



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JOYCE DE ALMEIDA CARMINATI

**USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMBINADOS AO PROCESSAMENTO POR
ALTA PRESSÃO EM CARNE DE PEITO DE FRANGO**

**USE OF ESSENTIAL OILS AND HIGH PRESSURE PROCESSING APPLIED TO
CHICKEN BREAST MEAT**

CAMPINAS

2022

JOYCE DE ALMEIDA CARMINATI

**USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMBINADOS AO PROCESSAMENTO POR
ALTA PRESSÃO EM CARNE DE PEITO DE FRANGO**

**USE OF ESSENTIAL OILS AND HIGH PRESSURE PROCESSING APPLIED TO
CHICKEN BREAST MEAT**

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

Thesis presented to the Faculty of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Food Science.

Supervisor/ Orientador: Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Cristianini

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL TESE
DEFENDIDA PELA JOYCE DE
ALMEIDA CARMINATI, E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
MARTA CRISTINA TEIXEIRA
DUARTE

CAMPINAS
2022

FICHA CATALOGRAFICA

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

C212u Carminati, Joyce de Almeida, 1991-
Uso de óleos essenciais combinados ao processamento por alta pressão em carne de peito de frango / Joyce de Almeida Carminati. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Marta Cristina Teixeira Duarte.
Coorientador: Marcelo Cristianini.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Conservantes naturais. 2. Processos não-térmicos. 3. Peito de frango. 4. *Listeria innocua*. 5. *Pseudomonas aeruginosa*. I. Duarte, Marta Cristina Teixeira. II. Cristianini, Marcelo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Use of essential oils combined with high pressure processing in chicken breast meat

Palavras-chave em inglês:

Natural preservatives

Non-thermal processes

Chicken breast

Listeria innocua

Pseudomonas aeruginosa

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Marta Cristina Teixeira Duarte [Orientador]

Dirce Yorika Kabuki

Alline Artigiani Lima Tribst

Marco Antonio Trindade

Renata Bromberg

Data de defesa: 06-12-2022

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-1771-4777>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/040565724184514>

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA)
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP.

Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki

Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA)
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP.

Dra. Alline Artigiani Lima Tribst

Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP.

Prof. Dr. Marco Antonio Trindade

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA)
Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP

Dra. Renata Bromberg

Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, SP.

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertações/Teses e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação

DEDICATÓRIA

Aos meus pais João e Graça, por me permitirem realizar meus sonhos, e por vibrarem comigo cada vitória alcançada.

Ao meu amorzinho e grande alegria, meu sobrinho João Antônio.

A vocês dedico esta obra.

Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, mas capacita os escolhidos.

Fazer ou não fazer algo só depende da nossa vontade e perseverança (Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, agradeço pela dádiva da vida, por tudo que sou e tudo que tenho, por guiar meus passos nos melhores caminhos e pelo dom da sabedoria, imprescindível para que este trabalho fosse realizado.

Aos meus pais **João e Graça**, por me permitirem sonhar e voar, e não medirem esforços para verem meus sonhos realizados, por estarem sempre presentes me apoiando, aconselhando e celebrando cada vitória. A vocês minha eterna e profunda gratidão.

Ao meu irmão **Plínio**, pelo companheirismo, preocupação, por todas as risadas, descontrações e momentos que passamos e vamos passar juntos.

À minha cunhada **Patrícia** por todos os conselhos, apoio, amizade e por me proporcionar a grande alegria da minha vida, meu sobrinho e afilhado **João Antônio**.

À minha avó **Celina**, pessoa mais doce, amável, iluminada e abençoada que tive o prazer de conhecer. Dona de um coração enorme, puro e simples. Agradeço a Deus a benção de poder chamá-la de avó.

Aos meus avôs **Waldevino** (*in memoriam*) e **Ambrósio** (*in memoriam*) por todo amor e carinho dedicados a mim, por serem meus exemplos de simplicidade, humildade, garra e força. À vovó **Regina** (*in memoriam*) que cedo partiu do plano terrestre, mas sei que sempre está olhando por mim e me protegendo.

À **Adélia** pela amizade e orações.

Às minhas amigas de casa e de vida **Jéssica, Polieny e Thaís**, por me darem suporte em todos os momentos, bons e ruins, e fazer meus dias em Campinas mais felizes.

Às amigas **Ana e Débora**, literalmente grandes presentes que ganhei em Campinas e que levarei para vida. Obrigada pela amizade, companheirismo, ensinamentos, apoio e ajuda em todos os momentos que precisei.

Aos **amigos da Pós** pela amizade, aprendizagem, companheirismo e pelas trocas de conhecimentos úteis e informações aleatórias, rs.

À minha orientadora **Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte** pelos ensinamentos diários, pela paciência, amizade e por tornar tudo isso possível.

A técnica **Camila Delarmelina** pelo companheirismo, ajuda no laboratório e pelo café de cada dia, afinal acabou o café acabou o expediente, rs.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Cristianini** pela colaboração, sugestões e ensinamentos.

Ao técnico **Fabiano Cruz** pela colaboração na realização dos ensaios de API.

Aos **membros da banca** pelas sugestões, colaborações e disponibilidade.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

A **Unicamp** pelo financiamento do projeto por meio do auxílio Faepex, convênio 34/20.

E àqueles que não foram mencionados, mas que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

RESUMO

A carne de frango e seus produtos são altamente propensos a contaminação microbiana, devido à alta concentração de nutrientes, pH e atividade de água que favorecem a presença de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, acarretando problemas econômicos e de saúde pública. Por outro lado, há uma alta demanda dos consumidores por produtos de fácil preparo e rápidos para o consumo, que sejam livres de conservantes sintéticos. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a sobrevivência de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388 e *Listeria innocua* ATCC 33090 em carne de peito de frango adicionada de uma blenda de óleos essenciais (BOE) de *Thymus vulgaris* e *Ocimum gratissimum* (1:3), combinada a Alta Pressão Isostática. Foram inicialmente determinadas as concentrações mínima inibitória (MIC) e bactericida mínima (MBC) da BOE contra os micro-organismos. A partir dos resultados de MIC e MBC foi avaliada a sobrevivência dos micro-organismos em carne de peito de frango adicionada da BOE (0,75 e 1,20 mg/g) e alta pressão isostática (500 e 600 MPa × 5min × 25 °C), isoladamente e em combinação, durante o armazenamento da carne em temperatura de refrigeração (3 °C). Para *L. innocua*, a BOE apresentou MIC de 0,31 mg.mL⁻¹ e MBC de 1,25 mg.mL⁻¹, enquanto para *P. aeruginosa* a MIC e MBC foram de 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹, respectivamente. Quando a BOE foi adicionada nas concentrações de 0,75 mg/g e 1,20 mg/g de carne, houve uma diminuição gradativa do número de células viáveis de *L. innocua* após 42 dias, de 0,89 log UFC/g e 1,16 log UFC/g de carne, respectivamente, em relação a concentração inicial do inóculo. Por outro lado, no ensaio controle (sem adição da BOE) ocorreu um aumento do número de células viáveis de 1,07 log UFC/g de carne, após 42 dias. Para *P. aeruginosa*, os resultados mostraram que houve diferença significativa entre a amostra controle e com 0,75 mg/g da BOE a partir do 7º. dia até o 36º. dia de ensaio. Quando 1,20 mg/g da BOE foi empregada, apenas no tempo inicial não houve diferença significativa entre a amostra controle e a adicionada da BOE, e quando utilizada esta concentração ocorreu uma redução de 0,74 log UFC/g de *P. aeruginosa* na carne. Posteriormente, quando empregado o processamento por alta pressão, todas as amostras apresentaram contagem microbiana abaixo do limite de detecção do método, sendo que, para controle de ambos os micro-organismos, o tratamento mais eficiente foi aquele onde 1,20 mg/g da BOE e 600 MPa × 5min × 25 °C foram empregados. Nessas condições, foi possível manter o número de células

abaixo do limite de detecção do método até 36 dias de estocagem. Os resultados demonstraram que o uso associado da BOE e alta pressão foi capaz de reduzir a população microbiana e estender a vida de prateleira da carne de peito de frango.

Palavras-chave: conservante natural, processamento não térmico, peito de frango, *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Chicken meat and its products are highly prone to microbial contamination, due to the high concentration of nutrients, pH, and water activity that favor the presence of spoilage and pathogenic microorganisms, causing economic and public health problems. On the other hand, there is high consumer demand for products that are easy to prepare and quick to consume, which are free from synthetic preservatives. Thus, this work aimed to evaluate the survival of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388 and *Listeria innocua* ATCC 33090 in chicken breast meat added with a blend of essential oils (BOE) of *Thymus vulgaris* and *Ocimum gratissimum* (1:3), combined with High Isostatic Pressure. The minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal (MBC) concentrations of BOE against the microorganisms were initially determined. From the results of MIC and MBC, the survival of microorganisms in chicken breast meat added with BOE (0,75 and 1,20 mg/g) and high isostatic pressure (500 and 600 MPa × 5min × 25 °C) was evaluated. alone and in combination, during meat storage at refrigerated temperature (3 °C). For *L. innocua*, BOE presented MIC of 0.31 mg/mL and MBC 1.25 mg/mL, while for *P. aeruginosa* the MIC and MBC were 2.5 and 5.0 mg/mL, respectively. When BOE was added at concentrations of 0,75 mg/g and 1,20 mg/g of meat, there was a gradual decrease in the number of viable *L. innocua* cells after 42 days, from 0.89 log CFU/g and 1.16 log CFU/ g of meat, respectively, in relation to the initial concentration of the inoculum. On the other hand, in the control assay (without the addition of BOE) there was an increase in the number of viable cells of 1.07 log CFU/g of meat after 42 days. For *P. aeruginosa*, the results showed a significant difference between the control sample and with 0,75 mg/g of BOE from the 7th. day to the 36th. rehearsal day. When 1,20 mg/g of BOE was used, only at the initial time there was no significant difference between the control sample and the one added with BOE, and when this concentration was used, there was a reduction of 0.74 log CFU/g of *P. aeruginosa* in the meat. Subsequently, when using high pressure processing, all samples showed microbial counts below the detection limit of the method, and, for the control of both microorganisms, the most efficient treatment was the one where 1,20 mg of BOE and 600 MPa × 5min × 25 °C were used. Under these conditions, it was possible to keep the number of cells below the detection limit of the method for up to 36 days of storage. The results showed that the combined use of

BOE and high pressure was able to reduce the microbial population and extend the shelf life of chicken breast meat.

Keywords: natural preservative, non-thermal processing, chicken breast, *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estruturas químicas dos principais compostos ativos presentes em óleos essenciais.....	32
Figura 2. <i>Thymus vulgaris</i>	33
Figura 3. <i>Ocimum gratissimum</i>	35
Figura 4. Amostras de carne de peito de frango adicionadas da BOE (0,75 e 1,20 mg/g) e amostra controle, acondicionadas em sacos plásticos Nylon Poli.....	46
Figura 5. Amostras de carne de peito de frango acondicionadas em sacos plásticos Nylon Poli adicionadas de 1,20 mg/g da BOE, após passar pelo processo de pressurização a 600 MPa x 5 min x 25 °C.	47
Figura 6. Curva de sobrevivência de <i>L. innocua</i> inoculada em carne de peito de frango com e sem adição da BOE, avaliados por 42 dias à 3 °C.....	52
Figura 7. Curva de sobrevivência de <i>P. aeruginosa</i> inoculada em carne de peito de frango, com e sem adição da BOE, avaliados por 42 dias à 3 °C.....	54
Figura 8. Curva de inativação e crescimento de <i>L. innocua</i> inoculada em carne de peito de frango com e sem adição da BOE e submetida ao processamento por alta pressão isostática (500 ou 600 MPa x 25 °C x 5 min), avaliados por 42 dias à 3°C.....	58
Figura 9. Curva de inativação e crescimento de <i>P. aeruginosa</i> inoculada em carne de peito de frango com e sem adição da BOE e submetida ao processamento por alta pressão isostática (500 ou 600 MPa x 25 °C x 5 min), avaliados por 42 dias à 3 °C....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. innocua</i>	29
Tabela 2. Especiarias e temperos utilizados comumente em carne de peito de frango marinado encontrado no mercado, e adicionado da BOE.	43
Tabela 3. Contagem de <i>L. innocua</i> (log UFC/g) em carne de peito de frango adicionado de 0,75 e 1,20 mg/g de BOE, avaliados por 42 dias à 3°C.....	53
Tabela 4. Contagem de <i>P. aeruginosa</i> (log UFC/g) em carne de peito de frango adicionado de 0,75 e 1,20 mg/g de BOE, avaliados por 42 dias à 3°C.....	55
Tabela 5. Contagem de <i>L. innocua</i> (log UFC/g) em carne de peito de frango aplicado tratamento de alta pressão com e sem adição de BOE, avaliados por 42 dias à 3°C...58	
Tabela 6. Contagem de <i>P. aeruginosa</i> em carne de peito de frango aplicado tratamento de alta pressão com e sem adição de BOE, avaliados por 42 dias à 3°C.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

API – Alta Pressão Isostática

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

BOE – Blenda de Óleos Essenciais

BPW – “Buffered Peptone Water” (água peptonada tamponada)

CTT – Cloreto de trifenil tetrazólio

DTA – Doença transmitida por alimentos

lag – Tempo de latência do crescimento microbiano

MBC – “Minimal Bactericidal Concentration” (concentração bactericida mínima)

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

NA – Nutriente Ágar

OE – Óleo Essencial

OLA – Oxford *Listeria* Ágar

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

UFC- Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	18
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Carne de frango	22
3.1.1 Carne de frango: histórico, produção e consumo no Brasil e no mundo	22
3.1.2 Características da carne de frango	23
3.1.3 Contaminantes presentes na carne de frango e medidas de controle	24
3.2 Gênero <i>Listeria</i>	27
3.2.1 Taxonomia e caracterização morfológica e bioquímica	27
3.2.2 Diferença entre <i>Listeria innocua</i> e <i>L. monocytogenes</i>	28
3.2.3 Resistência de <i>Listeria</i> a antimicrobianos	29
3.3 Gênero <i>Pseudomonas</i>	30
3.3.1 Taxonomia e a caracterização morfológica e bioquímica de <i>Pseudomonas</i>	30
3.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
3.4. Óleos essenciais como antimicrobianos naturais	31
3.4.1 <i>Thymus vulgaris</i>	33
3.4.2 <i>Ocimum gratissimum</i>	35
3.5. Alta Pressão Isostática (API)	36
3.5.1 Descrição e princípios básicos	36
3.5.2 Efeitos do processamento por alta pressão na cor e proteína da carne	36
3.5.3 Efeitos do processamento por alta pressão na inativação de <i>Listeria</i> e <i>Pseudomonas</i>	37
3.5.4 Efeitos da combinação do processamento por alta pressão e antimicrobianos naturais na inativação de <i>Listeria</i> e <i>Pseudomonas</i>	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Óleos essenciais e cepas utilizadas	41
4.2 Determinação da atividade antimicrobiana da BOE	41
4.2.1 Preparo de inóculo	41
4.2.2 Atividade antimicrobiana da BOE: determinação da MIC	42
4.2.3 Concentração Mínima Bactericida (MBC)	42
4.3 Avaliação da sobrevivência de <i>L. innocua</i> e <i>P. aeruginosa</i> em carne de peito de frango	43

4.3.1 Preparo da amostra de peito de frango e da emulsão da BOE.....	43
4.3.2 Preparo de inóculo para adição na carne de peito de frango	44
4.3.3. Condições de ensaio, inoculação das amostras, adição da blenda de óleos essenciais	45
4.3.4. Condições de ensaio e aplicação do processamento por alta pressão	46
4.3.5 Análise de <i>Listeria innocua</i> na carne de peito de frango	48
4.3.6 Análise de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na carne de peito de frango ...	48
4.5 Análise estatística.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima bactericida (MBC)	50
5.2 Efeitos da adição da BOE na carne de peito de frango e a sobrevivência de <i>L. innocua</i> e <i>P. aeruginosa</i>	51
5.3 Efeitos da combinação da adição da BOE e API na carne de peito de frango e a sobrevivência de <i>L. innocua</i> e <i>P. aeruginosa</i>	56
6. CONCLUSÃO.....	63
7. REFERÊNCIAS	64
8. ANEXO	87
8.1 Cadastro de patrimônio genético	87

1. INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a região sul é a maior produtora de frango de corte do país e de acordo com o relatório anual de 2022 da Associação Brasileira de Produto Animal (ABPA) é responsável por quase 64 % da produção nacional, totalizando em torno de 9,18 milhões toneladas (ABPA, 2022). Em relação ao mercado mundial, o Brasil é o maior exportador e o segundo maior produtor, atrás somente dos EUA (USDA, 2022).

A fim de diminuir as alterações bioquímicas e microbiológicas que podem ocorrer nas carnes e produtos cárneos são utilizadas as operações unitárias de congelamento e resfriamento, que consistem na redução da temperatura dos alimentos. No congelamento, uma porção da água muda seu estado formando cristais de gelo, resultando na concentração de solutos e alterações nas propriedades nutricionais e nas características sensoriais, além de possuírem um preço relativamente maior devido à necessidade de manter a temperatura baixa constante. No entanto, no resfriamento não ocorrem mudanças no estado da água, e, dessa forma, os danos provocados aos alimentos são mínimos, sendo percebidos pelos consumidores como alimentos frescos, saudáveis e de fácil preparo (FELLOWS, 2006).

