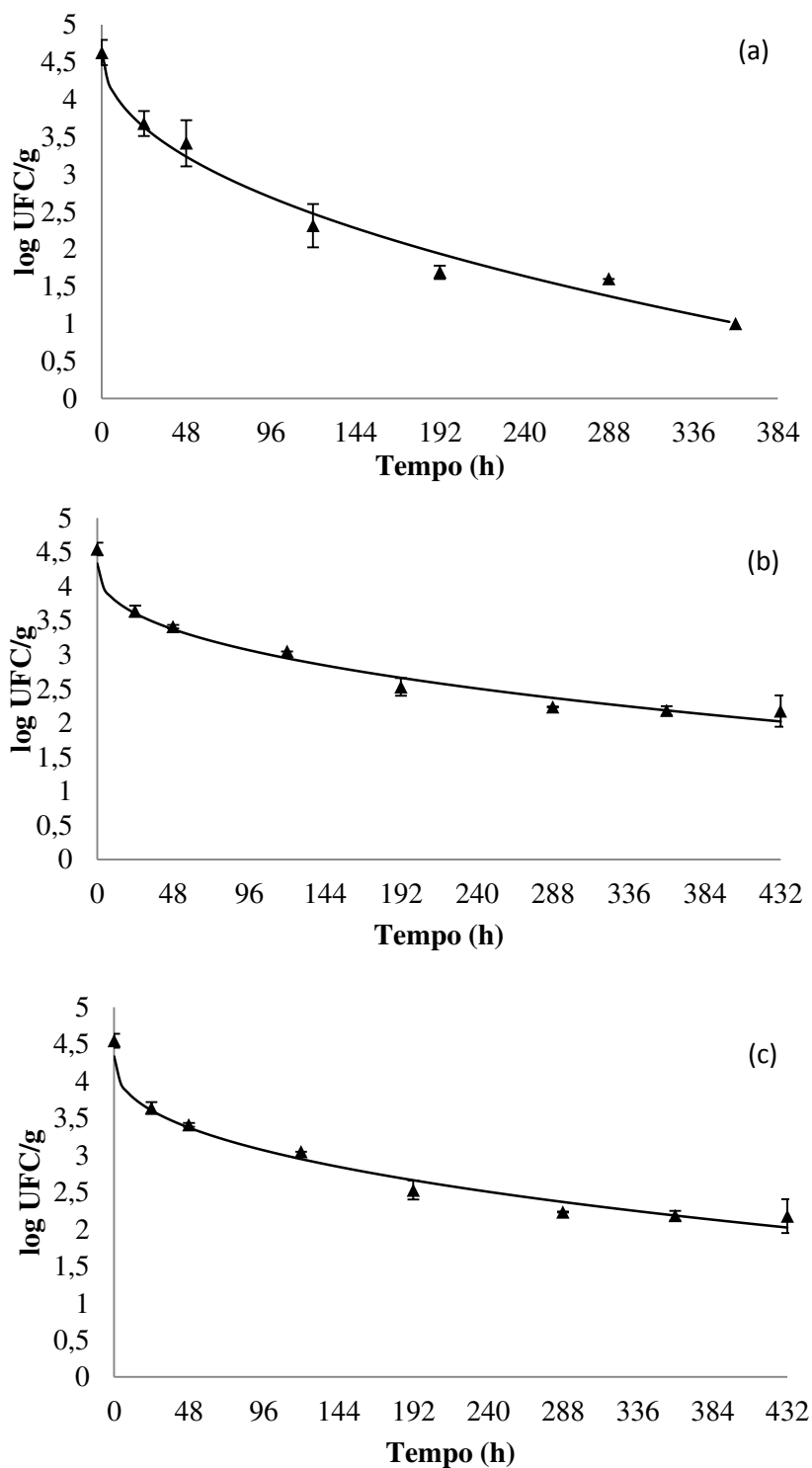


Figura 21- Representação gráfica dos dados de sobrevivência de *S. Enteritidis* (log UFC/g) nas fatias dos produtos armazenados a 10 °C em função do tempo de armazenamento (h). (a) produto B; (b) produto C; (c) produto D; (▲) dados experimentais; (—) ajuste do modelo Weibull aos dados experimentais.

5.6.5. Comparação do comportamento de *S. Enteritidis* no produto cárneo fatiado B com revestimento e sem revestimento de óleo essencial de *T. vulgaris*, armazenado a 10 °C

Como comentado anteriormente, a temperatura influenciou consideravelmente o comportamento de *S. Enteritidis* durante a vida útil das fatias dos produtos A e B, revestidos e não revestidos com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*, a 10 °C. Foram discutidos anteriormente os dados de crescimento do patógeno nas fatias do produto A, revestidos e não revestidos com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*. Nas fatias do produto B, a cepa em questão não foi capaz de crescer durante a vida útil a 10 °C, ao contrário, exibiu um perfil de sobrevivência, em todos os tratamentos avaliados.

A Tabela 15 apresenta as reduções dos níveis de *S. Enteritidis* (log UFC/g) nas fatias do produto B ao longo da vida útil e armazenamento a 10 °C. Análises estatísticas foram realizadas para comparar as reduções verificadas em todos os tempos de amostragem (ANOVA, seguida de teste Tukey).

Primeiramente, é válido mencionar que o patógeno pôde ser detectado nas fatias do produto não revestido apenas nos primeiros 15 dias de amostragem, enquanto que para o produto revestido o tempo de detecção foi reduzido para 12 dias. Isto significa que nos tempos posteriores em que foram realizadas análises microbiológicas para avaliar o comportamento do patógeno, este não foi detectado nas fatias.

Não houve diferenças estatísticas entre o nível inicial do patógeno detectado nas fatias, ou seja, do nível presente nas fatias no tempo 0, entre o produto B revestido e não revestido com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* ($p > 0,05$). Foi verificado que as

reduções dos níveis de *S. Enteritidis* nas primeiras 24 horas e 48 horas de análises foram estatisticamente diferentes para ambos os tratamentos ($p \leq 0,05$).

Tabela 15- Reduções nos níveis de *S. Enteritidis* (log UFC/g) verificados nos diferentes dias da vida útil das fatias do produto B, revestidas e não revestidas com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* (0,08 % v/m), armazenadas a 10 °C.

Parâmetro	Tratamento	
	Sem revestimento	Com revestimento
Si	4,63 $\pm$ 0,17 ^a	4,40 $\pm$ 0,36 ^a
Sf	1,00 $\pm$ 0,00	1,48 $\pm$ 0,00
Δ 1d	0,95 $\pm$ 0,00 ^a	1,58 $\pm$ 0,17 ^b
Δ 2d	1,21 $\pm$ 0,14 ^a	2,17 $\pm$ 0,21 ^b
Δ 5d	2,32 $\pm$ 0,12 ^a	2,42 $\pm$ 0,56 ^a
Δ 8d	2,94 $\pm$ 0,08 ^a	2,80 $\pm$ 0,36 ^a
Δ 12d	3,03 $\pm$ 0,17 ^a	2,92 $\pm$ 0,36 ^a
Δ 15d	3,63 $\pm$ 0,17	ND
Δ 18d	ND	ND
R ²	0,98	0,97
MSE	0,04	0,06

$\pm$ Representa o desvio padrão da média.