Por apresentarem alta atividade de água (a_w) (0,96- 0,98) e pH normalmente de 5,7 e 5,9; as carnes e os produtos cárneos são susceptíveis a contaminação microbiológica. Na natureza, encontra-se uma ampla variedade de patógenos que podem se desenvolver em alimentos, os quais continuam sendo uma das maiores causas de problemas mundiais de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento (FRANTAMICO *et al.*, 2007; NEDOROSTOVA *et al.*, 2009).

As indústrias de alimentos possuem critérios rígidos quanto ao prazo de validade e a qualidade microbiológica de seus produtos. Assim, agentes antimicrobianos sintéticos têm sido comumente e amplamente utilizados em produtos alimentícios. Contudo, o uso destes compostos resulta na resistência microbiana, em um acúmulo de resíduos químicos na cadeia alimentar (AKINYEMI *et al.*, 2006; BIALONSKA *et al.*, 2010; CUEVA *et al.*, 2011).

Dessa forma, nas duas últimas décadas uma série de medidas de restrição ao uso de conservantes sintéticos vem sendo realizadas tanto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA- BRASIL) quanto pelo Food and Drug

Administration (FDA – EUA) e European Food Safety Autoroty (EFSA – União Europeia). Ainda, mudanças no contexto socioeconômico e cultural pelos consumidores ocasionaram uma demanda por produtos mais saudáveis, e com isso a redução de conservantes sintéticos. Por consequência, há uma tendência industrial e acadêmica de desenvolver produtos e estratégias alternativas à utilização de conservantes sintéticos, sendo viável tanto em termos de funcionalidade quanto de custos de produção.

De acordo com os autores Filoche *et al.* (2005) e Nedorostova *et al.* (2009) o uso da adição de conservantes com atividade antimicrobiana em alimentos parece ser uma forma interessante de controlar o desenvolvimento de bactérias patogênicas e aumentar a vida de prateleira de alimentos processados, incluindo produtos cárneos. Dentre esses compostos naturais encontram-se os óleos essenciais, os quais são formados a partir do metabolismo secundário das plantas e constituídos por uma mistura de compostos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e derivados oxigenados (BAJPAI *et al.*, 2008). Devido as suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes comprovadas (SMITH-PALMER, 1998), vários estudos sobre a utilização de óleos essenciais como conservante natural vêm sendo realizados ao longo das duas últimas décadas (DOBRAVALSKYTE *et al.*, 2012; ROGINSKY e LISSI, 2005; SUHAJ 2006).

Outra estratégia promissora seria utilizar óleos essenciais associados a uma outra tecnologia de conservação de alimentos, buscando a inativação de micro-organismos por meio de redução da intensidade de cada barreira, de acordo com a teoria dos obstáculos proposta por Leistner e Gorris (1995), resultando na preservação das propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos. Como exemplo, foram estudadas embalagens com atmosfera modificada (MARINO *et al.*, 1999), alta pressão isostática (DEVLIEGHERE *et al.*, 2004), baixas temperaturas e acidez (AL-REZA *et al.*, 2010; SKANDAMIS e NYCHAS, 2001). Alguns trabalhos foram realizados visando avaliar o efeito sinérgico da combinação de óleos essenciais e processamento por alta pressão em bebidas à base de iogurte (EVRENDILEK e BALASUBRAMANIAM, 2011) e em sucos de frutas (ESPINA *et al.*, 2013). No entanto, ainda são necessários estudos em carnes e produtos cárneos especialmente contra *Pseudomonas* spp. e *Listeria*, micro-organismos de grande importância na

deterioração e segurança dos mesmos, uma vez que os principais estudos abordam *Salmonella* e *E. coli*.

Portanto, o desenvolvimento de um produto cárneo refrigerado e tratado com óleos essenciais, aliado ao tratamento com uma tecnologia que preserve as características nutricionais e sensoriais dos alimentos, como é o caso do processamento por alta pressão, é desejável de modo a prolongar a vida de prateleira durante a produção e comercialização da carne de frango.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de uma blenda de óleos essenciais (BOE) e da alta pressão isostática (500 e 600 MPa × 5min × 25 °C) isoladamente e em combinação, na sobrevivência de *P. aeruginosa* (ATCC 13388) e *L. innocua* (ATCC 33090), em carne de peito de frango à temperatura de refrigeração.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* de uma blenda contendo óleos essenciais de *Thymus vulgaris* e *Ocimum gratissimum* na porção 1:3, frente as cepas de *P. aeruginosa* ATCC 13388 e *L. innocua* ATCC 33090.
- Verificar se há efeito sinérgico entre os dois métodos de conservação (BOE e alta pressão hidrostática) em carne de peito de frango resfriada.
- Analisar a sobrevivência de *P. aeruginosa* (ATCC 13388) e *L. innocua* (ATCC 33090) durante a estocagem a temperatura de refrigeração de peito de frango, quando adicionado da BOE e submetido a diferentes pressões (500 e 600 MPa), e tempo e temperatura constantes (5 min × 25 °C).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Carne de frango

3.1.1 Carne de frango: histórico, produção e consumo no Brasil e no mundo

Em 1930 teve início no Brasil a produção de frango em larga escala e a partir de 1950, para melhor abastecer o comércio houve necessidade de avanços na genética, nutrição, equipamentos e manejo, resultando na redução do tempo para abate de 6 meses para 40 dias (FURTADO, 2002). De acordo com Ritchie e Roser (2017) a produção global de carne de frango aumentou rapidamente nos últimos 50 anos, crescendo 12 vezes entre 1961-2014.

A cadeia avícola por apresentar alto nível de coordenação se mantém competitiva no mercado mundial (CARLETTI FILHO, 2005), sendo dividida em três grandes etapas: produção de insumos, industrialização e comercialização e distribuição (VOILA e TRICHES, 2015).

Dessa forma, a carne de frango se tornou uma fonte proteica com preço acessível, de ciclo rápido e de alta produção se comparada a carne bovina. Com isso, passou a ter grande importância tanto para a economia brasileira quanto mundial. Segundo a USDA (2019), é a segunda carne mais produzida e consumida no mundo, e possui tendência de expansão devido as novas tecnologias desenvolvidas que possibilitam o aumento de produtividade.

Atualmente, os maiores produtores mundiais de frango são Estados Unidos, seguidos de Brasil e China. No entanto, o Brasil é o maior exportador, com 3,85 milhões de toneladas exportadas, e apresenta consumo per capita de 45,56 kg/ por ano (EMBRAPA, 2022; USDA, 2022). De acordo com as projeções da FAO (2021) deve haver um aumento de 14% no consumo global de proteínas da carne até 2030 em comparação ao período de 2018-2020, impulsionado principalmente pelo aumento da renda e da população, sendo a carne de aves responsável por 17,8 % desse aumento.

A perspectiva da população mundial divulgada pela Organização das Nações Unidas (ONU) em 2019, é de 8,8 bilhões de habitantes em 2030 e 9,8 bilhões em 2050. Devido a este aumento, segundo estatística da FAO (Organizações das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) para o período de 2017 a 2026, a demanda por consumo de carne deverá crescer de forma constante e a carne de frango será a

responsável por quase metade desta expansão ao longo da década, por ser considerada fonte proteica de alta qualidade, apresentar vitaminas B, minerais e um teor de gordura relativamente baixo. Associado a estes fatores e a composição química da carne de frango, a Associação Americana do Coração (AHA) recomenda a substituição de carne vermelha por carnes de frango devido a sua composição lipídica possuir menor teor de gordura saturada e colesterol em relação as carnes bovinas e suínas (AHA, 2014).

3.1.2 Características da carne de frango

Diversos fatores podem influenciar a composição e a qualidade da carne, o que pode variar de acordo com a região geográfica, estágio de desenvolvimento tecnológico do setor e a cultura do consumidor (BLISKA, 2000). Segundo Baracho *et al.* (2006) o bem-estar animal, as boas práticas de manejo e processamento devem ser verificadas em todos os momentos da produção, a fim de garantir a qualidade do produto.

A composição química da carne de frango, quanto a umidade, proteína e gordura pode variar de acordo com o corte (SOUZA, 2004). De modo geral, a carne de frango é composta de 60 a 80 % de água, e 15 a 25 % de proteína. A composição de lipídeos pode ser alterada de acordo com sexo, idade, ambiente de criação e a composição da dieta, ou seja, conforme o perfil de ácidos graxos presentes (ALVARADO, 2004; JULIÃO, 2003; MURAKAMI *et al.*, 2010). Assim, os valores de lipídeos presentes na carne de peito variam de 1,5 a 5,3%, sendo esses valores mais elevados para a carne da coxa (BRAGAGNOLO, 2001; CASTELLINI *et al.*, 2002). Os demais nutrientes encontrados na carne de frango são vitaminas, especialmente as do complexo B, sais minerais, sendo mais predominante o ferro (ALVARADO, 2004; CASTELLINI *et al.*, 2002; SOUZA-SOARES e SIEWERDT, 2005).

Além da composição nutricional, as características físicas da carne de frango influenciam no poder de decisão de compra do consumidor, estando relacionadas as propriedades sensoriais, como coloração, pH, capacidade de retenção de água, entre outras. A coloração da carne de frango *in natura* é importante, pois está entre os parâmetros de aceitação dos consumidores, uma vez que a associam com produtos

frescos de boa qualidade (CONTRERAS *et al.*, 2002; OLIVO *et al.*, 2006; SOUZA, 2010).

O pH da carne é um dos principais fatores a afetar a coloração da carne e exerce impacto na qualidade da carne e dos produtos derivados. O músculo vivo possui valor de pH médio de 7,2. Logo após o abate, ocorrem processos bioquímicos, transformação do músculo em carne, em que as reservas energéticas do músculo são convertidas em ácido lático, provocando a queda nos valores de pH após 6 a 8 h, apresentando pH final entre 5,7 e 5,9 (OSÓRIO e OSÓRIO, 2000; ORDONEZ, 2005).

No entanto, podem ocorrer processos *post-mortem* anômalos, chamadas carnes PSE (Pale, soft, exudative – pálida, mole e exsudativa) e DFD (dark, firm, dry – escura, dura e seca). A primeira é caracterizada por uma glicólise *post-mortem* muito rápida, ocasionando queda brusca de pH quando a temperatura da carne ainda é elevada, encontrando-se abaixo de 5,8 em menos de 4 h. A carne DFD ocorre devido à queda de pH pouco acentuada devido à baixa concentração de glicogênio muscular, e após 24 h o pH deverá estar acima de 6,2. Devido ao seu pH mais elevado, são mais susceptíveis a contaminação microbológica (ORDONEZ, 2005; VENTURINI *et al.*, 2007).

Assim, o pH final do músculo apresenta influência nas mudanças químicas e físicas, principalmente reflectância da luz, capacidade de retenção de água, maciez, e estabilidade microbológica.

3.1.3 Contaminantes presentes na carne de frango e medidas de controle

A carne de frango apresenta alta atividade de água (0,96 – 0,98) e pH próximo a neutralidade, por esta razão é perecível e possui alto potencial como veículo de doenças transmitidas por alimentos (DTA's), devido à presença e persistência de micro-organismos patogênicos (BARROUG *et al.*, 2021; MIN e AHN, 2005).

Durante e após o abate do animal, bactérias presentes em sua microbiota, bem como o ambiente de abate e os equipamentos utilizados, podem contaminar as carcaças, seus cortes e produtos processados. Assim, alguns micro-organismos podem crescer ou sobreviver durante o processamento e armazenamento dos produtos, caso encontrem condições favoráveis (ROUGER, 2017).

De acordo com Jayasena e Jo (2013), os principais micro-organismos vinculados a DTA's são *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* e *Escherichia coli*.

Nesse sentido, vale ressaltar que, mesmo o consumo de carne de frango totalmente cozida desencadeou um surto associado a DTA's quando *L. monocytogenes* se multiplicou durante a distribuição e armazenamento (CDC, 2021).

Nos EUA e na União Europeia os surtos de DTA's estão ligados principalmente a produtos avícolas. Portanto, as DTA's surgiram como um problema econômico e de saúde pública importante e crescente nas últimas décadas (BARROUG *et al.*, 2021; TAUXE *et al.*, 2010). O governo dos EUA estima que 1 em cada 6 americanos adoecem por ano, o que equivale a cerca de 48 milhões de casos de DTA's anualmente, resultando em aproximadamente 128.000 hospitalizações e 3.000 mortes (FDA, 2019).

Assim, devido ao risco à saúde pública, as autoridades de países importadores de carnes exigem a verificação das boas práticas higiênicas e das condições de armazenamento, sendo os principais micro-organismos utilizados como controle a *Campylobacter jejuni*, *Listeria* spp. e *Salmonella* spp., e micro-organismos psicrótróficos como *Pseudomonas* (ICMSF, 2007). Para realizar o monitoramento e controle, as amostras devem ser coletadas em etapas específicas e críticas da cadeia produtiva, e os resultados obtidos representam as condições primárias de abate e resfriamento, de acordo com o tempo e temperatura de armazenamento (ICMSF, 2011).

A fim de evitar a deterioração dos alimentos por essas bactérias e prolongar sua vida de prateleira, devem ser adotadas medidas preventivas e corretivas higiênicas sanitárias ao longo de toda a cadeia produtiva, desde o produtor até o consumidor (LOGUE *et al.*, 2003).

Assim, para manter a qualidade e segurança dos alimentos perecíveis, as indústrias utilizam o gerenciamento da cadeia de frio para conservação, por meio da refrigeração e/ou o congelamento, de acordo com as características do produto.

A cadeia de frio consiste em um sistema de transporte e armazenamento com temperatura controlada de forma ininterrupta, desde o fornecedor até o consumidor. Usualmente, utiliza-se temperatura de resfriamento e congelamento comercial entre -1 e 8 °C e -15 e -30 °C, respectivamente (MONTANARI, 2008).

O congelamento é uma das técnicas mais empregadas nas indústrias de carnes e produtos cárneos para manter a níveis aceitáveis a qualidade, entretanto, os processos de congelamento, armazenamento congelado e descongelamento

acarretam alterações na estrutura muscular que afetam a capacidade de retenção de água e maciez (LEYGONIE *et al.*, 2012).

Durante o congelamento são formados cristais de gelo entre e dentro das fibras, os quais danificam sua estrutura, além de ocorrer um aumento da concentração de soluto em torno da estrutura proteica, incluindo proteínas solúveis, peptídeos, aminoácidos, resultando em perda do seu valor tecnológico, sensorial e nutricional, uma vez que as proteínas são os principais componentes do tecido muscular (CAGDAS e KUMCUOGLU, 2015; ESTEVEZ, 2011; KIM *et al.*, 2013; WAGNER e AÑÓN, 1985).

Todavia, o processo de resfriamento, quando comparado ao processo de congelamento, provoca pequenas mudanças nas propriedades nutricionais e nas características sensoriais. Os alimentos refrigerados são percebidos pelos consumidores como de fácil preparo, de qualidade elevada e saudáveis (CAGDAS e KUMCUOGLU, 2015; FELLOWS, 2006).

Por isso, nas duas últimas décadas, uma série de medidas de restrição ao uso de conservantes sintéticos foram adotadas tanto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA - BRASIL) quanto pelo Food and Drug Administration (FDA – EUA) e European Food Safety Authority (EFSA – União Europeia). Associado a este contexto está a mudança cultural por parte dos consumidores, onde o aumento do conhecimento sobre os alimentos e suas composições, tem levado estes indivíduos a buscar por alimentos mais saudáveis e com teor reduzido de conservantes químicos, assim a substituição por compostos naturais tem sido uma alternativa. Além disso, mudanças no contexto socioeconômico e cultural pelos consumidores ocasionaram uma demanda por produtos mais saudáveis, e com isso na redução do uso de conservantes sintéticos, demonstrando que a sua substituição por compostos naturais é uma opção para aqueles que procuram hábitos saudáveis (CHAVES *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2008;).

Por consequência, há uma tendência industrial e acadêmica na busca por compostos naturais alternativos e que substituam a utilização de conservantes sintéticos. Dentre esses compostos naturais, encontram-se os óleos essenciais, os quais são formados a partir do metabolismo secundário das plantas medicinais e aromáticas (BOU *et al.*, 2009; BURT, 2004). Assim, vários estudos têm sido realizados

com relação às suas propriedades conservantes em alimentos (DORMAN e DEANS, 2000; DRAUGHON, 2004; FILOCHE *et al.*, 2005).

Alguns óleos essenciais com propriedades antimicrobianas tiveram suas atividades como conservante comprovadas em vários estudos com produtos cárneos, peixes, derivados de leite e vegetais. Ainda, quando utilizados como aromatizantes, realçaram as características sensoriais do produto (BURT, 2004; FISHER e PHILLIPS, 2008; SOLÓRZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2012).