As letras (a, b) representam os diferentes grupos homogêneos reportados pelo teste Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

Si e Sf correspondem às concentrações (log UFC/g) detectadas nas fatias nos tempos inicial e final de amostragem, respectivamente; Δ S1d, Δ S2d, Δ S5d, Δ S8d, Δ S12d, Δ S15d são as reduções logarítmicas em diferentes dias durante a vida útil (1d, 2d, 5d, 8d, 12d, 15d, 18d).

ND = Não detectado.

R² e MSE são os parâmetros estatísticos de ajuste do modelo Weibull aos dados experimentais.

Nas fatias contendo o revestimento de óleo essencial de *T. vulgaris*, a redução de *S. Enteritidis* nas primeiras 24 horas de análise foi de 1,58 $\pm$ 0,17 log UFC/g, enquanto que nas fatias do produto não revestido a redução foi de apenas 0,95 $\pm$ 0,00 log UFC/g. A diferença na redução foi mais discrepante após 48 horas de armazenamento, sendo que a

redução dos níveis do patógeno nas fatias revestidas foi de $2,17 \pm 0,21$ log UFC/g e nas fatias não revestidas foi de $1,21 \pm 0,14$ UFC/g.

Os resultados indicaram que a 10 °C, o óleo essencial atuou na superfície das fatias, exercendo efeito antimicrobiano. Novamente o efeito da temperatura foi determinante, já que esta, aliada à presença de substâncias antimicrobianas do óleo essencial de *T. vulgaris* e também da própria formulação do produto B, as chamadas barreiras para o crescimento microbiano, resultaram na inibição de *S. Enteritidis* nas fatias.

Os resultados obtidos são positivos já que a formulação do produto B não apresenta conservantes químicos, ou seja, a atividade antimicrobiana verificada é devida a presença de uma substância natural, o óleo essencial de *T. vulgaris*, aspecto que desperta interesse por parte dos consumidores e que caracterizaria um produto mais saudável.

No entanto, nos tempos de análises subsequentes a 48 h, as reduções dos níveis da bactéria não foram estatisticamente diferentes nas fatias revestidas e não revestidas com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*, o que também pode ser visto na Tabela 15. Isto pode ter ocorrido pela presença de uma subpopulação de células mais resistente ao estresse, como mencionado anteriormente.

O modelo Weibull se ajustou bem aos dados de sobrevivência obtidos também nas fatias do produto B revestido com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*, exibindo bons valores estatísticos de ajuste (Tabela 15). No estudo de Leandro et al. (2013) o modelo Weibull também foi adequado para descrever a cinética de inativação dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *C. citratus* contra *S. Enteritidis* inoculada em carne moída, durante armazenamento a 4 °C.

As fatias do produto B, após 18 dias de armazenamento a 10 °C estão ilustradas na Figura 22. Nota-se que a fatia sem o revestimento comestível sofreu também perda de água,

com redução da massa final, além de alteração da cor. Essa perda de água também influencia na sobrevivência do patógeno, que cresce preferencialmente em produtos com $A_w \geq 0,95$. A fatia do produto revestido se apresentava sem sinais de deterioração microbiana.

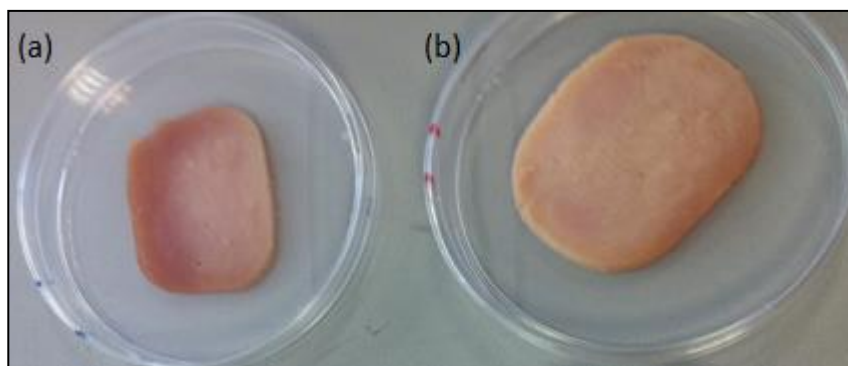


Figura 22- Fatias do produto B inoculadas com *S. Enteritidis*, após 18 dias de armazenamento a 10 °C. (a) Fatia de produto não revestido; (b) Fatia de produto revestido com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* (0,08 % v/m).

As diferenças de coloração entre as fatias do produto B (Figura 22) parecem estar relacionadas à desidratação das mesmas durante o período de armazenamento a 10 °C. Ainda que a principal causa da alteração da cor em carnes e produtos cárneos seja a oxidação lipídica, os produtos cárneos avaliados neste trabalho apresentam baixo teor lipídico e, por isso, são pouco susceptíveis ao escurecimento devido às reações de oxidação.

Porém, é válido mencionar que os efeitos positivos do óleo essencial de *T. vulgaris* na extensão da vida de prateleira, por meio de controle das reações de oxidação em carnes e produtos cárneos, já foram documentados (JAYASENA; JO, 2014). Os compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais atuam como estabilizadores de radicais livres e doadores de hidrogênio, prevenindo a oxidação lipídica e consequentes alterações nas

características sensoriais de alimentos, incluindo-se alterações na coloração. (JAYASENA; JO, 2014).

Na Figura 23 é exibido um gráfico dos dados de sobrevivência de *S. Enteritidis* (log UFC/g) em função do tempo (h) de armazenamento, nas fatias do produto B, revestido e não revestido com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*.