3.2 Gênero *Listeria*

3.2.1 Taxonomia e caracterização morfológica e bioquímica

Listeria é um gênero pertencente à família *Listeriaceae*. Apresenta forma de bastonetes curtos, Gram positivo, não esporogênicos, anaeróbios facultativos. Crescem em uma ampla faixa de temperatura (1 a 45 °C), sendo o ótimo entre 30-37 °C. No entanto, toleram baixas temperaturas sendo capazes de se multiplicar em temperatura de refrigeração. Apresentam movimentos rotatórios ou de tombamento a 22 °C, porém perdem esta capacidade ao atingir 37 °C. As principais características bioquímicas são catalase positiva, urease negativa e fermentam glicose e outros carboidratos com a produção de ácido, porém sem a produção de gás (HOLT *et al.*, 1994; LEMES-MARQUES, 2007; RAMASWAMY *et al.*, 2007; RYSER e DONNELLY, 2001).

O gênero *Listeria* é composto por dezessete espécies, sendo *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquática*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae* e *L. newyorkensis*. As espécies *L. innocua* e *L. grayi* são consideradas não patogênicas, enquanto *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. welshimeri* raramente causam infecções em humanos e, finalmente, a *L. monocytogenes* é a espécie mais importante, visto que é uma bactéria patogênica para o homem e demais animais (ICMSF, 1996; SAUDERS e WELLER *et al.*, 2015; WIEDMANN, 2007).

Todas as espécies estão disseminadas na natureza, isto é, no solo, plantas em decomposição, água e esgoto. Assim, *L. monocytogenes* e outras *Listeria spp.* contaminam continuamente áreas de recebimento e processamento em indústrias

alimentícias (SAUDERS *et al.*, 2012; SAUDERS e WIEDMANN, 2007; WELLER *et al.*, 2015).

A infecção por *L. monocytogenes*, denominada listeriose, pode afetar mulheres grávidas, provocando infecção cervical uterina e resultar em abortos espontâneos, natimortos e partos prematuros durante o segundo ou terceiro trimestre, bem como incorrer em riscos aos recém-nascidos, por poderem desenvolver síndrome respiratória e devido a internações resultar em sepse e meningite. Idosos e pessoas com o sistema imunológico comprometido também podem ser acometidos pela doença, desenvolvendo infecções graves na corrente sanguínea (septicemia) e provocar encefalite e meningite (CDC 2021a; ICMSF, 1996). Estima-se que 1600 pessoas sejam contaminadas por listeriose por ano, e destas 260 podem vir à óbito (CDC 2021b).

Além dessas formas graves de listeriose, estudos relataram uma doença gastrointestinal não invasiva mais branda caracterizada por febre, náusea, vômito, diarreia, dor de cabeça e sintomas musculoesqueléticos (FRYE *et al.*, 2002; SIM *et al.*, 2002).

Embora *L. innocua* não seja considerada patogênica e relacionada a infecções humanas, Perrin *et al.* (2003) reportaram o caso do óbito de uma mulher de 62 anos ocasionada por esta bactéria. Ainda de acordo com os autores a paciente não era considerada imunocomprometida. No entanto, a paciente fazia uso de corticoides para tratamento de asma o que pode ter levado a alguma imunodeficiência.

3.2.2 Diferença entre *Listeria innocua* e *L. monocytogenes*

Bioquimicamente a *L. innocua* é muito semelhante a *L. monocytogenes*, sendo que as principais diferenças entre as espécies estão relacionadas a capacidade de fermentação de carboidratos, verificada pela produção de ácido a partir de L-rhamnose, e da produção de hemolisina analisada no teste de β - hemólise e CAMP – *S. aureus* (Christie-Atkins-Munch-Peterson Test) como observado na Tabela 1.

Tabela 1. Principais características de *L. monocytogenes* e *L. innocua*.

Característica	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
Motilidade tipo guarda-chuva	+	+
Motilidade rotacional	+	+
Catalase	+	+
Oxidase	-	-
Crescimento em TSI (rampa ácida/ Fundo ácido)	+	+
Crescimento em presença de bile e hidrólise da esculina	+	+
Glicose	Oxidativo e fermentativo	Oxidativo e fermentativo
Redução Nitrato	-	-
β- hemólise	+	-
CAMP - <i>S. aureus</i>	+	-
CAMP - <i>R. equii</i>	-	-
Ácido a partir de manitol	-	-
Ácido a partir de D-xilose	-	-
Ácido a partir de L-rhamnose	+	+/-
Ácido a partir de α-metil-D- manosídeo	+	+

3.2.3 Resistência de *Listeria* a antimicrobianos

A resistência de bactérias a compostos antimicrobianos ocorre de forma intrínseca ou natural, ou é adquirida por mutação genética (BLAIR, 2015). O gênero *Listeria* não é comumente relacionado a multirresistência a antimicrobianos, porém como vem ocorrendo com demais patógenos de importância em alimentos, algumas espécies de *Listeria* têm capacidade de desenvolver rápida resistência a qualquer agente antimicrobiano (LUQUE-SASTRE, 2018).

A resistência de *Listeria* à compostos antimicrobianos está relacionada, na maioria dos casos, a mecanismos adquiridos como mobilidade genética, incluindo plasmídeos e transposons conjugativos (GODREUIL, 2003). POYART-SALMERON *et al.* (1990) foram os primeiros a relatar a resistência de *L. monocytogenes* a antibióticos na França.

Desde então, *L. monocytogenes* e outras espécies de *Listeria* resistentes como *L. innocua*, *L. welshimeri* vem sendo detectadas, envolvendo um ou mais compostos, e vários genes de resistência antimicrobiana foram identificados e caracterizados

(BERTSCH, 2014; CHARPENTIER e COURVALIN, 1999; GRANIER *et al.*, 2011; MORVAN *et al.*, 2010).

3.3 Gênero *Pseudomonas*

3.3.1 Taxonomia e a caracterização morfológica e bioquímica de *Pseudomonas*

O gênero *Pseudomonas* pertence à família *Pseudomonadaceae*, são bactérias Gram-negativa, quase todas as espécies são bastonetes curtos e apresentam um ou mais flagelos polares. Não produzem esporos em sua maioria possuem metabolismo respiratório energético puramente aeróbio (PALLERONI, 2009). As espécies de *Pseudomonas* possuem crescimento entre 28 e 30 °C, sendo que a espécie *P. aeruginosa* pode crescer a 37 °C (MOORE *et al.*, 2006).

O número de espécies reconhecidas e publicadas é 144, se tornando um dos gêneros bacterianos com maior número de espécies. Sua principal característica é a extrema variabilidade metabólica e nutricional, sendo comumente encontrados na natureza e isolados de diversos locais, o que possibilita a utilização de uma grande diversidade de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia, além de usar amônia ou nitrato como fonte de nitrogênio (GOMILA *et al.*, 2015; PALLERONI, 2009).

A bactéria *Pseudomonas* spp. é o micro-organismo psicrotrófico mais comum relacionado com a deterioração de alimentos, sendo frequentemente encontrado em diversos alimentos, principalmente os mantidos sob refrigeração, com presença de oxigênio, alto teor de água e pH próximo da neutralidade, isto inclui, carnes e leites e seus derivados, pescados apresentando como principal característica odores desagradáveis e limosidade superficial (GAVA *et al.*, 2009; RAPOSO *et al.*, 2016).

3.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Várias espécies de *Pseudomonas* são patógenos de plantas e oportunistas em humanos, por frequentemente estarem relacionadas a infecções em indivíduos com o sistema imunológico debilitado. No homem, a espécie mais importante é a *P. aeruginosa*, sendo um dos principais agentes de infecção hospitalar. Devido a sua ampla expressão de fatores de virulência e resistência a diversos antibióticos e desinfetantes comercializados é de grande importância clínica (GARRITY *et al.*, 2005; LINCOPAN e TRABULSI, 2008).

Esta espécie acomete principalmente pessoas imunossuprimidas, vítimas de infecções pulmonares, de queimaduras, pacientes com câncer e AIDS. Causa infecções no trato urinário, no sistema respiratório, em tecidos moles e dermatite (McPHEE e GRIFFITHS, 2011).

Alguns fatores contribuem para a patogenicidade da *P. aeruginosa*, entre eles a variedade de enzimas extracelulares que esta espécie produz, sendo estas, protease alcalina, elastase, exotoxina A e S e hemolisina. As proteases alcalinas auxiliam na ruptura das barreiras físicas do hospedeiro e as hemolisinas provocam a quebra de diversas fontes provocando infecções (STEHLING *et al.*, 2008).

Essa espécie pode adquirir resistência natural ou por meio da elevada variedade de antibióticos ministrados em hospitais, o que dificulta a eliminação da doença, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade (LIVERMORE, 2002; MENDES *et al.*, 2005; YONEDA *et al.*, 2005).

No Brasil, a resistência de *P. aeruginosa* a antibióticos é alarmante, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), onde os índices vêm aumentando rapidamente nos últimos anos, sendo o principal problema está relacionado a resistência ao antibiótico imipenem e meropenem, de uso comuns nestes locais (NEVES *et al.*, 2011). Em 2017, nos EUA, cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* acometeram cerca de 32.600 indivíduos e levaram a óbito 2700 pacientes (CDC, 2019).

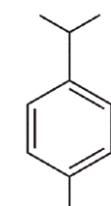
3.4. Óleos essenciais como antimicrobianos naturais

Os óleos essenciais são formados a partir do metabolismo secundário das plantas e são constituídos por uma mistura de compostos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, éster, éteres, cetonas, fenóis e óxidos) que são capazes de gerarem sabores e/ou aromas. Outros compostos voláteis incluem fenilpropanóides e substâncias contendo enxofre ou nitrogênio (BAJPAI *et al.*, 2008; EDRIS, 2007; TROMBETTA *et al.* 2005).

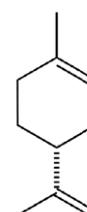
A sua composição bem como atividade antioxidante e antimicrobiana pode ser modificada por diversos fatores, como modo de extração, nutrientes presentes no solo, temperatura, mudanças climáticas e disponibilidade hídrica para crescimento da planta (SILVA *et al.*, 2012).

Os compostos ativos dos óleos essenciais podem ser divididos em quatro grupos: terpenos, terpenoides, fenilpropanóides e outros. Sendo que os compostos terpenoides possuem maior atividade bacteriostática e/ou bactericida, principalmente a ação antimicrobiana dos compostos fenólicos monoterpénóides timol e carvacrol (BURT, 2004; HYLDGAARD *et al.*, 2012).

Exemplos de monoterpénos

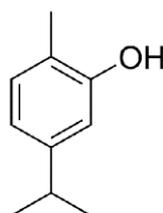


p- cimeno

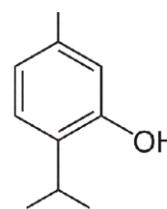


limoneno

Exemplos de monoterpénóides

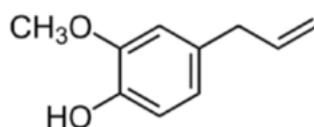


carvacrol

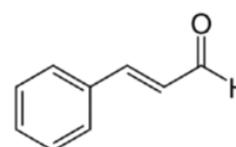


timol

Exemplos de fenilpropanóides



eugenol



cinamaldeído

Figura 1. Estruturas químicas dos principais compostos ativos presentes em óleos essenciais. (Hydgaard *et al.*, 2012).

As atividades antimicrobianas dos óleos essenciais é explícita, uma vez que já foram verificadas por diversos autores. No entanto, o seu mecanismo de ação ainda não está completamente esclarecido (HOLLEY e PATEL, 2005).

Devido a diversidade de diferentes grupos de compostos ativos presentes nos óleos essenciais, é possível que a sua atividade antimicrobiana não esteja veiculada a um mecanismo específico, mas que exerça vários efeitos na célula, como alterações na membrana citoplasmática, desordem da força próton motriz e transporte de elétrons, inibição da síntese proteica e como alteração na reserva de glicose. Alguns desses mecanismos podem ocorrer separados ou em decorrência da ação de outro mecanismo (BURT, 2004).

3.4.1 *Thymus vulgaris*

Pertencente à família Lamiaceae, o *T. vulgaris* é uma planta aromática de nome popular tomilho. Originário da Europa, no Brasil é cultivado no sul e sudeste, sendo utilizado na indústria alimentícia principalmente como condimento e apreciado devido ao seu sabor balsâmico e picante (ROCHA, 2012).



Figura 2. *Thymus vulgaris*

Este óleo essencial possui em sua composição química altas concentrações de timol (2 – isopropil – 5 – metilfenol) e carvacrol (4 – isopropil – 2 – metilfenol) (COSENTINO *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2005; WEI e SHIBAMOTO, 2010, ROMANE *et al.*, 2012).

Vários estudos foram realizados para avaliar o seu efeito como antimicrobiano natural em alimentos, sendo analisado individualmente ou associado a outro tratamento (HAN *et al.*, 2015; HYUN *et al.*, 2015; JAYASENA e JO, 2013;

KARABAGIAS *et al.*, 2011; KOSTAKI *et al.*, 2009). O seu elevado potencial antioxidante também é de grande interesse, em especial nas indústrias de produtos cárneos, utilizado a fim de controlar a oxidação lipídica (JAYASENA e JO, 2013), sendo ainda utilizado como referência de padrão antioxidante (SACCHETTI *et al.*, 2005).

A eficácia do óleo essencial de *T. vulgaris* na inibição em sistemas *in vitro* de bactérias patogênicas e de importância clínica relacionadas a alimentos foi relatada em estudos anteriores. Vázquez-Sánchez *et al.* (2018) observaram alta eficiência do óleo essencial de *T. vulgaris* ao verificar sua ação no controle de biofilmes de *L. monocytogenes*, corroborando o estudo de Ballester-Costa *et al.* (2013), no qual foi encontrada alta inibição deste óleo contra cepas de *L. innocua* (halo de inibição de $32,86 \pm 0,62$ mm) e *Alcaligenes faecalis* (halo de inibição de $39,77 \pm 3,92$ mm) quando aplicado o teste de difusão em ágar. Ainda, Sheeladevi e Ramanathan (2012) também encontraram ação para o óleo essencial de tomilho contra *Pseudomonas sp.*, *Campylobacter sp.*, *Listeria sp.* e *Salmonella sp.*

Di Pasqua *et al.* (2006) investigaram a atividade bactericida de óleos essenciais contra *E. coli*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* e bactérias lácticas, sendo que, o óleo essencial de tomilho foi considerado o mais efetivo, em que os autores relataram que a natureza lipofílica do timol e do carvacrol presente no tomilho bem como os demais constituintes como limoneno e eugenol apresentaram capacidade de interagir com as membranas bacterianas, alterando sua estrutura o que a torna mais permeável. Ainda, os óleos essenciais e seus componentes são hidrofóbicos, com isso possuem a capacidade de separar os lipídeos da membrana celular bacteriana e das mitocôndrias, desordem na estrutura que a torna mais permeável, podendo ocorrer vazamento de íons e outros conteúdos celulares. Ainda que seja tolerada uma certa quantidade de vazamento celular sem que ocorra perda de viabilidade, uma perda excessiva desses compostos levará a célula à morte (BURT, 2004; FRIEDLY *et al.*, 2009), resultando na inibição tanto de bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (CALSAMIGLIA *et al.*, 2007). De acordo com Chorianopoulos *et al.* (2004) bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *S. Enteritidis* são mais resistentes a ação de óleos essenciais do que bactérias Gram-positivas como *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*.

3.4.2 *Ocimum gratissimum*

Pertencente à família Lamiaceae, *O. gratissimum* é uma planta popularmente conhecida como alfavacão, presumivelmente originária da Índia, e produzida em todo o Brasil. Assim como o tomilho, também é utilizada como condimento, e possui sabor e odor similares ao do cravo-da-índia (MORAES *et al.*, 2011), pois apresenta em sua composição química altas concentrações de eugenol (4 – alil - 2-metoxifenol), (FREIRE *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 1999; SIMON *et al.*, 1999; VIEIRA *et al.*, 2001).



Figura 3: *Ocimum gratissimum*

Alguns estudos foram conduzidos para avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* do *O. gratissimum* (DUARTE *et al.*, 2005; JAYASENA e JO, 2013; SARTORATTO *et al.*, 2004). Estudo realizado por Mbata e Saikia (2005) confirmou estudos anteriores em relação a inibição de bactérias por óleos essenciais extraídos de plantas, inclusive inibição pelo óleo de *O. gratissimum* contra cepa de *L. monocytogenes*. De acordo com Ijeh *et al.* (2005), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *P. aeruginosa* e *Lactobacilli* também apresentaram sensibilidade ao extrato desta planta. No entanto, são necessários mais estudos para verificar seu efeito quando adicionado diretamente em alimentos.

3.5. Alta Pressão Isostática (API)

3.5.1 Descrição e princípios básicos

O processamento por alta pressão isostática (API) é um método de preservação que consiste em submeter os alimentos por períodos de alguns segundos a vários minutos a pressões variando de 100 a 1000 MPa, sendo normalmente utilizadas pressões superiores a 350 MPa, com ou sem aplicação de calor. Este tratamento provoca a inativação de micro-organismos e enzimas enquanto as vitaminas, os pigmentos e os aromas são pouco afetados (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2015; HEINZ e BUCKOW, 2010; KNORR *et al.*, 2006).

Para inativação e/ou redução do número de células bacterianas, os parâmetros de processos comumente aplicados em carnes e produtos cárneos variam de pressões de 400 a 600 MPa, utilizando tempos de 3 a 7 minutos à temperatura ambiente (BAJOVIC *et al.*, 2012).

Os princípios básicos que compreendem esta tecnologia são o princípio isostático e o princípio de *Le Chatelier*. De acordo com o princípio isostático a pressão é aplicada uniformemente em todas as direções, independente do tempo e espaço. Quando aplicada a alta pressão, seus efeitos são difundidos instantaneamente e de forma homogênea, não importando a geometria ou o tamanho do alimento (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2008). O princípio de *Le Chatelier* diz respeito às mudanças que ocorrem no equilíbrio de um sistema quando é aplicada pressão, temperatura, entre outras, onde qualquer fenômeno acompanhado por uma redução no volume é potencializado pela pressão, ou seja, se a pressão é alterada, o equilíbrio irá se deslocar a fim de reduzir a mudança, isto é, em direção ao menor volume (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2015).

3.5.2 Efeitos do processamento por alta pressão na cor e proteína da carne

Algumas características de atributos de qualidade da carne podem sofrer alterações conforme o nível de pressão utilizada (SUMAN e JOSEPH, 2013). Segundo Patterson e Knoerzer (2016), geralmente acima de 500 MPa, quando aplicado o processamento por alta pressão ocorrem mudanças na coloração do músculo cru, resultando em uma aparência cozida.

Jung *et al.* (2003) ao estudarem a aplicação de API em carne bovina observaram que quando utilizada pressão igual ou superior a 400 MPa ocorre redução

significativa na coloração vermelha (valores de a^*) devido a desnaturação de mioglobina. Contudo, nas carnes de aves esta perda não é tão evidente devido ao seu menor teor de mioglobina quando comparada à carne vermelha, (CHUANG e SHEEN, 2022).

A estrutura da proteína também sofre modificação, em que a aplicação da pressão induz o desdobramento da estrutura da proteína e, a depender da proteína e condições aplicadas, pode ocorrer a sua desnaturação parcial ou total. Devido a estas mudanças, a maioria dos produtos cárneos comercializados são prontos para o consumo, havendo poucas opções de carne moída *in natura* disponível (BAJOVIC *et al.*, 2012).

Em consequência da baixa compressibilidade, as ligações covalentes são menos sensíveis a variações de pressão, em contraste às ligações de hidrogênio que podem ser reforçadas sob pressão (CHEFTEL e CULIOLI, 1997). As interações hidrofóbicas são muito sensíveis à pressão, afetando assim a estabilidade da estrutura terciária da proteína. Grandes mudanças apenas irão ocorrer nas estruturas terciárias e secundárias com pressões superiores a 200 MPa e 700 MPa, respectivamente (RASTOGI *et al.*, 2007).

3.5.3 Efeitos do processamento por alta pressão na inativação de *Listeria* e *Pseudomonas*

Diversos fatores influenciam na capacidade da alta pressão isostática em inativar os micro-organismos presentes em carnes e em produtos cárneos, uma vez que são dependentes tanto dos parâmetros de processos empregados (pressão, tempo e temperatura) como das características do produto (pH, a_w , teor de sal e presença de antimicrobianos) (RENDUELES *et al.*, 2011; TÖPFL e HEINZ, 2009).

Além disso, fatores relacionados a parede celular, estado fisiológico e propriedades da cepa também são determinantes (JOFRÉ *et al.*, 2010). Como os micro-organismos Gram-positivos como *Bacillus*, *Listeria*, *Clostridium* e *Staphylococcus*, apresentam uma camada mais espessa de peptidoglicano, eles são comumente mais resistentes à pressão quando comparado aos micro-organismos Gram-negativos (CONSIDINE *et al.*, 2008; DUMAY *et al.*, 2010). A resistência ao API

difere tanto entre diferentes espécies bacterianas quanto entre diferentes cepas da mesma espécie (RASTOGI *et al.*, 2007).

Os parâmetros de processos normalmente empregados para carnes e produtos cárneos citados anteriormente (pressões de 400 a 600 MPa, utilizando tempos de 3 a 7 minutos à temperatura), na maioria dos casos, levam a uma inativação de mais de quatro ciclos log de microrganismos vegetativos, resultando em um aumento da vida útil e maior segurança (BAJOVIC *et al.*, 2012).

O processamento por alta pressão provoca lesão na parede celular e na membrana plasmática das bactérias, exercendo assim efeitos sobre os componentes celulares, principalmente organelas como vacúolos e ribossomos, além de alterações no material genético e complexos enzimáticos, acarretando deformações morfológicas, permitindo a entrada de compostos antimicrobianos para o interior da célula, aumentando assim a sensibilidade a estes compostos, como é caso dos óleos essenciais (HAUBEN *et al.*, 1997; MOR-MUR e YUSTE, 2005; RENDUELES *et al.*, 2011; WESCHE *et al.*, 2009; YUSTE *et al.*, 2004).

A aplicação de API utilizando parâmetros de processo de 600 MPa x 6 min x 31 °C em fatias de presunto cozido, presunto seco e lombo bovino marinado, foi eficaz no controle de *Salmonella* e *L. monocytogenes*, sendo reduzidos de 3,5 log UFC/g a <10 UFC/g em todos os produtos. Ainda, em lombo bovino marinado mantiveram-se ausentes após confirmação por meio de análises de presença/ausência e PCR, durante a estocagem à 4 °C por 120 dias.

O tratamento API também foi muito eficaz no controle de *Salmonella* e *L. monocytogenes*, que permaneceram <10 UFC/g em presunto cozido e seco, e até mesmo ausentes em lombo bovino durante todo o armazenamento a 4 °C.

Bruschi *et al.* (2017) verificaram redução de mais de 5 ciclos logaritmos de cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua* quando utilizada pressão de 500 MPa a 10 °C por 5 min, os autores também concluíram que 300 MPa não foi suficiente para causar grande dano na viabilidade celular, enquanto uma pressão de 500 MPa provocou grande perda da viabilidade celular da maioria das cepas.

Jofré *et al.* (2010) relataram que, embora a contagem de *L. monocytogenes* estivesse abaixo do limite de detecção imediatamente após os tratamentos por API (400 ou 600 MPa por 10 min à 15 °C), algumas cepas não foram completamente

inativadas e o patógeno apresentou crescimento durante o período de estocagem por 21 dias a 14 °C .

Em poucos trabalhos foram testados o uso de óleos essenciais associados a API contra *Pseudomonas* em produtos cárneos, sendo comumente trabalhos relacionados a produtos lácteos. Dessa forma, Del Olmo *et al.* (2012) observaram que ao inocularem *P. fluorescens* em files de peito de frango com população final de aproximadamente 10^8 UFC/g e submetê-los a tratamentos por alta pressão 200, 300, 400 e 500 MPa $\times 10$ °C $\times 10$ min e estocados por 9 dias à 5 °C, observaram que a 200 e 300 MPa houve crescimento mesmo após 1d de inoculação ($4,21 \pm 0,11$ e $2,66 \pm 0,07$ log UFC/g, respectivamente). No entanto, a 400 e 500 MPa os autores registraram crescimento após 3 dias, sendo maiores as contagens para 400 MPa ($2,42 \pm 0,15$ log UFC/g).

3.5.4 Efeitos da combinação do processamento por alta pressão e antimicrobianos naturais na inativação de *Listeria* e *Pseudomonas*.

A aplicação de outros obstáculos associados a API já foi proposta para aumentar o efeito bactericida do processo, com o objetivo de reduzir as alterações indesejadas provocadas pelo API, principalmente em pressões superiores a 400 MPa, em carnes e produtos cárneos. Alguns exemplos de métodos de conservação combinados a API são o uso de antimicrobianos, pH baixo, dióxido de carbono, embalagem a vácuo e armazenamento refrigerado, o uso dessas barreiras tem por objetivo evitar a recuperação de células danificadas em processos subletais (GARRIGA e AYMERICH, 2009, JOFRÉ *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2012).

O uso de antimicrobianos naturais, como os óleos essenciais, é uma tendência crescente e suas propriedades bactericidas têm sido comprovadas; entretanto a sua aplicação em alimentos apresenta limitação quanto a concentração a ser utilizada, pois em alguns casos são necessárias altas concentrações para se obter atividade antimicrobiana suficiente, o que resulta em alterações indesejáveis no sabor, aroma e pungência do produto (HYLDGAARD *et al.*, 2012; LOPEZ *et al.*, 2005; MARINO *et al.*, 2001; YAMAZAKI *et al.*, 2004).

Assim, os óleos essenciais também podem ser utilizados associados a outros métodos de conservação de alimentos, principalmente processos não térmicos, os quais mantêm as propriedades nutricionais e sensoriais do produto, atendendo a

crescente procura dos consumidores por alimentos com aparência de frescos e sem adição de conservantes químicos em sua composição (ESPINA *et al.*, 2013). Essas combinações podem ser sinérgicas e possibilitar a redução de barreiras conforme a teoria dos obstáculos proposto por Leistner e Gorris (1995), tornando o produto mais seguro para o consumo.

Desse modo, a alta pressão é uma alternativa aos processos térmicos por causar alterações mínimas nas propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos (ESTEVE e FRIGOLA, 2007; RENDUELES *et al.*, 2011). De acordo com Espina *et al.* (2013) a combinação com óleo essencial pode diminuir a intensidade do tratamento por alta pressão, prolongando a vida útil do equipamento.

Assim, o efeito sinérgico de alta pressão e óleo essencial foi observado por Evrendilek e Balasubramaniam (2011) na inativação de *L. monocytogenes* e *L. innocua* em bebidas à base de iogurte, e por Espina *et al.* (2013) contra *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* em suco de fruta.

Oliveira *et al.* (2015) avaliaram a combinação de carvacrol e API em peito de peru fatiado com baixo teor de sódio. O estudo demonstrou que houve melhora notável nos efeitos de conservação quando utilizado 600 MPa/180 seg à temperatura ambiente, sendo capaz de estender em 10 dias a fase lag de *L. innocua*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Óleos essenciais e cepas utilizadas

A atividade antimicrobiana *in vitro* da blenda dos óleos essenciais de *T. vulgaris* (tomilho) e *O. gratissimum* (alfavacão) - BOE foi estudada contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388) e *Listeria innocua* (ATCC 33090). Os óleos foram obtidos comercialmente a partir do fornecedor Terra Flor Aromaterapia, *T. vulgaris* (lote L178) e *O. gratissimum* (lote L290).

A blenda contendo óleos essenciais de *Thymus vulgaris* e *Ocimum gratissimum* na proporção 1:3 foi escolhida por ter apresentado atividade antimicrobiana contra *Salmonella* Enteritidis, nos estudos conduzidos na tese de doutorado de Figueiredo (2017).

O inóculo das cepas de *P. aeruginosa* (ATCC 13388) e *L. innocua* (ATCC 33090) foi preparado a partir de células armazenadas em ultrafreezer a -80 °C, sendo que *P. aeruginosa* foi mantida em caldo nutriente ágar (NA) (Merck, Alemanha) e *L. innocua* em caldo brain heart infusion (BHI) (Oxoid, Reino Unido), ambos suplementados com 10 % de glicerol

4.2 Determinação da atividade antimicrobiana da BOE

4.2.1 Preparo de inóculo

O preparo dos inóculos para o teste de determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) foi realizado de acordo com o procedimento M7-A6 para bactérias (CLSI, 2003). As bactérias foram cultivadas em meio NA por 24 h a 35 °C. Após o crescimento, uma alíquota foi retirada com auxílio de uma alça de platina e transferida para um tubo contendo 4 mL de solução salina 0,85 % estéril. A solução foi homogeneizada em vortex e foi utilizada uma alíquota de 2 mL para leitura em espectrofotômetro (Shimadzu UV mini 1240) a 625 nm, e ajustado com solução salina até obtenção de DO de 0,08 a 0,10, sendo equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Aos 2 mL restantes da suspensão foi adicionado o mesmo volume de solução salina utilizada para o ajuste no espectrofotômetro. A partir das soluções padronizadas foram realizadas diluições seriadas para se obter a concentração final de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL. Posteriormente, 6 mL destas últimas diluições foram transferidos para um tubo

contendo 3 mL de meio de cultura Muller Hinton, resultando em uma concentração de $1,0 \times 10^6$ ou $1,0 \times 10^5$ UFC/mL em 100 μ L, portanto nos poços das microplacas inoculados as concentrações foram de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL.

4.2.2 Atividade antimicrobiana da BOE: determinação da MIC

A determinação da MIC da BOE contra *P. aeruginosa* e *L. innocua* foi realizada em duplicata, utilizando o método de microdiluição em caldo, de acordo com a Norma CLSI (2003), em microplacas estéreis de 96 poços. Em cada orifício foram depositados 100 μ L de meio Muller Hinton. Na primeira coluna, com auxílio de pipeta multicanal foram depositados 100 μ L do óleo, posteriormente homogeneizados com o meio de cultura e transferidos 100 μ L do conteúdo do orifício da primeira coluna para a coluna seguinte, repetindo-se o procedimento até a coluna 12, sendo os 100 μ L finais desprezados, de modo a originar uma série de diluições em cada coluna (1,0 a 0,0078 % v/v ou 10.000 a 78 μ L/mL). Em seguida, da coluna 2 a 12 foram adicionados 100 μ L do inóculo do micro-organismo padronizado, na concentração de 10^5 UFC/mL em cada orifício.

Após a homogeneização do conteúdo contido nos poços, as placas foram seladas com parafilm® e incubadas e por 24 h a 35 °C. Decorrido o período de incubação, em cada orifício foram adicionados 50 μ L de uma solução “reveladora” de cloreto de trifetil tetrazólio – CTT (0,1 %), e as placas foram reincubadas por 2 h. A MIC foi definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir a apresentação de coloração vermelha, conferida às células com atividade respiratória, ou seja, quando há crescimento microbiano.

4.2.3 Concentração Mínima Bactericida (MBC)

A determinação da MBC foi realizada por meio de plaqueamento de uma alíquota de 10 μ L do poço correspondente ao da MIC, e dos poços seguintes de maior concentração, em meio nutriente ágar (NA). Após o plaqueamento, as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h.

A MBC foi definida como a concentração capaz de impedir o crescimento microbiano no meio de cultura sólido (CLSI, 2003).

4.3 Avaliação da sobrevivência de *L. innocua* e *P. aeruginosa* em carne de peito de frango

4.3.1 Preparo da amostra de peito de frango e da emulsão da BOE

Em ensaios *in vivo* de aplicação de óleos essenciais são geralmente utilizadas concentrações de 5x a 10x os valores de MIC encontrados *in vitro*. Assim, para determinar se a concentração da BOE a ser utilizada nos ensaios de aplicação em carne de peito de frango afetaria de maneira negativa o sabor da carne foi realizado um teste simples de degustação utilizando quatro diferentes concentrações da BOE. A carne foi marinada em uma mistura contendo a BOE, especiarias e temperos comumente utilizados em carne de frango marinada encontrada no mercado. Essa mistura foi adicionada à 60 mL de óleo de soja antes da aplicação na carne. Portanto, para este teste foram adicionadas as diferentes concentrações da BOE (0,50; 0,75; 1,20 e 1,50 mg/g) em 200 g de carne de peito de frango e as quantidades de temperos e especiarias indicadas na Tabela 2. Em seguida, as carnes permaneceram no marinando por 20 min e posteriormente foram levadas a forno convencional em temperatura de 180 °C, até estarem completamente assadas. O sabor da carne foi avaliado por 4 pessoas.

Tabela 2. Especiarias e temperos utilizados comumente em carne de peito de frango marinado encontrado no mercado, adicionado da BOE.

Tempero	Concentração de BOE (mg/g)			
	0,5	0,75	1,20	1,50
Sal	2,001	2,002	2,002	2,0003
Salsa	1,002	1,001	1,001	1,002
Orégano	0,901	0,901	0,901	0,904
Cebola	0,901	0,902	0,901	0,901
Alho	0,900	0,901	0,901	0,901
Coentro	0,600	0,601	0,601	0,602
Alecrim	0,301	0,300	0,300	0,302
Erva doce	0,200	0,201	0,201	0,201
Carne	201,600	201,500	201,200	201,7

Após os testes preliminares, foram definidas as concentrações de 0,75 e 1,20 mg/g de carne para utilização nos ensaios. As amostras de carne de peito de frango congeladas foram obtidas do comércio local da cidade de Campinas/SP. Após

descongelamento sob temperatura de refrigeração, as mesmas foram trituradas em multiprocessador elétrico para facilitar a aplicação e homogeneização do inóculo e da emulsão da BOE.

A emulsão da BOE foi preparada utilizando-se a BOE a 0,75 e 1,20 mg/g, adicionada de 10 mL de solução de Tween 80 1%. A mesma foi homogeneizada inicialmente em vortex e posteriormente em ultrassom até completa dissolução do óleo na solução.

4.3.2 Preparo de inóculo para adição na carne de peito de frango

4.3.2.1 Preparo do inóculo

As cepas de *P. aeruginosa* e *L. innocua* foram cultivadas duas vezes em caldo tripton de soja (TSB, BD - Becton Dickinson and Company, MD, EUA) a 35 °C por 18-24 h. O inóculo foi preparado a partir da transferência de uma alçada de cultura de células para tubos contendo solução salina (0,85%) até uma turbidez de 0,08 a 0,10, medida em espectrofotômetro (Shimadzu UV mini 1240) a 625 nm, o que correspondeu a 10^8 células/mL, conforme preconizado por CLSI (2003). Esta mesma concentração de células correspondente a 10^8 células/ mL foi utilizada na inoculação na carne de peito de frango.