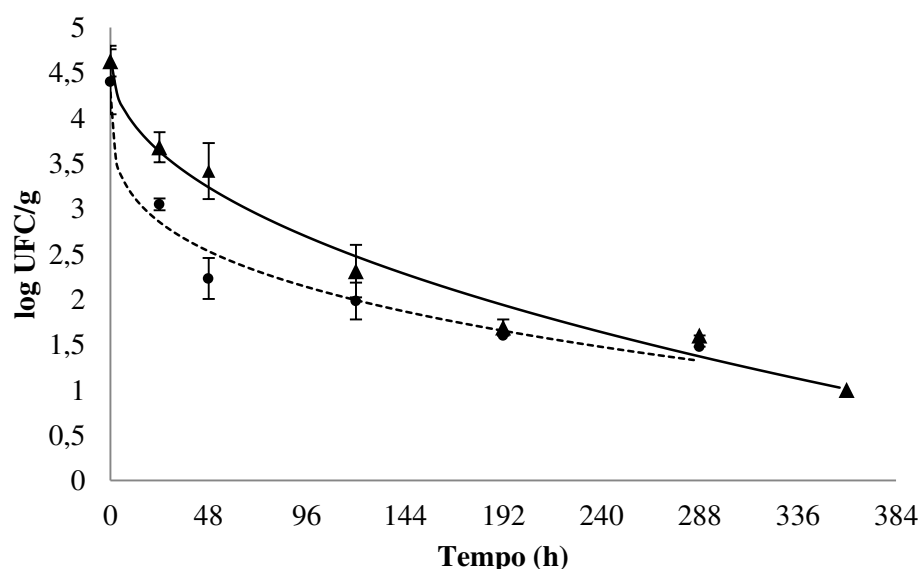


Figura 23- Representação gráfica dos dados de sobrevivência de *S. Enteritidis* nas fatias do produto B revestido ou não com emulsão contendo óleo essencial de *T. vulgaris* (0,08 % v/m), armazenadas a 10 °C. (▲) dados experimentais de produtos não revestidos; (●) dados experimentais de produtos revestidos; (- - - - -) com revestimento; (—) sem revestimento.

Para estes ensaios foi fixado um nível inicial de inóculo elevado, para que fosse possível acompanhar a redução das contagens do patógeno a baixa temperatura. A precisão dos métodos microbiológicos utilizados poderia ser reduzida ao optar-se por menor

concentração inicial de inóculo (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2007), o que dificultaria a detecção de *S. Enteritidis* em fatias armazenadas a 10 °C.

Em casos em que o armazenamento a baixas temperaturas não propicia o crescimento de micro-organismos patogênicos e há um menor nível de contaminação dos produtos, o tratamento com emulsão de óleo essencial poderia ser bem sucedido e até levar à eliminação da contaminação dos alimentos em questão. Portanto, os resultados obtidos nestes ensaios, sobretudo os que se referem ao produto B, foram satisfatórios, por demonstrarem que há a atuação do óleo essencial como agente antimicrobiano, durante o armazenamento das fatias a 10 °C.

5.6.6. Monitoramento da microbiota presente nos produtos cárneos prontos para o consumo durante o armazenamento

Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. nos produtos cárneos obtidos para os experimentos, como indicado pelas análises microbiológicas de fatias não inoculadas com *S. Enteritidis*. Isto significa que todas as colônias quantificadas durante as análises microbiológicas foram provenientes do inóculo ajustado para os experimentos.

Em todos os produtos estudados, em algum ponto de amostragem durante o armazenamento, foi constatada a presença de coliformes totais, de acordo com o crescimento de colônias características em placas de ágar VRBL. Porém, neste trabalho não foi feita a quantificação do número de coliformes, apenas constatou-se a presença dos mesmos.

A presença de coliformes em produtos cárneos processados, ainda que permitida pela legislação (BRASIL, 2001) em determinados níveis (Apêndice D – Tabela 18), pode indicar condições inadequadas de processamento. No caso específico destes produtos, que

são submetidos a tratamentos térmicos após serem embalados, a presença de coliformes pode indicar que tal tratamento não foi realizado de forma adequada, permitindo a persistência destes micro-organismos (JAY, 2005).

Elevadas contagens de mesófilos aeróbios foram verificadas durante toda a vida útil dos produtos (10^5 a 10^9 UFC/g), portanto a utilização de um meio de cultura seletivo para *Salmonella* spp. (XLD) foi pertinente, para quantificação apenas de colônias características presentes no inóculo puro.

Finalmente, verificou-se o crescimento de fungos filamentosos e leveduras nas fatias durante o armazenamento, sobretudo a 25 °C. O crescimento de fungos filamentosos foi facilmente perceptível visualmente e a presença de leveduras nos produtos cárneos foi constatada por meio de coloração Gram e identificação de morfologia característica em microscópio, após ter sido verificado crescimento de colônias em meio PCA. Possivelmente, a presença de tais micro-organismos foi proveniente de contaminação ambiental, visto que eles podem estar presentes no ambiente e serem dispersos pelo ar.

5.7. Aplicação do óleo essencial por imersão das fatias

Neste estudo avaliou-se a aplicação do óleo essencial, simulando-se o que ocorreria em um sistema de embalagem ativa, ou seja, aplicando-o externamente ao produto. Outra maneira de aplicar o óleo essencial em produtos cárneos a serem fatiados, seria durante a etapa de mistura de ingredientes, no processo industrial para obtenção dos produtos. Testes complementares realizados neste estudo mostraram que resultados satisfatórios de atividade antimicrobiana foram obtidos ao realizar-se a imersão das fatias em emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*, 0,08 % (v/m) por 1 min, antes de inoculá-las com cultura de *S. Enteritidis*.

A representação gráfica dos resultados obtidos por meio do teste descrito é apresentada na Figura 24, em que a concentração de *S. Enteritidis* (log UFC/g) é expressa em função do tempo (h).

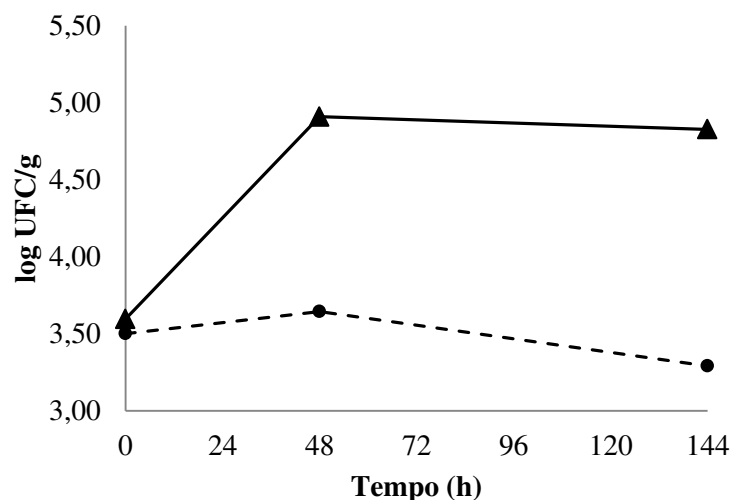


Figura 24- Crescimento de *S. Enteritidis* nas fatias do produto A imersas em óleo essencial de *T. vulgaris*, armazenadas a 10 °C. (▲) dados experimentais de produtos não revestidos; (●) dados experimentais de produtos revestidos com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* (0,08 % v/m).

Pode-se perceber que houve redução da concentração de *S. Enteritidis* nas fatias do Produto A imersas em óleo essencial de *T. vulgaris*, nos primeiros 5 dias (72 h) de armazenamento. O contato direto do óleo essencial com o micro-organismo parece inibir o mesmo, durante vida útil do produto fatiado armazenado a 10 °C. Se o óleo fosse adicionado como um dos ingredientes e misturado durante o processamento, supõe-se que ocorreria o contato direto entre o óleo e qualquer micro-organismo contaminante, durante o fatiamento e vida útil dos produtos fatiados, levando a uma maior inibição microbiana. Porém, a viabilidade tecnológica desta aplicação deve ainda ser investigada.

6. Conclusões

Neste estudo o óleo essencial de *T. vulgaris* foi o mais ativo contra *S. Enteritidis*, dentre os quatro óleos essenciais testados *in vitro*. A atividade antimicrobiana de óleos essenciais deve ser cuidadosamente avaliada *in vitro* previamente a qualquer aplicação em alimentos, já que o potencial antimicrobiano destes é determinado pela sua composição.

Além disso, ainda que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tenha sido comprovada *in vitro*, a sua aplicação tecnológica na indústria de alimentos é justificada desde que não acarrete em alterações sensoriais desagradáveis. Os produtos cárneos de peito de peru revestidos com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* foram tão bem aceitos quanto os produtos sem nenhum tratamento durante a análise sensorial conduzida com consumidores, o que demonstrou que este estudo foi viável do ponto de vista sensorial.

De forma geral, os resultados obtidos neste trabalho reforçam a necessidade da implantação de procedimentos de limpeza e desinfecção eficientes na indústria de produtos cárneos e no varejo, devido à capacidade de sobrevivência de micro-organismos patogênicos em superfícies e equipamentos. Estes micro-organismos, quando presentes em superfícies, podem ser transferidos a produtos não contaminados durante as etapas do processamento, como foi verificado nos ensaios de contaminação cruzada de produtos cárneos à base de peito de peru durante o fatiamento.

O estudo do comportamento de *S. Enteritidis* durante o armazenamento indicou que a temperatura pode favorecer a sua prevalência e crescimento durante a vida útil de produtos cárneos fatiados armazenados em ambientes domésticos e em estabelecimentos comerciais ou industriais, expondo os consumidores a riscos microbiológicos.

Além da influência da temperatura, observou-se que a composição e o tratamento com emulsão de óleo essencial de *T. vulgaris* influenciaram no comportamento do patógeno durante o armazenamento dos produtos cárneos fatiados. O tratamento com emulsão de óleo essencial levou a reduções significativas dos níveis de *S. Enteritidis* em produto cárneo fatiado armazenado a baixa temperatura e, menores níveis de transferência do patógeno durante o fatiamento de produtos revestidos foram quantificados.

No entanto, constatou-se que o óleo essencial de *T. vulgaris* não deve ser aplicado isoladamente para garantir a segurança microbiológica de produtos cárneos à base de peito de peru em sistemas de embalagem ativa como o simulado neste trabalho. Sendo assim, estudos devem ser conduzidos para avaliar a utilização de barreiras que atuem sinergisticamente com os óleos essenciais, como a temperatura ou tecnologias emergentes que controlem o crescimento microbiano em produtos cárneos, sem afetar negativamente suas características sensoriais.

Uma alternativa de aplicação do óleo essencial de *T. vulgaris* como antimicrobiano seria incluí-lo como aditivo durante o processo de obtenção de produtos cárneos a base de peito peru, promovendo o contato direto do mesmo com micro-organismos em situações de risco de contaminação, como o fatiamento. A viabilidade tecnológica e sensorial desta aplicação deve ainda ser investigada.

Finalmente, a obtenção e validação de modelos matemáticos que descrevem o comportamento microbiano durante toda vida útil de alimentos, incluindo as etapas de processamento destes, como os modelos Weibull e de Baranyi e Roberts, e a inserção destes nas AQRM são fundamentais para reduzir o risco de exposição dos consumidores a micro-organismos patogênicos.

7. Referências Bibliográficas

AARNISALO, K. et al. Modelling transfer of *Listeria monocytogenes* during slicing of “gravad” salmon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, p. 69–78, 2007.

ABADIAS, M. et al. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, n. 1-2, p. 121–9, 31 mar. 2008.

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allures Publishing Corporation, 2007.

AKBAR, A.; ANAL, A. K. Isolation of *Salmonella* from ready-to-eat poultry meat and evaluation of its survival at low temperature, microwaving and simulated gastric fluids. **Journal of Food Science and Technology**, 9 abr. 2014.

AKIN-OSANAIYE, B. C.; AGBAJI, A. S.; DAKARE, M. A. Antimicrobial activity of oils and extracts of *Cymbopogon citratus* (Lemon grass), *Eucalyptus citriodora* and *Eucalyptus camaldulensis*. **Journal of Medical Sciences**, v. 7, n. 4, p. 694–697, 2007.

ALBERT, I.; MAFART, P. A modified Weibull model for bacterial inactivation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1-3, p. 197–211, 15 abr. 2005.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3-4, p. 277–294, nov. 1994.

BARBOSA, L. N. et al. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. **Foodborne pathogens and disease**, v. 6, n. 6, p. 725–8, 17 jan. 2009.

BASU, S. The transitional dynamics of caloric ecosystems: changes in the food supply around the world. **Critical Public Health**, p. 1–17, 27 jun. 2014.

BITENCOURT, R. G. et al. Antimicrobial and aromatic edible coating on fresh-cut pineapple preservation. **Ciência Rural**, v. 44, n. 6, p. 1119–1125, jun. 2014.

BORGES, A. M. et al. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 4, p. 656–665, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jan. 2001. 51 p.

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, mar. 2003.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–53, 1 ago. 2004.

CAMILLOTO, G. P. et al. Preservation of sliced ham through triclosan active film. **Packaging Technology and Science**, v. 22, n. 8, p. 471–477, dez. 2009.

CAMPBELL, M.; HOWLETT, K.; EL AKKAD, O. **Maple leaf eyes meat slicers in outbreak**. Disponível em: <<http://www.theglobeandmail.com/news/national/maple-leaf-eyes-meat-slicers-in-outbreak/article1060898/>>. Acesso em: 3 fev. 2015.

CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N.; FLORES, S. K. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 849–875, 22 set. 2010.

CAMPOS, J. et al. Microbiological quality of ready-to-eat salads: an underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 3, p. 464–70, 16 set. 2013.

CARRASCO, E.; MORALES-RUEDA, A.; GARCÍA-GIMENO, R. M. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 545–556, 2012.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Current outbreak list**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/outbreaks/index.html>>. Acesso em: 2 fev. 2015

CHAITIEMWONG, N. et al. Quantification of transfer of *Listeria monocytogenes* between cooked ham and slicing machine surfaces. **Food Control**, v. 44, p. 177-184, 2014.