4.3.2.2 Ensaio preliminar de inoculação das bactérias na carne

Antes da inoculação das bactérias na carne de peito de frango, vários testes foram realizados para se determinar o volume de inóculo a ser adicionado na carne, a fim de se atingir a contagem de 10^8 células/mL após 24 h de armazenamento a 3°C. Primeiramente, para cada micro-organismo foi utilizado 1,5 mL de inóculo contendo 10^7 células/mL, mas este volume de inóculo não atingiu o número desejado de micro-organismos na carne, após inoculação. Em seguida, foi testada a adição de 2,5 mL do mesmo inoculo e, ainda assim, o valor não foi atingido. Então, foi escolhido elevar o nível de inoculo para 10^8 células/mL, sendo aplicados 2,5 mL. Com este volume, a contagem de *L. innocua* ficou acima de 10^8 UFC/g de carne e a de *P. aeruginosa* não foi atingida. Assim, para *L. innocua* foi reduzido o volume para 2,0 mL e para *P.*

aeruginosa elevado para 3,5 mL, o que permitiu atingir o nível de inóculo desejado para iniciar os experimentos.

O volume de inóculo foi estabelecido em 10^8 visto que em algumas pressões ocorrem altas reduções chegando à inativação dos micro-organismos. Em caso de níveis de inóculo inferiores não seria possível avaliar quantos logs UFC/g foram reduzidos.

4.3.3. Condições de ensaio, inoculação das amostras, adição da blenda de óleos essenciais

As amostras de carne de peito de frango foram submetidas às seguintes concentrações da BOE:

- Inoculação de *L. innocua* e adição de 0,75 mg/g da BOE;
- Inoculação de *L. innocua* e adição de 1,20 mg/g da BOE;
- Inoculação de *P. aeruginosa* e adição de 0,75 mg/g da BOE;
- Inoculação de *P. aeruginosa* e adição de 1,20 mg/g da BOE;
- Inoculação de *L. innocua* (controle positivo - sem a BOE para *L. innocua*);
- Inoculação de *P. aeruginosa* (controle positivo - sem a BOE para *P. aeruginosa*).

Assim, para a realização dos ensaios descritos acima todas as amostras de carne de peito de frango foram previamente analisadas para *L. innocua* (USDA, 2017). e *P. aeruginosa* (ISO 13720:1995). Para os ensaios, inicialmente, as amostras foram divididas em porções de 250 g cada, em embalagens estéreis (sacos de amostragem de 540 mL da marca BBV) e inoculadas a fim de atingir o nível de inóculo de 10^8 células/mL após 24 h da inoculação, assim foram adicionados 2,0 e 3,5 mL de inóculo para os ensaios de *L. innocua* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Em seguida, os sacos foram homogeneizados manualmente por 3 min e armazenados em temperatura de refrigeração a 3 °C por 24 h. Para monitorar a temperatura, foi utilizado um termômetro com resolução de $\pm 0,1$ ° C. Posteriormente, uma porção foi retirada para contagem da concentração inicial de inóculo na amostra.

Após 24 h da inoculação, foram adicionados 6 mL da emulsão da BOE nos sacos contendo a carne inoculada, seguido de homogeneização manual por 3 min, sendo as amostras novamente armazenadas em temperatura de refrigeração a 3 °C

por 24 h. Após o período de armazenamento, foi retirada uma porção para avaliar o efeito da BOE após 24 h, sendo este considerado como o dia 1. Em seguida, as amostras foram divididas de forma aleatória e armazenadas individualmente em sacos plásticos Nylon Poli, conforme ilustrado na Figura 4.

Para todas as condições de ensaio, as amostras foram armazenadas sob refrigeração a 3 °C durante 42 dias, e submetidas a plaqueamento por diluição em série para contagem do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) após 1, 7, 14, 21, 28, 36 e 42 dias de armazenamento.



Figura 4. Amostras de carne de peito de frango adicionadas da BOE (0,75 e 1,20 mg/g) e amostra controle, acondicionadas em sacos plásticos Nylon Poli.

4.3.4. Condições de ensaio e aplicação do processamento por alta pressão

Foram realizados três ensaios independentes, com amostras em duplicata.

Para análise do Processamento por Alta Pressão, foram submetidas as seguintes condições de pressão (MP – Mega Pascal), tempo e temperatura:

- Inoculadas de *L. innocua* e adicionadas de 1,20 mg/g da BOE e 500 MPa x 5 min x 25 °C;
- Inoculadas de *L. innocua* e adicionadas de 1,20 mg/g da BOE e 600 MPa x 5 min x 25 °C;

- Inoculadas de *P. aeruginosa* e adicionadas de 1,20 mg/g da BOE e 500 MPa x 5 min x 25 °C;
- Inoculadas de *P. aeruginosa* e adicionadas de 1,20 mg/g da BOE e 600 MPa x 5 min x 25 °C;
- Inoculadas de *L. innocua* e 500 MPa x 5 min x 25 °C;
- Inoculadas de *L. innocua* e 600 MPa x 5 min x 25 °C;
- Inoculadas de *P. aeruginosa* e 500 MPa x 5 min x 25 °C;
- Inoculadas de *P. aeruginosa* e 600 MPa x 5 min x 25 °C.

Os ensaios foram realizados em duplicata de amostras e processo.

As amostras foram previamente preparadas conforme descrito no item 4.3.3 e divididas individualmente em sacos plásticos Nylon Poli sendo processadas em equipamento de alta pressão isostática modelo Avure QFP 2L-700 (Avure Technologies®, EUA). O fluido pressurizador utilizado no processo foi água purificada adicionada de gelo a fim de manter a temperatura da câmara durante o processo.

Os parâmetros utilizados foram 500 e 600 MPa/ 5 min à 25 °C, sendo que uma amostra inoculada com *L. innocua* e outra amostra inoculada com *P. aeruginosa* não foram submetidas a nenhuma pressurização, para fins comparativos (amostras controle).



Figura 5. Amostras de carne de peito de frango acondicionadas em sacos plásticos Nylon Poli adicionadas de 1,20 mg/g da BOE, após passar pelo processo de pressurização a 600 MPa x 5 min x 25 °C.

Todos os processos foram realizados em duplicata de amostra e de processo tanto para *L. innocua* quanto *P. aeruginosa*, e submetidas a plaqueamento por diluição em série para contagem do número de bactérias (UFC) após 1, 7, 14, 21, 28, 36 e 42 dias de armazenamento. Todas as amostras foram armazenadas a 3 °C durante todo o período de estocagem.

4.3.5 Análise de *Listeria innocua* na carne de peito de frango

Para todas as condições de ensaios descritas no item 4.3.3 as contagens de *L. innocua*, foi utilizado o método de contagem em superfície, em que a cada ponto, uma amostra de 10 g foi retirada e adicionada 90 mL de água peptonada a 0,1% (Oxoid, Reino Unido) e posteriormente homogeneizada em *Stomacher* por 2 min a 230 rpm. Quando necessárias diluições foram realizadas. Então, foi plaqueada uma alíquota de 0,1 mL em Ágar Oxford Listeria (Acumedia, MI, EUA) suplementado com Oxford *Listeria* modificado (Difco, MI, EUA) e incubadas a 35 °C por 24 h. Após a incubação a contagem foi realizada, sendo o limite de detecção do método de 100 UFC/g (USDA, 2017).

4.3.6 Análise de *Pseudomonas aeruginosa* na carne de peito de frango

Para todas as condições de ensaios descritas no item 4.3.3, as contagens de *P. aeruginosa* foram realizadas de acordo com o método de contagem em placa ISO 13720:1995 modificado para carnes e produtos cárneos, 25g das amostras foram adicionados a 225 mL de Buffered Peptone Water (BPW, Acumedia, MI, EUA), homogeneizadas em *Stomacher* por 2 min a 230 rpm, diluídas e plaqueadas em ágar Centrimide (Acumedia, MI, EUA) suplementado com glicerol (Synth, Brasil) e incubadas a 28°C / 48+/- 2h. Após a incubação a contagem foi realizada, sendo o limite de detecção do método de 100 UFC/g.

4.5 Análise estatística

Os dados das contagens de células foram analisados e submetidos a análise de variância (ANOVA) sendo aplicado o teste de Dunnett (equação 1) para determinar diferença significativa ($p < 0,005$) na população de *L. innocua* e *P. aeruginosa* em

relação as amostras controle, usando o programa Excel (versão 2204, Microsoft, Redmond, WA).

$$\text{Equação 1: } D = d \frac{\sqrt{2 QMR}}{r}$$

A análise dos dados dos tratamentos (exceto controle) também foram estatisticamente comparados utilizando o software STATISTICA versão 10.0 (StatSoft, CA, EUA), sendo submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima bactericida (MBC)

As concentrações mínima inibitória (MIC) e mínima bactericida (MBC) da BOE de *T. vulgaris* e *O. gratissimum* foram determinadas contra *L. innocua* e *P. aeruginosa*. Para *L. innocua*, a BOE apresentou MIC de 0,31 mg.mL⁻¹ e MBC de 1,25 mg.mL⁻¹, enquanto para *P. aeruginosa* as atividades de MIC e MBC foram de 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹, respectivamente.

De acordo com a classificação proposta por Aligiannis *et al.* (2001) para materiais vegetais, a ação da BOE contra *L. innocua* é classificada como extremamente forte, porém contra *P. aeruginosa* apresentou atividade mais fraca.

Segundo Dorman e Deans (2000) a estrutura química dos componentes presentes nos óleos essenciais influencia no seu modo de ação e na sua atividade antibacteriana. No caso dos óleos empregados no presente trabalho, *O. gratissimum* apresenta o eugenol como composto majoritário (FREIRE *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 1999; SIMON *et al.*, 1999; VIEIRA *et al.*, 2001). Por outro lado, os compostos majoritários presentes no óleo essencial de *T. vulgaris* são o timol, em maior concentração, seguido pelo carvacrol (COSENTINO *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2005; WEI e SHIBAMOTO, 2010), para o qual foi confirmada a importância da presença do grupamento hidroxila para sua ação bactericida, causando rompimento da membrana e liberação do conteúdo celular interno. No entanto, estes compostos demonstraram agir de forma diferente em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo as Gram positivas mais susceptíveis (BAJPAI *et al.*, 2012; DORMAN e DEANS, 2000; ULTEE *et al.*, 2002).

Também HELANDER *et al.* (1998) observaram que o timol e o carvacrol atuaram na desintegração da membrana externa de bactérias Gram-negativas, resultando na liberação de lipopolissacarídeos (LPS) e no aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP. Em bactérias Gram-positivas, os autores observaram que esses compostos também acometeram a membrana celular, ocorrendo dissolução da camada fosfolipídica e associação entre as cadeias de ácidos graxos, resultando em uma expansão, desestabilização e aumento da fluidez da membrana, provocando por consequência uma permeabilidade da membrana

plasmática para prótons e íons potássio devido a estas mudanças da composição lipídica (ULTEE *et al.*, 2000; ULTEE *et al.*, 2002).

Em relação as bactérias Gram-negativas, o gênero *Pseudomonas*, principalmente *P. aeruginosa* tem sido descrita como a menos sensível à ação de óleos essenciais (DORMAN e DEANS, 2000; RUBERTO *et al.*, 2000; PINTORE *et al.*, 2002; SENATORE *et al.*, 2000; TSIGARIDA *et al.*, 2000; WILKINSON *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os de Gutierrez *et al.* (2009), onde cepas de *Listeria* foram mais sensíveis ao óleo essencial de tomilho do que bactérias deteriorantes de alimentos, como *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*. Ainda, Borugă *et al.* (2014) demonstraram que entre as cepas estudadas de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, *P. aeruginosa* apresentou menor sensibilidade ao uso do óleo essencial de tomilho em comparação aos demais micro-organismos, corroborando o estudo de Lambert *et al.* (2001) que constataram que foi evidente que *P. aeruginosa* foi menos sensível a ação de timol e carvacrol (compostos presentes no óleo essencial de tomilho) do que *S. aureus*.

A partir dos resultados de MIC e MBC encontrados para *L. innocua* e *P. aeruginosa* foi realizado uma avaliação sensorial informal como descrito no item 4.3.1, as 4 pessoas presentes no teste verificaram que a amostra de carne de frango adicionada de 1,5 mg/g da BOE apresentou sabor acentuado e a amostra com concentração de 100 mg apresentou sabor sutil. Assim, foi estabelecido continuar os experimentos com as concentrações de 0,75 mg e 1,20 mg/g.

5.2 Efeitos da adição da BOE na carne de peito de frango e a sobrevivência de *L. innocua* e *P. aeruginosa*.

As curvas de sobrevivência de *L. innocua* e *P. aeruginosa* foram avaliadas em carne de peito de frango, com nível de inóculo de 10^8 UFC/g, utilizando duas concentrações da BOE, ou seja, 0,75 mg/g e 1,20 mg/g de carne. A avaliação foi feita através da contagem de UFC por plaqueamento em superfície, a partir da amostragem da carne inoculada com os micro-organismos, armazenada sob refrigeração (3 °C) durante 42 dias. Foram realizados três ensaios independentes, com amostras em duplicata, totalizando 15 amostragens semanais/micro-organismo. Os resultados estão apresentados na Figura 6 (*L. innocua*) e Figura 7 (*P. aeruginosa*).

Foi utilizado o teste de Dunnett para analisar se havia diferença estatística entre os tratamentos e os controles. O teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade foi utilizado para comparar as diferenças entre os tratamentos.

Os resultados mostraram que a BOE nas concentrações empregadas de 0,75 e 1,20 mg/g de carne, causou uma diminuição gradativa do número de células viáveis de *L. innocua* no decorrer do tempo em comparação ao controle, onde houve um aumento do número de células viáveis de 1,07 log UFC/g de carne após 42 dias. Em contraste, na presença da BOE ocorreu uma redução de 0,89 log UFC/g e 1,16 log UFC/g de carne em relação a concentração inicial do inóculo, quando utilizadas 150 mg e 240 mg da blenda, respectivamente.

Assim, segundo Osaili *et al.* (2020), por ser um micro-organismo que tolera baixas temperaturas, não é surpreendente que *L. monocytogenes* usualmente cresça em temperatura em torno de 4 °C em uma variedade de alimentos, uma vez que este comportamento é amplamente observado em diversos trabalhos.

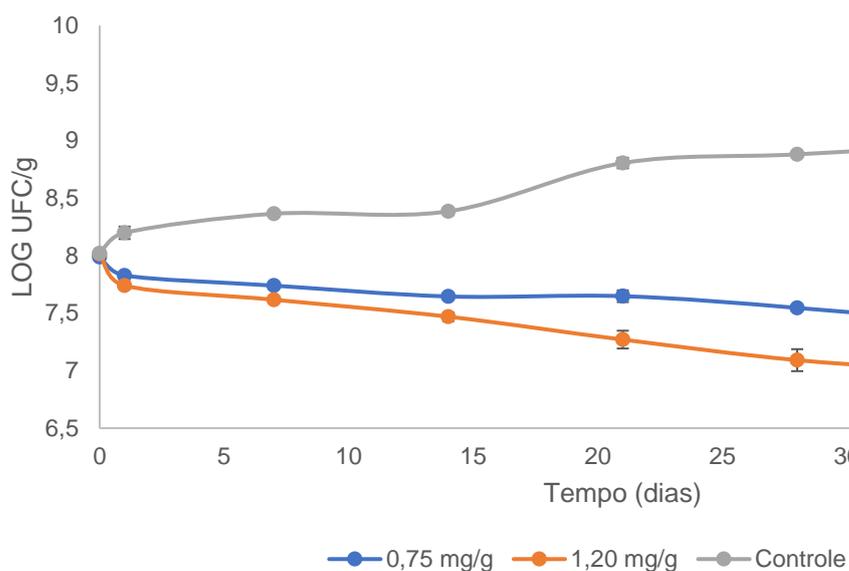


Figura 6. Curva de sobrevivência de *L. innocua* inoculada em carne de peito de frango com e sem adição da BOE, avaliados por 42 dias à 3°C.

As contagens de *L. innocua* apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (0,75 e 1,20 mg) desde o tempo de 1 dia de estocagem até 42 dias, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade ($p < 0.05$).

Tabela 3. Contagem de *L. innocua* (log UFC/g) em carne de peito de frango adicionado de 0,75 e 1,20 mg/g de BOE, avaliados por 42 dias à 3°C.