CHEN, D.; ZHAO, T.; DOYLE, M. Transfer of foodborne pathogens during mechanical slicing and their inactivation by levulinic acid-based sanitizer on slicers. **Food microbiology**, v. 38, p. 263–269, 2014.

CHEYNIER, V. et al. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant physiology and biochemistry: PPB/Société française de physiologie végétale**, v. 72, p. 1–20, nov. 2013.

CLSI. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**. 6ª. edição, M7-A6, 23(2), 2005.

COMBASE. **Combase database**. Disponível em www.combase.cc. Acesso em: 10 nov. 2014.

CPMA. Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas. Disponível em http://webdrm.cpqba.unicamp.br/cpma/banco_de_dados/. Acesso em: 09 fev 2015.

DE CÉSARE, A. et al. Survival and persistence of *Campylobacter* and *Salmonella* species under various organic loads on food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, 66, 1587–1594, 2013.

DE SOUZA SANT'ANA, A. Introduction to the Special Issue: *Salmonella* in foods: Evolution, strategies and challenges. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 451–454, mar. 2012.

DUAN, J.; CHERIAN, G.; ZHAO, Y. Quality enhancement in fresh and frozen lingcod (*Ophiodon elongatus*) fillets by employment of fish oil incorporated chitosan coatings. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 524–532, 15 mar. 2010.

DUARTE, M. C. T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197–201, 4 maio 2007.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305–11, 28 fev. 2005.

DUARTE, M. C. T. et al. Antimicrobial activity and action mechanisms of essential oils. In: **Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects**. [s.l.] Nova Science Publishers, Inc., p. 173–199, 2012.

EMBRAPA. **Análise sensorial de carnes: conceitos e recomendações**. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br/sites/default/files/principal/publicacao/Comunicado79.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2015.

ESPANHA. Comissão Europeia. Regulamento (CE) 1441/2007 de 05 de dezembro de 2007. Regulamento técnico que estabelece os critérios microbiológicos aplicáveis aos produtos alimentícios. **Diário Oficial da União Europeia**. 05 dez. 2007. 18 p.

FACHINELLO, J. P.; CASARIL, K. B. P. B. Evaluation of microbiological quality of sliced hams, marketed in the municipality Francisco Beltrão, Paraná. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 24, n. 3, p. 314, 2013.

FAI, A. E. C. et al. *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 2, p. 657–662, fev. 2011.

FDA. Food and Drug Administration Factors that Influence Microbial Growth. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. s2, p. 21–32, abr. 2003.

FDA. Food and Drug Administration. **Outbreaks Associated with Fresh and Fresh-Cut Produce.** Estudos Unidos, 2013. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/safepracticesforfoodprocesses/ucm091265.htm>. Acesso em 15 ago. 2014.

FOLEY, S. L. et al. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4273–4279, 2011.

FRANCIS, G. A. et al. Factors affecting quality and safety of fresh-cut produce. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 7, p. 595–610, jan. 2012.

GEERAERD, A. H.; VALDRAMIDIS, V. P.; VAN IMPE, J. F. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 95–105, 25 jun. 2005.

GIBRIEL, A. Y. et al. Synergistic antibacterial activity of irradiated and nonirradiated cumin, thyme and rosemary essential oils. **Journal of Food Safety**, v. 33, n. 2, p. 222–228, 22 maio 2013.

GIBSON, K. E. et al. Observation and relative quantification of cross-contamination within a mock retail delicatessen environment. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 116–124, maio 2013.

GOSWAMI, N.; HAN, J. H.; HOLLEY, R. A. Effectiveness of antimicrobial starch coating containing thyme oil against *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, and *Pseudomonas* on chicken breast meat. **Food Science and Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 425–431, 2009.

GOVARIS, A. et al. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2-3, p. 175–80, 28 fev. 2010.

HAN, J. H. et al. Microbial inhibition in mozzarella cheese using rosemary and thyme oils in combination with sodium diacetate. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 75–84, 28 fev. 2015.

HYGREEVA, D.; PANDEY, M. C.; RADHAKRISHNA, K. Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products. **Meat Science**, v. 98, n. 1, p. 47–57, set. 2014.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. January, p. 1–24, 2012.

HYUN, J.-E. et al. Preservative effectiveness of essential oils in vapor phase combined with modified atmosphere packaging against spoilage bacteria on fresh cabbage. **Food Control**, v. 51, p. 307–313, maio 2015.

IMEN, B. S. et al. *Salmonella enterica* isolated from food, environment, animal, and human: Trends and consequences for public health. In: **Salmonella: Classification, Genetics and Disease Outbreaks**. [s.l.] Nova Science Publishers, Inc., 2012. p. 193–208.

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

JAYASENA, D. D.; JO, C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 34, n. 2, p. 96–108, dez. 2013.

JAYASENA, D. D.; JO, C. Potential application of essential oils as natural antioxidants in meat and meat products: A Review. **Food Reviews International**, v. 30, n. 1, p. 71–90, 2 jan. 2014.

JUCK, G.; NEETOO, H.; CHEN, H. Application of an active alginate coating to control the growth of *Listeria monocytogenes* on poached and deli turkey products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 3, p. 302–8, 1 set. 2010.

JUNEJA, V. K. Thermal inactivation of *Salmonella* spp. in ground chicken breast or thigh meat. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42, n. 12, p. 1443–1448, 18 jun. 2007.

KARABAGIAS, I.; BADEKA, A.; KONTOMINAS, M. G. Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. **Meat science**, v. 88, n. 1, p. 109–16, maio 2011.

KOSTAKI, M. et al. Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. **Food microbiology**, v. 26, n. 5, p. 475–482, ago. 2009.

KRAMARENKO, T. et al. The prevalence and serovar diversity of *Salmonella* in various food products in Estonia. **Food Control**, v. 42, p. 43–47, ago. 2014.

KRTINIĆ, G.; DURIC, P.; ILIĆ, S. *Salmonellae* in food stuffs of plant origin and their implications on human health. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 11, p. 1321–5, nov. 2010.

LANDRY, K. S. et al. Effectiveness of a novel spontaneous carvacrol nanoemulsion against *Salmonella enterica* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 on contaminated mung bean and alfalfa seeds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 187, p. 15–21, 18 set. 2014.

LEANDRO, T. et al. A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. **MESC**, v. 93, n. 3, p. 645–651, 2013.

LEE, K.-M. et al. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. **Food Control**, v. 47, p. 264–276, jan. 2015.

LIANG, R. R. et al. **Application of Gelatin-Based Antimicrobial Edible Coatings on the Preservation of Chicken Meat and Prepared Products**. Advanced Materials Research. **Anais...** 6 jul. 2011. Disponível em: <<http://www.scientific.net/AMR.236-238.2255>>. Acesso em: 9 dez. 2014.

LIN, C. M. et al. Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 1, p. 71–79, 2006.

MARTINS, P. M. **Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de capim-limão**. 2000. (Dissertação de mestrado). Departamento de Engenharia Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

MCKEE, L. Microbiological and sensory properties of fresh and frozen poultry. In: (Ed.). **Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality**, p.373-389, 2012.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial Estudos com Consumidores**. 3 ed., Viçosa: Editora UFV, 2013. 332 p.

MORAES, C. S. S. et al. Characterization and quality control of *Ocimum gratissimum* L. leaf powder and development of a standardized ethanolic extract. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, p. 3256–3258, 2011.

MURIEL-GALET, V. et al. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, v. 157, n. 7, p. 195–201, jul. 2010.

MURIEL-GALET, V. et al. Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 195–201, 2 jul. 2012.

NØRRUNG, B.; BUNCIC, S. Microbial safety of meat in the European Union. **Meat science**, v. 78, n. 1-2, p. 14–24, jan. 2008.

OLIVEIRA, L. DE. **Efeito inibitório dos óleos essenciais de alfavacão e cravo da índia e do suco de limão frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de carcaças de ovinos**. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/NCAP-8N6NDS/larissa_de_oliveira.pdf?sequence=1>. Acesso em: 27 nov. 2014.

OTONI, C. G. et al. Edible films from methylcellulose and nanoemulsions of clove bud (*Syzygium aromaticum*) and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils as shelf life extenders for sliced bread. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 22, p. 5214–9, 4 jun. 2014.

PELEG, M.. Isothermal microbial heat inactivation. **Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems**. Boca Raton, USA: CRC Press, 1–48, 2006.

PÉREZ-CHABELA, M. D. L. **Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd., 2012. p. 410–422

PÉREZ-RODRÍGUEZ, F. et al. Evaluation of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. **Meat science**, v. 86, n. 2, p. 479–85, out. 2010.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, F. et al. Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during slicing of a cooked meat product. **Meat science**, v. 76, n. 4, p. 692–9, ago. 2007.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, F. et al. Modelling survival kinetics of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel surfaces soiled with different substrates under static conditions of temperature and relative humidity. **Food microbiology**, v. 33, n. 2, p. 197–204, abr. 2013.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; VALERO, A. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, 131-144, 2008.

PIRES, A. C. DOS S. et al. Condições higiênicas de fatiadores de frios avaliadas por ATP-bioluminescência e contagem microbiana: sugestão de higienização conforme RDC 275 da ANVISA. **Alim. Nutr.**, v. 16, n. 2, p. 123–129, 2005.

POSADA-IZQUIERDO, G. D.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; ZURERA, G. Mathematical quantification of microbial inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on stainless steel surfaces soiled with different vegetable juice substrates. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1688–1698, dez. 2013.

RAO, B. R. R. et al. Chemical profiles of primary and secondary essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *motia* Burk.). **Industrial Crops and Products**, v. 21, n. 1, p. 121–127, jan. 2005.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Potential of coriander (*Coriandrum sativum*) oil as a natural antimicrobial compound in controlling *Campylobacter jejuni* in raw meat. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 31–5, jan. 2010.

RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; MOSQUEDA-MELGAR, J.; MARTÍN-BELLOSO, O. Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 3, p. 313–27, 10 fev. 2008.

ROCHA, B. C. A. DA. **Extração e Caracterização de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*. L).** 2012. (Dissertação de mestrado). Instituto de Tecnologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

RODRIGUEZ-CATURLA, M. Y. et al. Effect of pre-incubation conditions on growth and survival of *Staphylococcus aureus* in sliced cooked chicken breast. **Meat science**, v. 92, n. 4, p. 409–16, dez. 2012.

ROTA, M. C. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v. 19, n. 7, p. 681–687, jul. 2008.

SAGDIC, O.; OZTURK, I.; TORNUK, F. Inactivation of non-toxigenic and toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 inoculated on minimally processed tomatoes and cucumbers: Utilization of hydrosols of Lamiaceae spices as natural food sanitizers. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 7–14, mar. 2013.

SALLAM, K. I. et al. Prevalence, molecular identification and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* serovars isolated from retail beef products in Mansoura, Egypt. **Food Control**, v. 38, n. 1, p. 209–214, abr. 2014.

SÁNCHEZ-ORTEGA, I. et al. Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 248935, jan. 2014.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275–280, 2004.

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

SERIO, J. et al. Avaliação microbiológica e microscópica de presuntos fatiados refrigerados. **Alim. Nutr.**, v. 20, n. 1, p. 135–139, 2009.

SHEEN, S.; HWANG, C. Modeling transfer of *Listeria monocytogenes* from slicer to deli meat during mechanical slicing. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 5, n. 2, 2008.

SHEN, S.; FANG, F. C. Integrated stress responses in *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 75–81, 16 jan. 2012.

SILVA, S. M. et al. Essential oils from different plant parts of *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. (Myrtaceae) as a source of 1,8-cineole and their bioactivities. **Pharmaceuticals**, v. 4, n. 12, p. 1535–1550, 25 nov. 2011.

SMITH, D. P. Effect of an acid antimicrobial on turkey breast meat *Salmonella* and total aerobes. **International Journal of Poultry Science**, v. 11, n. 11, p. 673–676, 2012.

SOARES, V. M. et al. Transfer of *Salmonella* Enteritidis to four types of surfaces after cleaning procedures and cross-contamination to tomatoes. **Food Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 453–6, jun. 2012.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136–41, abr. 2012.

SORIANO-SANTOS, J. Chemical composition and nutritional content of raw poultry meat. In: (Ed.). **Handbook of Poultry Science and Technology**, v.1, p.467-489, 2010.

SPECTOR, M. P.; KENYON, W. J. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 455–481, mar. 2012.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S.-D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572–585, jun. 2013.

TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 587–595, maio 2013.

VORST, K. L.; TODD, E. C. D.; RYSER, E. T. Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of turkey breast, bologna, and salami. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 3, p. 619–696, 2006.

WANG, H. et al. Comparison of microbial transfer rates from *Salmonella* spp. biofilm growth on stainless steel to selected processed and raw meat. **Food Control**, v. 50, p. 574–580, abr. 2015.

WANG, Y. et al. Enumeration and characterization of *Salmonella* isolates from retail chicken carcasses in Beijing, China. **Foodborne pathogens and disease**, v. 11, n. 2, p. 126–32, fev. 2014a.

WANG, Z. H. et al. Secular trends in meat and seafood consumption patterns among Chinese adults, 1991-2011. **European journal of clinical nutrition**, 29 out. 2014b.