Tempo (dias)	<i>L. innocua</i> (log UFC/g)		
	0,75 mg	1,20 mg	Controle
0	7,99 ^a ± 0,01	8,01 ^a ± 0,02	8,02 ± 0,03
1	7,83 ^a ± 0,03	7,74 ^b ± 0,03	8,20 ± 0,050
7	7,74 ^a ± 0,01	7,62 ^b ± 0,01	8,36 ± 0,02
14	7,65 ^a ± 0,02	7,47 ^b ± 0,04	8,39 ± 0,03
21	7,65 ^a ± 0,05	7,27 ^b ± 0,08	8,81 ± 0,05
28	7,55 ^a ± 0,03	7,09 ^b ± 0,10	8,88 ± 0,03
36	7,38 ^a ± 0,13	6,97 ^b ± 0,04	8,98 ± 0,03
42	7,11 ^a ± 0,13	6,85 ^b ± 0,03	9,09 ± 0,04

As médias com letras diferentes na mesma linha indicam que apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a um nível de significância $p < 0,05$.

Estudos previamente realizados demonstraram o forte efeito da ação de óleos essenciais e seus compostos como eugenol, tomilho, cravo e orégano contra *L. monocytogenes* (BURT *et al.*, 2004). Gouveia *et al.* (2016) obtiveram a população de *L. monocytogenes* reduzida em 1 log UFC/g ao utilizar óleo essencial de Tomilho em amostras de carne bovina quando comparado a amostra controle durante o tempo de armazenamento de 28 dias a 2 °C.

L. monocytogenes possui capacidade de sobreviver e até mesmo crescer em condições adversas, como ambientes secos, tanto em temperatura de refrigeração como em altas temperaturas, baixo oxigênio e pH, e alto teor de sal. Estas características permitem que essa bactéria seja amplamente encontrada em diversos ambientes e matrizes incluindo produtos alimentícios como pescado, carnes, laticínios, vegetais e alimentos prontos para o consumo ((DUZE *et al.*, 2021; MATEREKE e OKOH, 2020; NICAOGÁIN e O'BYRNE, 2016; WIKTORCZYK-KAPISCHKE *et al.*, 2021).

Fратиanni *et al.* (2010) constataram que o óleo essencial de tomilho reduziu as contagens da contagens de micro-organismos totais presentes naturalmente na carne de peito de frango quando armazenada a 4 °C, após 21 dias de armazenamento a amostra controle apresentava contagem de $1,17 \times 10^5$ UFC/mL, e a amostra tratada com óleo essencial de tomilho continha $4,0 \times 10^4$. Além de limitar o crescimento de *E. coli*, evitando assim a deterioração da carne de frango e prolongando a vida útil do

produto. Ainda, Osaili *et al.* (2020) verificaram uma diminuição de 0,6 log UFC/g na contagem de *L. monocytogenes* em frango marinado adicionado de 2% de timol, quando armazenado a 4 °C por 7 dias.

O aumento de *L. monocytogenes* também foi reportado por Pirbalouti *et al.* (2010) ao analisarem salsichas de frango armazenadas a 4 °C, porém, os autores observaram que nas amostras adicionadas de *T. daenensis* ocorreram reduções significativas na contagem de *L. monocytogenes* de 8,8 para 2,6 log UFC/g.

Todavia, contrário aos resultados apresentados neste trabalho e demais trabalhos citados, Kerekes *et al.* (2016) não observaram redução significativa na contagem de *L. monocytogenes* em filés de peito de frango adicionados de timol, quando armazenados a 6 °C até 24 h em relação a amostra controle.

Para *P. aeruginosa*, os resultados do teste de Dunnett mostraram que houve diferença significativa ($p < 0.05$) entre a amostra controle e a amostra de 0,75 mg/g a partir do ponto de 7 dias até os 36 dias. Todavia, quando testada a concentração de 1,20 mg/g desde tempo 1 até o término do experimento (42 dias) houve diferenças significativas ($p < 0.05$) entre essa concentração e a amostra controle, resultando em uma redução de 0,74 log UFC/g do micro-organismo na carne, como demonstrado na Figura 7.

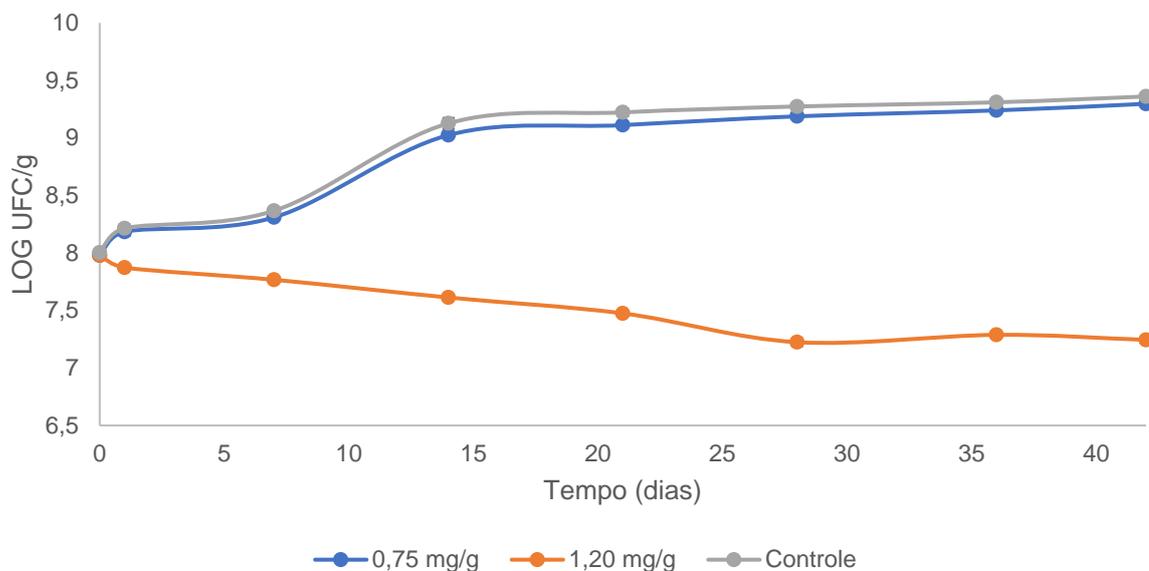


Figura 7. Curva de sobrevivência de *P. aeruginosa* inoculada em carne de peito de frango, com e sem adição da BOE, avaliados por 42 dias à 3°C.

Ao verificar se há diferença significativa entre as amostras de 0,75 mg/g e 1,20 mg/g por meio do Teste de Tukey a 5 % de probabilidade, os resultados indicaram que apenas no tempo 0 não houve diferença significativa entre as amostras analisadas, como representado na Tabela 4.

Tabela 4. Contagem de *P. aeruginosa* (log UFC/g) em carne de peito de frango adicionado de 0,75 e 1,20 mg/g de BOE, avaliados por 42 dias à 3°C.

Tempo	<i>P. aeruginosa</i> (log UFC/g)		
	0,75 mg	1,20 mg	Controle
0	7,98 ^a ± 0,02	7,98 ^a ± 0,00	8,00 ± 0,02
1	8,18 ^a ± 0,04	7,87 ^b ± 0,02	8,21 ± 0,03
7	8,31 ^a ± 0,01	7,77 ^b ± 0,01	8,37 ± 0,01
14	9,02 ^a ± 0,01	7,61 ^b ± 0,02	9,13 ± 0,05
21	9,11 ^a ± 0,01	7,48 ^b ± 0,02	9,22 ± 0,03
28	9,19 ^a ± 0,01	7,22 ^b ± 0,03	9,27 ± 0,03
36	9,24 ^a ± 0,07	7,29 ^b ± 0,01	9,31 ± 0,02
42	9,30 ^a ± 0,02	7,24 ^b ± 0,00	9,36 ± 0,02

As médias com letras diferentes na mesma linha indicam que apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a um nível de significância $p < 0,05$.

O gênero *Pseudomonas*, principalmente *P. aeruginosa* são o grupo de bactéria menos susceptíveis a ação de OEs e demais componentes bioativos de origem vegetal, sendo seus efeitos considerados fracos (BURT, 2004; CEYLAN e FUNG, 2004).

Os resultados encontrados neste trabalho utilizando a blenda dos óleos essenciais de *T. vulgaris* e *O. gratissimum* foram mais eficazes e promissores do que os encontrados por Goswami *et al.* (2009), onde de acordo com os autores o crescimento de *P. aeruginosa* inoculada em amostras de frango e adicionadas de OE de tomilho (0,5% (v/v) com uma solução de revestimento de amido de ervilha pré-gelatinizado) armazenadas a 4 °C por 12 dias, não diferiu dos resultados obtidos com os outros micro-organismos inoculados sem a adição do óleo essencial, sendo estes *Salmonella enterica* serovars Typhimurium e Heidelberg, *Campylobacter jejuni* e *L. monocytogenes*.

Apesar de vários autores encontrarem reduções das populações tanto de *L. monocytogenes* quanto de outros micro-organismos, segundo Hyldgaard *et al.* (2012)

devido à alta concentração de proteína encontrada na carne de frango pode ocorrer um efeito antagonista na ação antimicrobiana dos OEs, sendo necessário aumentar a concentração de OE para superar essa interferência.

O uso de óleos essenciais como conservantes naturais de alimentos é interessante visto às demandas dos consumidores por alimentos com teores reduzidos de conservantes sintéticos. No entanto, possui a desvantagem quanto a limitação de seu uso, devido as concentrações efetivas utilizadas serem na maioria das vezes altas, o que pode alterar o sabor original dos alimentos (WANG *et al.*, 2011).

Além disso, a eficácia de OEs e extratos vegetais têm sido verificada contra patógenos associados a produtos cárneos. Contudo, alguns autores registraram reduziram efeitos antimicrobianos contra esses patógenos em produtos cárneos contaminados, devido ao efeito do seu alto teor de gordura sobre a aplicação de OEs, bem como a lipossolubilidade dos OEs quando comparados com as partes aquosas dos alimentos (BURT, 2004; LIS-BALCHIN *et al.*, 2003)

Portanto, surge a necessidade de se buscar alternativas para seu uso, como a combinação desses óleos com outros compostos ou métodos (alta pressão isostática, campos elétricos pulsados, controle de temperatura, entre outros) que causem efeito sinérgico, ocasionando resultados melhores (ESPINA *et al.*, 2013; ESTEVE e FRIGOLA, 2007; RENDUELES *et al.*, 2011).

Assim, como os resultados indicam que para ambos os micro-organismos a concentração de 240 mg/g da BOE foi mais eficaz na redução de células viáveis, e a concentração de 150 mg não apresentou resultados satisfatórios, principalmente para *P. aeruginosa*, a concentração de 240 mg/g foi escolhida para ser utilizada nos ensaios de aplicação da BOE em combinação com alta pressão.

5.3 Efeitos da combinação da adição da BOE e API na carne de peito de frango e a sobrevivência de *L. innocua* e *P. aeruginosa*.

Em relação a cor, pela carne de frango possuir baixo teor de mioglobina, sendo assim considerada uma “carne branca”, a cor do peito de frango cru é levemente rosada, como visto na Figura 4 da sessão 4.3.3 deste trabalho. Assim, quando aplicado o processamento por alta pressão a perda dos valores de a^* (vermelho) é menos pronunciada nas carnes de aves do que na carne bovina, devido à

desnaturação da mioglobina que esta possui em alta concentração (JUNG *et al.*, 2003; MARCOS *et al.*, 2010).

Mesmo a alteração de cor da carne de frango sendo menos pronunciada do que em carne bovina, quando aplicado processamento de alta pressão isostática utilizando pressões de 500 e 600 MPa foi observada modificação da cor, que pode ser percebida pela comparação das figuras 4 e 5 deste trabalho. De acordo com Kruk *et al.* (2011) além da alteração de cor, também ocorre o aumento da perda de peso por cozimento e modificações na textura da carne, apresentando aumento de dureza, coesividade e mastigabilidade. Del Olmo *et al.* (2010) relataram que, ao submeter a carne de frango ao tratamento por alta pressão utilizando pressões em ou acima de 400 MPa, obtiveram uma carne com aparência opaca/pálida.

Em relação a análise microbiológica, as amostras de carne de frango foram inoculadas com 10^8 UFC/g do respectivo micro-organismo a ser analisado, adicionado de 1,20 mg/g da BOE, processado a 500 ou 600 MPa \times 25 °C \times 5 min, e posteriormente armazenadas à 3 °C por 42 dias. As curvas de sobrevivências de *L. innocua* e *P. aeruginosa* estão representadas nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

Todas as amostras foram inoculadas e após 24 h foram analisadas e os resultados apresentados no tempo 0. O Teste de Tukey a um nível de 5 % de probabilidade confirma que não há diferença significativa entre as amostras inoculadas (Tabela 5 e 6). Assim foram aplicados os tratamentos de adição da BOE e alta pressão.

Para *L. innocua* o teste de Dunnett apresentou diferença significativa entre a amostra controle e demais tratamentos. Apesar das amostras de 500 MPa e 600 MPa apresentarem crescimento no tempo 1 dia, de acordo com o Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 5).

As amostras apresentaram contagem abaixo do limite de detecção do método até 14 dias de armazenamento. A primeira amostra a apresentar contagem foi a submetida a 500 MPa aos 21 dias, e a última a submetida a 600 MPa + BOE aos 42 dias.

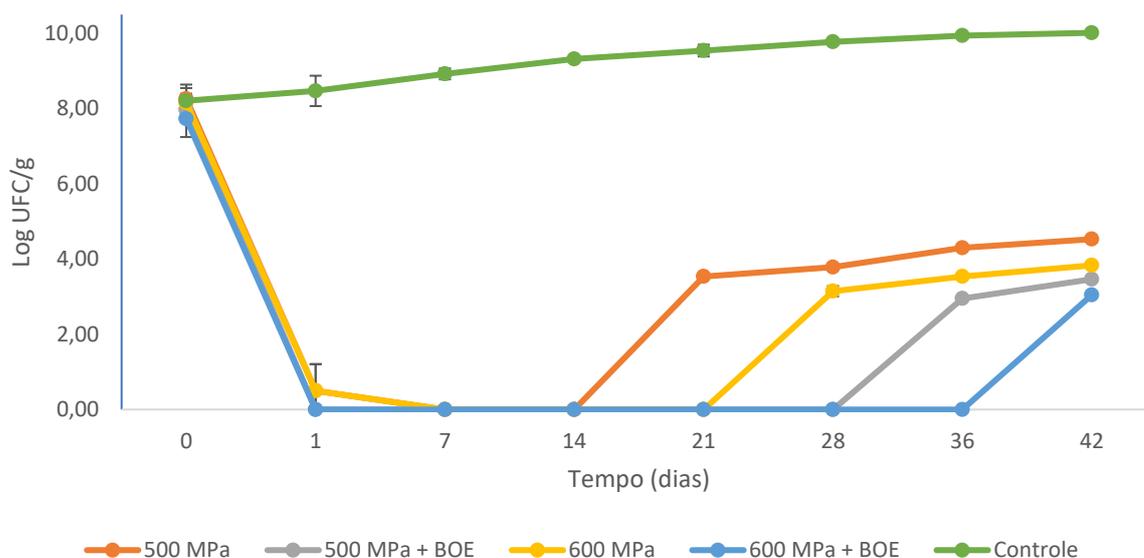


Figura 8. Curva de inativação e crescimento de *L. innocua* inoculada em carne de peito de frango com e sem adição da BOE e submetida ao processamento por alta pressão isostática (500 ou 600 MPa x 25 °C x 5 min), avaliados por 42 dias à 3°C.

Tabela 5. Contagem de *L. innocua* (log UFC/g) em carne de peito de frango aplicado tratamento de alta pressão com e sem adição de BOE, avaliados por 42 dias à 3°C.

<i>L. innocua</i> (log UFC/g)					
Tempo	500 MPa	500 MPa + BOE	600 MPa	600 MPa + BOE	Controle
0	8,26 ^a ± 0,38	7,97 ^a ± 0,22	8,16 ^a ± 0,24	7,73 ^a ± 0,49	8,21 ± 0,34
1	0,50 ^a ± 0,71	<math><2^a</math> ± 0,00	0,50 ^a ± 0,71	<math><2^a</math> ± 0,00	8,47 ± 0,40
7	<math><2^a</math> ± 0,00	<math><2^a</math> ± 0,00	<math><2^a</math> ± 0,00	<math><2^a</math> ± 0,00	8,92 ± 0,15
14	<math><2^a</math> ± 0,00	<math><2^a</math> ± 0,00	<math><2^a</math> ± 0,00	<math><2^a</math> ± 0,00	9,32 ± 0,08
21	3,54 ^a ± 0,06	<math><2^b</math> ± 0,00	<math><2^b</math> ± 0,00	<math><2^b</math> ± 0,00	9,54 ± 0,16
28	3,79 ^a ± 0,03	<math><2^c</math> ± 0,00	3,15 ^b ± 0,14	<math><2^c</math> ± 0,00	9,78 ± 0,07
36	4,30 ^a ± 0,00	2,95 ^c ± 0,01	3,54 ^b ± 0,02	<math><2^d</math> ± 0,00	9,94 ± 0,05
42	4,53 ^a ± 0,09	3,47 ^c ± 0,02	3,84 ^b ± 0,02	3,05 ^d ± 0,05	10,01 ± 0,04

As médias com letras diferentes na mesma linha indicam que apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a um nível de significância $p < 0,05$.