WESCHE, A. M.; RYSER, E. T. Stress adaptation, survival and recovery of foodborne pathogens. In: Labbé, R. G.; García. S. (Eds). **Guide to Foodborne Pathogens**. 2 Ed., Oxford: John Wiley & Sons, 2013. p. 422 - 437.

WHO. World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/topics/salmonella/en/>. Acesso em 25 jan. 2015.

WILLIAMS, R. C. et al. Illness outbreak associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Genoa salami. **CMAJ**, v. 162, n. 10, p. 1409–1413, 2000.

ZANELLO, P. P. et al. Antimicrobial activity of poultry bone and meat trimmings hydrolyzates in low-sodium turkey food. **Food & function**, v. 5, n. 2, p. 220–8, 29 fev. 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A- Fichas utilizadas em análise sensorial

FORMULARIO DE LA PRUEBA TRIANGULAR	
NOMBRE Y APELLIDOS:	
FECHA:	
PRODUCTO A EXAMINAR:	
Instrucciones: Probar las muestras de izquierda a derecha: dos muestras son iguales y una es diferente. Escribir el número de la muestra que difiere de las otras. Si no está seguro, haga una propuesta. Puede indicar en comentarios que se trata de una suposición.	
CLAVE DE LAS MUESTRAS	CLAVE MUESTRA DISTINTA
a) _____ b) _____ c) _____ d) _____	_____ _____ _____ _____
COMENTARIOS	
¡MUCHAS GRACIAS!	

Figura 25- Ficha utilizada para o teste triangular.

FORMULARIO DE LA PRUEBA DE ORDENACIÓN			
Nombre: _____ Fecha (día/mes/año) _____ Por favor, pruebe las 4 muestras presentadas de izquierda a derecha. Puede probarlas varias veces. Escriba en la casilla correspondiente los códigos de las muestras en orden CRECIENTE de sabor de aceite esencial de tomillo			
MENOS SABOR		MÁS SABOR	
Comentarios: _____ _____ _____ _____			
¡MUCHAS GRACIAS!			

Figura 26- Ficha utilizada para o teste de ordenação.

CATA DE CONSUMIDORES	
Estamos haciendo un trabajo de investigación, en donde proponemos el uso de un aceite esencial sobre productos carnicos cocidos de pechuga de pavo para aumentar su vida comercial. Estamos interesados en saber el grado de aceptación de la propuesta en los consumidores; para ello, te presentamos dos grupos de 3 muestras, y una escala que va del muy desagradable a muy agradable. Por favor marcar con una X la informacion solicitada. El procedimiento mas adecuado para realizar la cata es probar una muestra, valorar y luego pasar a la siguiente muestra, sin importar el orden. Muchas gracias Sexo: ☐ masculino ó ☐ femenino. Edad: ☐ 15-19, ☐ 20-24, ☐ 25- 29, ☐ 30-40, ☐ 41-50 años. Consumo de pechuga de pavo: ☐ nunca, ☐ alguna vez, ☐ frecuente, ☐ siempre. ¿Tienes hambre? ☐ si ó ☐ no.	
Muestras del Grupo 1	
Muestra 957	muy desagradable muy agradable
Muestra 360	muy desagradable muy agradable
Muestra 734	muy desagradable muy agradable
Muestras del Grupo 2	
Muestra 059	muy desagradable muy agradable
Muestra 251	muy desagradable muy agradable
Muestra 648	muy desagradable muy agradable

Figura 27- Ficha utilizada para a análise sensorial.

APÊNDICE B- Composição química dos óleos essenciais estudados

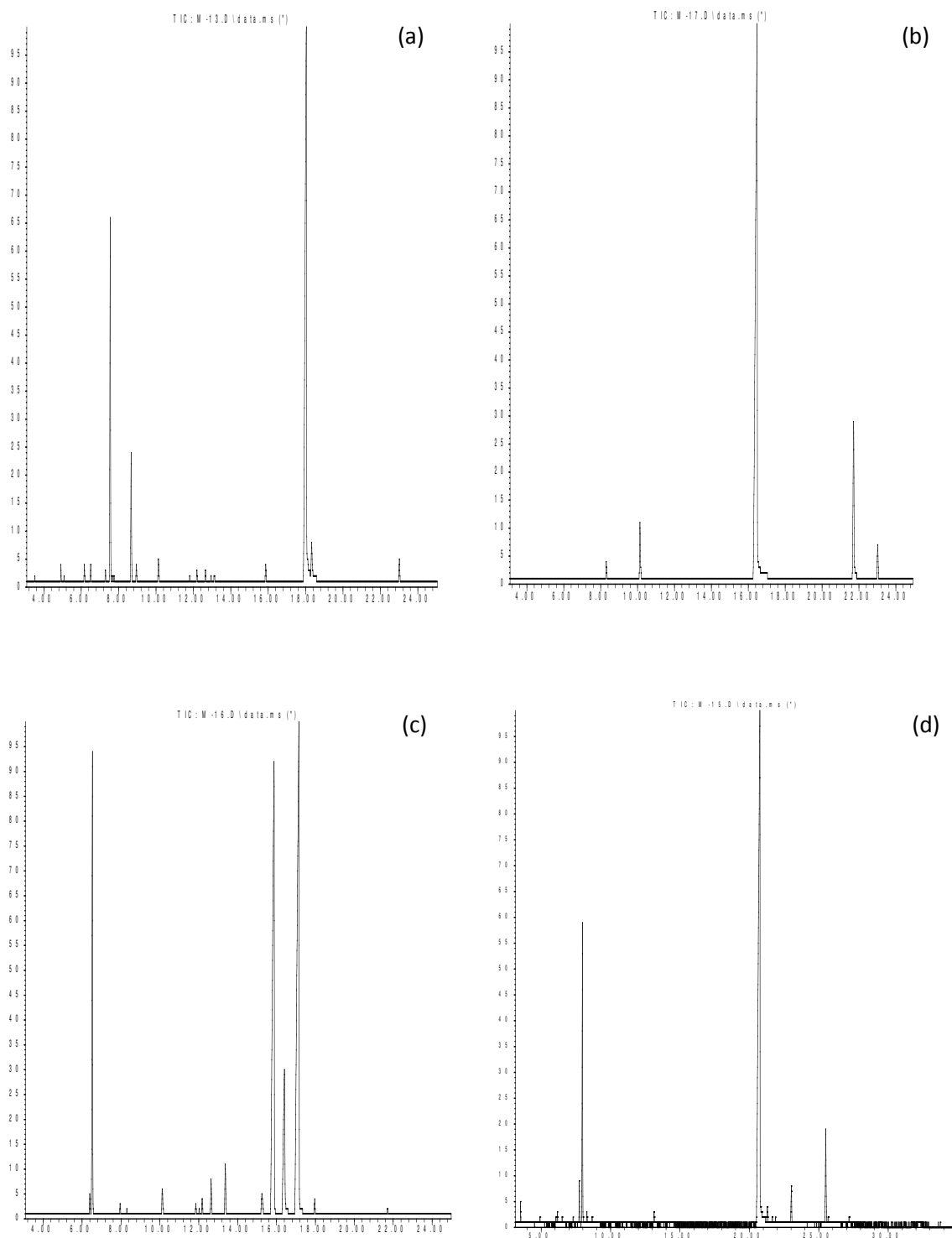
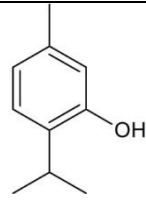
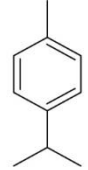
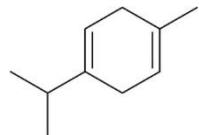
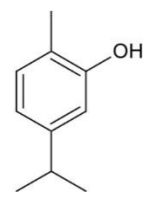
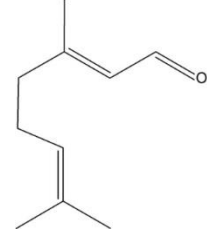
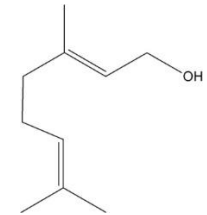
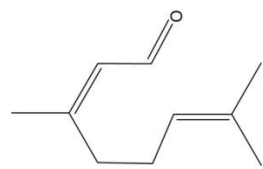
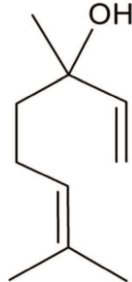
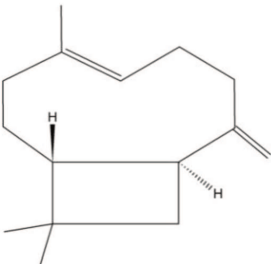
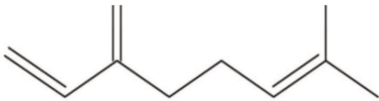
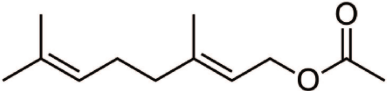
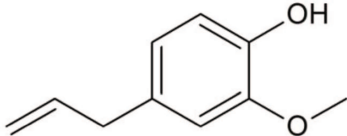
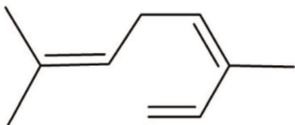
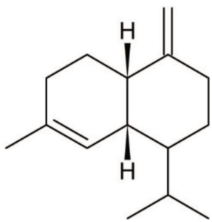