Kruk *et al.* (2011) encontraram resultados similares ao investigarem o efeito da aplicação da alta pressão utilizando parâmetros de processo de 300, 450 ou 600 MPa x 5 min x 15 ± 3 °C. Os autores verificaram que a pressão de 300 MPa não foi suficiente para inativação de *S. Typhimurium*, *E. coli* e *L. monocytogenes*, porém as pressões de 450 e 600 MPa foram eficazes na inativação completa de *E. coli* e *L.*

monocytogenes, sendo que para *L. monocytogenes* as contagens permaneceram abaixo do limite de detecção (100 UFC/g) nos 14 dias de armazenamento em que o estudo foi conduzido.

Vale ressaltar que, a resistência de bactérias patogênicas à Alta Pressão depende de alguns fatores referentes às características morfológicas e demais características, como parede celular, fase de crescimento, cepa e espécies da bactéria (JOFRÉ *et al.*, 2010; PATTERSON, 2005).

Patterson *et al.* (2011) ao avaliarem 13 isolados diferentes de *L. monocytogenes* inoculados em frango cozido e submetidos a 600 MPa por 2 min a 20 °C, constataram que houve uma variação na resposta ao tratamento, sendo que apenas 8 isolados foram reduzidos em 4 log ou mais, a cepa mais resistente não apresentou redução significativa e a mais sensível foi reduzida em 5,64 log. Esta variação quanto a sensibilidade de cepas de *L. monocytogenes* a alta pressão também foi verificada por Bruschi *et al.* (2017).

Em outros trabalhos também foi verificada uma resistência relativa à pressão por algumas cepas de *L. monocytogenes*, resultando em recomendações de tratamento de pressão a 600 MPa utilizando tempos de 4 min ou superior, a depender do alimento (GASSIOT e MASOLIVER, 2010; YOUART *et al.*, 2010). Tal recomendação baseia-se no fato de que a maioria das bactérias em fase vegetativa são inativadas por pressões a 600 MPa e temperatura ambiente o que não ocorre com endósporos que requer pressões e temperatura superiores. Por outro lado, quando se deseja a inativação de esporos, o processo de alta pressão deve ser realizado a pressões >600MPa associados a temperaturas > 100°C (BLACK *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2014).

Chuang *et al.* (2020) avaliaram a combinação do uso de alta pressão e carvacrol em frango cru moído contra *L. monocytogenes* e observaram que ao aplicar uma pressão de 300 MPa por 10 min em células estressadas de *L. monocytogenes* obtiveram um aumento na sua população ao longo do período de armazenamento, sendo este conduzido à 4 °C por 7 dias. Ao combinar esses mesmos parâmetros com a adição de carvacrol, foi observada redução bacteriana abaixo do limite de detecção. Resultados semelhantes a estes foram encontrados com aumento da pressão para 350 MPa e reduzida a concentração de carvacrol. Desse modo, os autores afirmaram que a alta pressão e o carvacrol exerceram efeitos sinérgicos na inativação de *L.*

monocytogenes em carne de frango moída, sendo que, o carvacrol suprimiu o crescimento e a recuperação das células bacterianas quando aplicada alta pressão.

O efeito do carvacrol nas bactérias está relacionado a sua capacidade de afetar a fração lipídica das membranas plasmáticas das mesmas ocasionando o aumento da permeabilidade da célula (BALLESTER – COSTA *et al.*, 2013). No trabalho realizado por Chuang *et al.* (2020), o uso de carvacrol isolado não afetou o crescimento *Salmonella* e *L. monocytogenes* em carne de frango *in natura*, porém agiu de forma sinérgica quando associado a aplicação de alta pressão isostática. Essa sinergia pode ser atribuída a ação bactericida da alta pressão, isto é, devido a desnaturação de proteínas acarretando a inativação de enzimas (BARBOSA-CANOVAS *et al.* 1995), limitação da viabilidade celular provocada pela dissociação de ribossomos (ABE, 2007), alteração da estrutura celular incluindo sua lise (HSU *et al.* 2014; MOUSSA *et al.* 2009), resultando em uma melhor ação antimicrobiana do carvacrol.

Para *P. aeruginosa*, de acordo com o Teste de Dunnett houve diferença significava entre a amostra controle e as demais amostras de tratamentos analisadas. As amostras de tratamento foram analisadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

As amostras apresentaram contagens abaixo do limite de detecção do método até os 14 dias. Aos 21 dias, a amostra aplicada de 500 MPa apresentou crescimento, diferindo das demais estatisticamente. Por fim, aos 42 dias de armazenamento a amostra que recebeu aplicação de 600 MPA combinada à BOE apresentou crescimento.

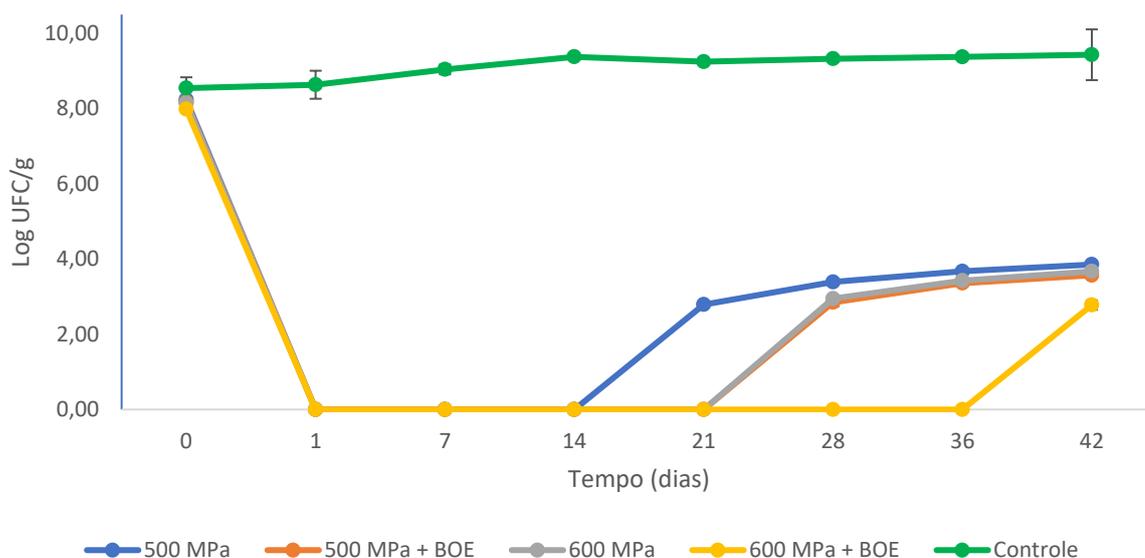


Figura 9. Curva de inativação e crescimento de *P. aeruginosa* inoculada em carne de peito de frango com e sem adição da BOE e submetida ao processamento por alta pressão isostática (500 ou 600 MPa × 25 °C × 5 min), avaliados por 42 dias à 3°C.

Tabela 6. Contagem de *P. aeruginosa* em carne de peito de frango aplicado tratamento de alta pressão com e sem adição de BOE, avaliados por 42 dias à 3°C.

<i>P. aeruginosa</i> (log UFC/g)					
Tempo	500 MPa	500 MPa + BOE	600 MPa	600 MPa + BOE	Controle
0	8,23 ^a ± 0,01	8,17 ^a ± 0,05	8,15 ^a ± 0,18	7,99 ^a ± 0,03	8,54 ± 0,29
1	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	8,63 ± 0,37
7	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	9,04 ± 0,13
14	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	9,38 ± 0,08
21	2,79 ^a ± 0,02	0,00 ^b ± 0,00	0,00 ^b ± 0,00	0,00 ^b ± 0,00	9,25 ± 0,08
28	3,39 ^a ± 0,04	2,85 ^c ± 0,11	2,95 ^c ± 0,06	0,00 ^b ± 0,00	9,32 ± 0,08
36	3,67 ^b ± 0,08	3,36 ^c ± 0,09	3,43 ^{bc} ± 0,07	0,00 ^a ± 0,00	9,37 ± 0,05
42	3,86 ^b ± 0,05	3,57 ^d ± 0,03	3,67 ^b ± 0,08	2,78 ^a ± 0,12	9,43 ± 0,67

As médias com letras diferentes na mesma linha indicam que apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a um nível de significância $p < 0,05$.

Del Olmo *et al.* (2012) avaliaram o efeito da aplicação de alta pressão utilizando parâmetros de 500 MPa por 10 min à 10 °C em filés de peito de frango inoculados com *P. fluorescens* e posteriormente mantidos a 5 °C por 9 dias. Esta condição de processo reduziram a contagem de *P. fluorescens* abaixo do limite de detecção, no entanto, contagens de 1,90 e 2,84 log UFC/g foram observadas após 3 e 9 dias de estocagem, respectivamente.

Chuang e Sheen (2022) enfatizam que bactérias Gram positivas geralmente são mais sensíveis ao estresse provocado pela combinação de API e OEs do que as bactérias Gram negativas, devido a diferenças na estrutura celular.

Assim, para ambos os micro-organismos analisados, o melhor tratamento foi aplicação de API a 600 MPa × 25 °C × 5 min combinado com 240 mg da BOE, uma vez que não apresentou contagem de *L. innocua* e *P. aeruginosa* após 36 dias de armazenamento sob refrigeração a 3 °C.

Estes resultados são promissores, sendo uma nova alternativa de comercialização de cortes de frango que são comumente distribuídos congelados.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos para a MIC e a MBC, a blenda 1:3 dos óleos essenciais de *T. vulgaris* e *O. gratissimum* foi mais efetiva contra a cepa de *L. innocua* do que contra *P. aeruginosa*.

A adição da BOE foi capaz de reduzir a contagem das bactérias estudadas, principalmente *L. innocua* onde houve uma redução de 0,89 log UFC/g e 1,16 log UFC/g quando utilizada respectivamente, 0,75 mg/g e 1,20 mg/g da blenda e assim melhorar a segurança microbiana da carne de peito de frango durante 42 dias de armazenamento a 3 °C quando comparado a amostra controle, sendo a concentração de 1,20 mg/g a mais efetiva no controle dos micro-organismos avaliados. Essa concentração foi capaz de manter a contagem de *L. innocua* e *P. aeruginosa* abaixo do limite de detecção por pelo menos 36 dias à 3 °C, quando combinada com a aplicação de alta pressão isostática a 600 MPa × 25 °C × 5 min, indicando que essas condições foram as mais eficazes tanto no controle de *L. innocua* quanto de *P. aeruginosa*.

Esses resultados demonstram que a associação dos métodos foi capaz de reduzir a população microbiana e estender a vida de prateleira da carne de peito de frango em relação ao controle.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram o potencial da aplicação de óleos essenciais combinados à alta pressão isostática no controle de contaminantes da carne de peito de frango, sendo indicativos do comportamento de *L. innocua* e *P. aeruginosa* frente aos tratamentos e parâmetros específicos utilizados. Testes adicionais são ainda necessários antes da utilização e aplicação industrial.

7. REFERÊNCIAS

AHA. American Heart. **Eat More Chicken, Fish and Beans**. Dallas, Texas. 2014. Disponível em: <http://www.heart.org/HEARTORG/HealthyLiving/HealthyEating/Nutrition/Eat-More-Chicken-Fish-and-Beans_UCM_320278_Article.jsp#.W3HfdOhKjIV>. Acesso em: 08 ago 2018.

AKINYEMI, K. O.; OLUWA, O. K.; OMOMIGBEHIN, E. O. Antimicrobial activity of crude extracts of three medicinal plants used in South-West Nigerian folk medicine on some food borne bacterial pathogens. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 3, n.4, p. 13–22, 2006.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168–4170, 2001.

AL-REZA, S. M.; RAHMAN, A.; LEE, J.; KANG, S. C. Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujuba* in inhibiting food-borne pathogens. **Food Chemistry**, v. 119, p. 981-986, 2010.

ALVARADO, H. M. B. **Aplicação de um sistema de classificação de carcaças e cortes e efeito pós abate na qualidade de cortes de frango de corte criados no sistema alternativo**. 2004. 82f. Dissertação (mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BAJOVIC, B.; BOLUMAR, T.; HEINZ, V. Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products. **Meat Science**, v. 92, p. 280–289, 2012.

BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: a review. **Food Research International**, v. 45, p. 722-734, 2012.

BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; SUN C. K. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n.2, p. 117-22, 2008.

BALASUBRAMANIAM, V. M.; FARKAS, D.; TUREK, E. J.. Preserving foods through high-pressure processing. **Food Technology Chicago**, v. 62, n. 11, p. 32–38, 2008.

BALASUBRAMANIAM, V. M.; MARTÍNEZ-MONTEAGUDO, S. I.; GRUPTA, T. Principles and Application of High Pressure–Based Technologies in the Food Industry. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, p. 35-62. 2015.

BALLESTER-COSTA, C.; SENDRA, E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical composition and *in vitro* antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 304-311. 2013.

BARACHO, M. S.; CAMARGO, G. A.; LIMA, A. M. C.; MENTEM, J. F.; MOURA, D. J.; MOREIRA, J.; NAAS, I. A. Variables impacting poultry meat quality from production to pre- slaughter: a review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 4, p. 201-12, 2006.

BARBOSA-CANOVAS, G.V.; POTHAKAMURY, U.R.; SWANSON, B.G. State of the art technologies for the stabilization of foods by non-thermal processes: physical methods, In: Barbosa-Canovas, G.V.; Welti-Chanes, J. **Food preservation by moisture control: fundamentals and applications**. Lancaster, PA: Technomic Publishing. p. 493–532. 1995.

BARROUG, S., CHAPLE, S., BOURKE, P. Combination of natural compounds with novel non-thermal technologies for poultry products: A Review. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 1-15, 2021.

BERTSCH, D.; MUELLI, M.; WELLER, M.; URUTY, A.; LACROIX, C.; MEILE, L. 2012. Antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance gene transfer analysis of foodborne, clinical, and environmental *Listerias* pp. isolates including *Listeria monocytogenes*. **Microbiology Open**, v. 3, n. 1, p. 118–127, 2014.

BIALONSKA, D.; RAMNANI, P.; KASIMSETTY, S. G.; MUNTHA, K. R.; GIBSON, G. R.; FERREIRA, D. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 175–182. 2010.

BLACK, E. P.; SETLOW, P.; HOCKING, A. D.; STEWART, C. M.; KELLY, A. L.; HOOVER, D. G. Response of spores to high-pressure processing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 6, p. 103–119, 2007.

BLAIR, J. M. A; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 42– 51. 2015.

BLISKA, F. M. M. Qualidade na cadeia produtiva da carne bovina: elaboração e implementação de um sistema de controle. **Boletim de Conexão Industrial do Centro de Tecnologia de Carnes do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 9-10, p. 12-16, 2000.

BORUGĂ, O.; JIANU, C.; MIȘCĂ, C.; GOLEȚ, I.; GRUIA, A.T.; HORHAT, F.G. *Thymus vulgaris* essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity. **Journal of Medicine and Life**, v. 7, p. 56–60, 2014.

BOU, R.; CODONY, R.; TRES, A.; DECKER, E. A.; GUARDIOLA, F. Dietary Strategies to Improve Nutritional Value, Oxidative Stability, and Sensory Properties of Poultry Products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 800–822, 2009.

BRAGAGNOLO, N. **Aspectos comparativos entre carnes segundo a composição de ácidos graxos e teor de colesterol**. In: II CONFERÊNCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUINA, 2001. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais01cv2_bragagnolo_pt.pdf> . Acesso em: 26 ago. 2021.

BRUSCHI, C.; KOMORA, N.; CASTRO, S.M; SARAIVA, J.; FERREIRA, V.B.; TEIXEIRA, P. High hydrostatic pressure effects on *Listeria monocytogenes* and *L. innocua*: Evidence for variability in inactivation behavior and in resistance to pediocin bachA-6111-2. **Food Microbiology**, v. 64, p. 226-231, 2017.

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

CAGDAS, E.; KUMCUOGLU, S. Effect of grape seed powder on oxidative stability of precooked chicken nuggets during frozen storage. **Journal of food science and technology**, v. 52, p. 2918-2925, 2015.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2580-2595, 2007.

CARLETTI FILHO, Paulo de Tarso. 2005. **Divisão de custos e alimento estratégico de uma cadeia de suprimentos integrada verticalmente: o caso do frango brasileiro**. Dissertação (Mestrado em Economia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. Piracicaba: USP.

CASTELLINI, C.; MUNGAI, C.; DAL BOSCO, A. Effect of organic production system on broiler carcass and meat quality. **Meat Science**, v. 60, n.3, p. 219- 225, 2002.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Listeria (Listeriosis)**. 2021b. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/index.html>>. Acesso em: 6 out. 2021.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Listeria Outbreak Linked to Fully Cooked Chicken**. 2021a. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/precooked-chicken-07-1/index.html>>. Acesso em: 29 set. 2021.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa**. 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/pseudomonas-aeruginosa-508.pdf>>. Acesso em: 13 dez. 2021.

CEYLAN, E.; FUNG, D. Y. C. Antimicrobial activity of spices. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 12, n.1, p. 1–55, 2004.

CHAO, S. C., YOUNG, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 639-649, 2000.

CHARPENTIER, E.; COURVALIN, P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2103–2108, 1999.

CHAVES, A. V.; HE, M. L.; YANG, W. Z.; HRISTOV, A. N.; MCALLISTER, T. A.; BENCHAAAR, C. Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 88, p. 117-122, 2008.

CHEFTEL, J. C.; CULIOLI, J. Effect of high pressure on meat: a review. **Meat Science**, v. 46, p. 211–234, 1997.

CHORIANOPOULOS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; ALIGIANNIS, N.; MITAKU, S.; NYCHAS, G-J; HAROUTOUNIAN, S. A. Essential Oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* Species: Chemical Composition and Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 8261–8267, 2004.

CHUANG, S., SHEEN, S., SOMMERS, C. H., ZHOU, S., SHEEN, L. Y. Survival Evaluation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* on Selective and Nonselective Media in Ground Chicken Meat Subjected to High Hydrostatic Pressure and Carvacrol. **Journal of Food Protection**, v. 83, n. 1, p. 37-44, 2020.

CHUANG, S.; SHEEN, S. High pressure processing of raw meat with essential oils-microbial survival, meat quality, and models: A review. **Food Control**, v. 132, p. 108529, 2022.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of ethnopharmacology**, v. 79, p. 213-220, 2002.

CLSI. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**. 6ª. edição, M7-A6, 23(2), 2003.

CONSIDINE, K. M.; KELLY, A. L.; FITZGERALD, G. F.; HILL, C.; SLEATOR, R. D. High-pressure processing — Effects on microbial food safety and food quality. **FEMS Microbiology Letters**, v. 281, n. 1, p. 1–9, 2008.

CONTRERAS, C. C. J.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K. M. V. A. B.; MIYAGUSKU, L. **Higiene e Sanitização na Indústria de Carnes e Derivados**. São Paulo, Varela, 181p, 2002.

COSENTINO, S.; TUBEROSO, C. I. G.; PISANO, B.; SATTA, M., MASCIA, V., ARZEDI, E., PALMAS, F. In Vitro Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Sardinian *Thymus* Essential Oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 130-135, 1999.

CUEVA, C.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; BARTOLOME, B.; SALAZAR, O.; VICENTE, M. F.; BILLS, G. F. Antibiosis of vineyard ecosystem fungi against food-borne microorganisms. **Research in Microbiology**, v. 162, n.10, p. 1043-1051, 2011.

DEL OLMO, A.; CALZADA, J.; NUÑEZ, M. Effect of lactoferrin and its derivatives, high hydrostatic pressure, and their combinations, on *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas fluorescens* in chicken filets. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 13, p. 51 – 56. 2012.

DEL OLMO, A.; MORALES, P.; AVILA, M.; CALZADA, J.; NUNEZ, M. Effect of single-cycle and multiple-cycle high-pressure treatments on the colour and texture of chicken breast fillets. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 3, p. 441–444, 2010.

DEVLIEGHERE, F.; VERMERIEN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 273-285, 2004.

DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in Membrane Fatty Acids Composition of Microbial Cells Induced by Addition of Thymol, Carvacrol, Limonene, Cinnamaldehyde, and Eugenol in the Growing Media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2745–2749, 2006.

DOBRAVALSKYTE, D.; VENSKUTONIS, P. R.; TALOU, T. Antioxidant properties and essential oil composition of *Calamintha grandiflora* L. **Food Chemistry**, v. 135, n.3, p. 1539-1546. 2012.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n.2, p. 308-316, 2000.

DRAUGHON, F. A. Use of botanicals as biopreservatives in foods. **Food Technology**, v. 58, n.2, p. 20-28, 2004.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L.; DELARMELINA, C. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305–11, 2005.

DUMAY, E.; CHEVALIER-LUCIA, D.; LOPEZ-PEDEMONTE, T. High pressure and food conservation. In: SEBERT, P. **Comparative high pressure biology**. Enfield, NH: Science Publishers. p. 85–121. 2010.

DUZE, S. T.; MARIMANI, M.; PATEL, M. Tolerance of *Listeria monocytogenes* to biocides used in food processing environments. **Food Microbiology**, v. 97, p. 103758, 2021.

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

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Embrapa suínos e aves - Estatísticas**. 2022. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>>. Acesso em: 14 dez. 2022.

ESPINA, L.; GARCÍA-GONZALO, D.; MACKEY, B. M.; PAGÁN, R. Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 23–30, 2013.

ESTEVE, M. J.; FRIGOLA, A. Refrigerated fruit juices: quality and safety issues. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 52, p. 103–139. 2007.

ESTEVEZ, M. Protein carbonyls in meat systems: a review. **Meat science**, v.89, p. 259-79, 2011.

EVRENDILEK, G. A.; BALASUBRAMANIAM, V. M. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in yogurt drink applying combination of high pressure processing and mint essential oils. **Food Control**, v. 22, p. 1435-1441. 2011.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030**. An FAO perspective. 2017. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cb5332en/cb5332en.pdf>. Acesso em 21 abr de 2018.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **World Agriculture: Towards 2015/2030**. An FAO perspective. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/005/y4252e/y4252e05b.htm>>. Acesso em 21 abr de 2018.

FDA - Food and Drug Administration. Food Safety: **Importance for At-Risk Groups**. 2019. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/people-risk-foodborne-illness/food-safety-importance-risk-groups>>. Acesso em: 08 ago. 19.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: Princípios e Práticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

FIGUEIREDO, A.N. **Atividade anti-Salmonella e antioxidante de uma blenda de óleos essenciais para uso nas dietas de frangos de corte**. 2017. 144f. Tese (doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

FILOCHE, S. K.; SOMA, K.; SISSONS, C. H. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n.4, p. 221-225, 2005.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 156–164. 2008.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1343-1349, 2009.

FRANTAMICO, P. M.; BHUNIA, A. K. J.; SMITH, L. Food-borne pathogens: microbiology and molecular biology. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n.24, p. 1180, 2007.

FRATIANNI, F.; MARTINO, L. D.; MELONE, A.; FEO, V. D.; COPPOLA, R.; NAZZARO, F. Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 8, p. 528-535, 2010.

FREIRE, C. M. M.; MARQUES, M. O. M.; COSTA, M. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 161-166, 2006.

FRIEDLY, E. C.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S. C.; ROMAN, M.; O'BRYAN, C.; CHALOVA, V. I. *In vitro* antilisterial effects of citrus oil fractions in combination with organic acids. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 2, 2009.

FRYE, D.M.; ZWEIG, R.; STURGEON, J.; TORMEY, M.; LACAVALIER, M.; LEE, I.; LAWANI, L.; MASCOLA, L. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 943–949, 2002.

- FURTADO, R. **Agrobusiness brasileiro**: a história. São Paulo: ABAG, 2002.
- GARRIGA, M.; AYMERICH, T. Advanced decontamination technologies: High hydrostatic pressure on meat products. In TOLDRÁ, F. **Safety of meat and processed meat**. New York: Springer. p. 183–208. 2009.
- GARRITY, G. M; BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. New York: Springer Science Business Media, 2005.
- GASSIOT, M., MASOLIVER, P. Commercial high pressure processing of ham and other sliced meat products at Esteban Espuña, S.A. In: DOONA, C.D., KUSTIN, K., FEEHERRY, F.E. **Case Studies in Novel Food Processing Technologies**. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd. p. 21-33. 2010.
- GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de Alimentos**: Princípios e Aplicações. São Paulo: Nobel, 2009.
- GODREUIL, S.; GALIMAND, M.; GERBAUD, G.; JACQUET, C.; COURVALIN, P. Efflux pump Lde is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 704–708, 2003.
- GOMILA, M.; PEÑA, A.; MULET, M.; LALUCAT, J.; GARCÍA-VALDÉS, E. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-13. 2015.
- 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, p. 425-431, 2009.
- GOUVEIA, A. R.; ALVES, M.; SILVA, J. A.; SARAIVA, C. The antimicrobial effect of rosemary and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* in sous vide cook-chill beef during storage. **Procedia Food Science**, v. 7, p. 173 – 176, 2016.
- GRANIER, S. A.; MOUBARECK, C.; COLANERI, C.; LEMIRE, A.; ROUSSEL, S.; DAO, T. T.; COURVALIN, P.; BRISABOIS, A. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. **Applied and Environmental Microbiology**, v, 77, p. 2788–2790. 2011.

GUINOISEAU, E.; LUCIANI, A.; ROSSI, P. G.; QUILICHINI, Y.; TERNENGO, S.; BRADESI, P.; BERTI, L. Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina Corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, p. 873-879, 2010.

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

HAN, J. H.; PATEL, D.; KIM, J. E.; MIN, S. C. 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, 2015.

HAUBEN, K. J.; BARTLETT, D. H.; SOONTJENS, C. C.; CORNELIS, K.; WUYTACK, E. Y.; MICHIELS, C. W. *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 945–950. 1997.

HEINZ, V.; BUCKOW, R. Food preservation by high pressure. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 5, p. 73-81, 2010.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3590–3595, 1998.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oil and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 27, p. 273-292, 2005.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994.

HSU, H. Y.; SHEEN, S.; SITES, J.; HUANG, L.; WU, J. S. B. Effect of high pressure treatment on the survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in strawberry puree. **Food Microbiology**, v. 40, p. 25–30, 2014.

HUANG, H. W.; LUNG, H. M.; YANG, B. B.; WANG, C. Y. Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. **Food Control**, v. 40, p. 250–259, 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, p. 1-24, 2012.

HYUN, J. E.; BAE, Y. M.; YOON, J. H.; LEE, S. Y. 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, 2015.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. In: **Microorganisms in Foods 5: Microbiological specifications of food pathogens**. Springer, New York. 1996.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Cocoa, Chocolate and Confectionery. In: **Microorganisms in Foods 7: Microbiological testing in food safety management**. Springer, New York. 2007.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Cocoa, Chocolate and Confectionery. In: **Microorganisms in Foods 8: Use of Data for Assessing Process Control and Product Acceptance**. Springer, New York, p. 241–246. 2011.

IJEH, I. I.; OMODAMIRO, O. D.; NWANNA, I. J. Antimicrobial effects of aqueous and ethanolic fractions of two spices, *Ocimum gratissimum* and *Xylopia aethiopica*. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 953-956. 2005.

ISO – International Organization for Standardization (ISO) 13720:1995. **Meat and meat products – Enumeration of *Pseudomonas spp***, 1 ed. Geneva: ISO. 1995.

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, p. 96-108. 2013.

JOFRÉ, A.; AYMERICH, T.; BOVER-CID, S.; GARRIGA, M. Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic pressure treatments up to 900 MPa. **International Microbiology**, v.13, n. 4, p. 497–503, 2010.

JOFRÉ, A.; AYMERICH, T.; GRÈBOL, N.; GARRIGA, M. Efficiency of high hydrostatic pressure at 600 MPa against food-borne microorganisms by challenge tests on convenience meat products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 924–928, 2009.

JULIÃO, A. M. **Avaliação da composição centesimal e aceitação sensorial da carne de frangos de linhagens comercial e tipo colonial comercializadas em nível varejista**. 2003. 104f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Niterói: Rio de Janeiro, 2003.

JUNG, S.; GHOUL, M.; LAMBALLERIE-ANTON, M. Influence of high pressure on the color and microbial quality of beef meat. **LWT Food Science and Technology**, v. 36, p. 625–631, 2003.

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. 109–116, 2011.

KEREKES, E. B.; VIDÁCS, A.; TÖRÖK, J.J.; GÖMÖRI, C.; PETKOVITS, T.; CHANDRASEKARAN, M.; KADAIKUNNAN, S.; ALHARB, N. S.; VÁGVÖLGYI, C.; KRISCH, J. Anti-listerial effect of selected essential oils and tymol. **Acta Biologica Hungarica**, v. 67, p. 333-343, 2016.

KIM, G. D.; JUNG, E. Y.; LIM, H. J.; YANG, H. S.; JOO, S. T.; JEONG, J. Y. Influence of meat exudates on the quality characteristics of fresh and freeze-thawed pork. **Meat science**, v. 95, p. 323-9, 2013.

KIM, S. Y.; KANG, D. H.; KIM, J. K.; HA, Y. G.; HWANG, J. Y.; KIM, T.; LEE, S. H. Antimicrobial activity of plant extracts against *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 41-46, 2011.

KNORR, D.; HEINZ, V.; BUCKOW, R. High pressure application for food biopolymers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 619–631, 2006.

KOSTAKI, M.; GIATRAKOU, V.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M.G. 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, 2009.

KRUK, Z.A.; YUN, H.; RUTLEY, D. L.; LEE, E. J.; KIM, Y. J.; JO, C. The effect of high pressure on microbial population, meat quality and sensory characteristics of chicken breast fillet. **Food Control**, v. 22, p. 6-12, 2011.

LAMBERT, R.; SKANDAMIS, P.; COOTE, P.; NYCHAS, G.J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453–462, 2001.

LEE, S.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LEISTNER, L.; GORRIS, L. G. M. Food preservation by hurdle technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 41–46. 1995.

LEMES-MARQUES, E. G.; CRUZ, C. D.; DESTRO, M. T. Pheno- and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from southwestern region of the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p. 287-292, 2007.

LEYGONIE, C.; BRITZ, T. J.; HOFFMAN, L. C. Impact of freezing and thawing on the quality of meat: review. **Meat Science**, v. 91, p. 93-98, 2012.

LINCOPAN, N.; TRABULSI, L. R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu. p. 369- 381. 2008.

LIS-BALCHIN, M.; STEYRL, H.; KRENN, E. The comparative effect of novel *Pelargonium* essential oils and their corresponding hydrosols as antimicrobial agents in a model food system. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 60–65, 2003.

LIU, Y.; BETTI, M.; GÄNZLE, M. G. High pressure inactivation of *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, and spoilage microbiota on poultry meat. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 3, p. 497–503, 2012.

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 634-640, 2002.

LOGUE, C. M.; SHERWOOD, J. S.; OLAH, P. A.; ELIJAH, L. M.; DOCKTER, M. R. The incidence of antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. on freshly processed poultry

from US Midwestern processing plants. **Journal of applied microbiology**, v. 94, n.1, p. 16-24, 2003.

LOPEZ, P.; SANCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERIN, C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6939–6946. 2005.

LUQUE-SASTRE, L.; ARROYO, C.; FOX, E. M.; MCMAHON, B. J.; BAI, L.; LI, F.; FANNING, S. Antimicrobial Resistance in *Listeria* Species. **MICROBIOLOGY SPECTRUM**, v. 6, p. 1-23, 2018.

MARCOS, B.; KERRY, J. P.; MULLEN, A. M. High pressure induced changes on sarcoplasmic protein fraction and quality indicators. **Meat Science**, v. 85, n. 1, p. 115–120, 2010.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* measured using a bioimpedimetric method. **Journal of Food Protection**, v. 62, n.9, p. 1017-1023.1999.

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

MATEREKE, L. T.; OKOH, A. I. *Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence: A review. **Pathogens**, v. 9, n.7, p. 1–12, 2020.

MBATA, T. I.; SAIKIA, A. Antibacterial activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* on *Listeria monocytogenes*. **Internet Journal of Food Safety**, v. 7, p. 15-19. 2005.

McPHEE, J. D.; GRIFFITHS, M. W. Psychrotrophic Bacteria - *Pseudomonas* spp. In. FUUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. London, EN: Elsevier by Academic Press. 2011.

MENDES, C.; OPLUSTIL, C.; SAKAGAMI, E.; TURNER, P.; KIFFER, C.; MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC Program Brazil 2002. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 44-51, 2005.

- MIN, B; AHN, D. U. Mechanism of Lipid Peroxidation in meat and meat products -A Review. **Food Science Biotechnology**, v. 14, p. 152-163, 2005.
- MONTANARI, R. Cold chain tracking: A managerial perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 425-431. 2008.
- MOORE, E. R. B.; TINDALL, B. J.; DOS SANTOS, V. A. P. M.; PIEPER, D. H.; RAMOS, J.; PALLERONI, N. J. Nonmedical: *Pseudomonas*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes**. v. 6., ed., New York, NY: Springer. p. 646–703. 2006.
- MORAES, C. S. S.; MARTINS, F. S.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. de; CONCEIÇÃO, E. C. da. 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.
- MOR-MUR, M.; YUSTE, J. **Microbiological Aspects of High Pressure Processing**. In: Emerging Technologies for Food Processing. Academic Press. 2005.
- MORVAN, A.; MOUBARECK, C.; LECLERCQ, A.; HERVÉ-BAZIN, M.; BREMONT, S.; LECUIT, M.; COURVALIN, P.; LE MONNIER, A. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 2728–2731, 2010.
- MOUSSA, M.; ESPINASSE, V.; PERRIER-CORNET, J. M.; GERVAIS, P. Pressure treatment of *Saccharomyces cerevisiae* in low-moisture environments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p.165–174, 2009.
- MURAKAMI, K. T. T.; PINTO, M. F.; PONSANO, E. H. G.; GARCIA NETO, M. Desempenho produtivo e qualidade da carne de frangos alimentados com ração contendo óleo de linhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 4, p. 401-407, 2010.
- NEDOROSTOVA, L.; KLOUCEK, P.; KOKOSKA, L.; STOLCOVA, M.; PULKRABEK, J. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. **Food Control**, v. 20, n.2, p. 57-60, 2009.
- NEVES, P. R; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 4, p. 409-420. 2011.

NICAOGÁIN, K.; O'BYRNE, C. P. The role of stress and stress adaptations in determining the fate of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* in the food chain. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p.1–16