Figura 28- Cromatogramas obtidos por CG para os óleos essenciais extraídos das plantas em estudo. (a) *T. vulgaris*; (b) *C. martinii*; (c) *C. citratus*; (d) *O. gratissimum*.

Tabela 16- Principais compostos presentes nos óleos essenciais das plantas aromáticas utilizadas no estudo.

Composto	Classe	Planta aromática	Estrutura Molecular
timol	terpenoides	<i>T. vulgaris</i> <i>O. gratissimum</i>	
p-cimeno	terpenos	<i>T. vulgaris</i>	
γ-terpineno	terpenos	<i>T. vulgaris</i>	
carvacrol	terpenoides	<i>T. vulgaris</i>	
geranial	terpenoides	<i>C. citratus</i>	
geraniol	terpenoides	<i>C. martinii</i> <i>C. citratus</i>	
neral	terpenoides	<i>C. citratus</i>	

linalol	terpenoides	<i>C. martinii</i>	
cariofileno	terpenos	<i>C. martinii</i> <i>O. gratissimum</i>	
mirreno	terpenos	<i>C. citratus</i>	
acetato de geranila	terpenoides	<i>C. martinii</i>	
eugenol	fenilpropanoides	<i>O. gratissimum</i>	
ocimeno	terpenos	<i>O. gratissimum</i>	
γ -muroleno	terpenos	<i>O. gratissimum</i>	

APÊNDICE C- Parâmetros estatísticos de ajuste dos modelos pelo software GIna FiT®

Tabela 17- Parâmetros estatísticos de ajuste dos modelos de transferência por contaminação cruzada.

Modelo	Índice de ajuste	Produto A		Produto B	
		Com revestimento	Sem revestimento	Com revestimento	Sem revestimento
Log-linear	R ²	0,79	0,84	0,68	0,90
	MSE	0,08	0,10	0,10	0,05
Log-linear + cauda	R ²	0,83	0,92	0,68	0,91
	MSE	0,07	0,06	0,10	0,04
Weibull	R ²	0,81	0,87	0,69	0,90
	MSE	0,08	0,09	0,10	0,05
Weibull + cauda	R ²	0,87	0,93	0,69	0,92
	MSE	0,06	0,05	0,10	0,04

APÊNDICE D- Legislações vigentes para produtos cárneos

Tabela 18- Regulamento técnico sobre o padrão microbiológico de produtos cárneos, de acordo com RDC nº 12, da ANVISA (BRASIL).

Grupo de Alimentos	Micro-organismo	Tolerância para a amostra indicativa	Tolerância para amostra representativa			
			n	c	m	M
Produtos cárneos cozidos ou não, embutidos ou não (mortadela, salsicha, presunto, fiambre, morcela e outros)	Coliformes a 45 °C/g	10 ³	5	2	10 ²	10 ³
	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	3 x 10 ³	5	1	10 ²	3 x 10 ³
	Clostrídios sulfito redutores (UFC/g)	5 x 10 ²	5	1	10 ²	5 x 10 ²
	<i>Salmonella</i> sp./25g	Ausência	5	0	Ausência	-
Produtos cárneos cozidos ou não, maturados ou não, fracionados ou fatiados, mantidos sob-refrigeração	Coliformes a 45 °C/g	10 ⁵	5	2	10 ²	10 ³
	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	5 x 10 ³	5	1	10 ³	5 x 10 ³
	Clostrídios sulfito redutores (UFC/g)	5 x 10 ²	5	1	10 ²	5 x 10 ²
	<i>Salmonella</i> sp./25g	Ausência	5	0	Ausência	-

n= é o número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente; c= é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M; m= é o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável; M= é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis.

Tabela 19- Padrão microbiológico de produtos cárneos, de acordo com Regulamento 1441/2007 (ESPANHA).

Categoria de alimentos	Micro-organismo	Plano de amostragem		Limites		Método analítico de referência	Fase em que se aplica o critério
		N	C	m	M		
Produtos cárneos feitos à base de carne de aves, destinados a serem consumidos cozidos	<i>Salmonella</i> sp.	5	0	Ausência em 25 g		EN/ISO 6579	Produtos comercializados durante sua vida útil

n= é o número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente; c= é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M; m= é o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável; M= é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis.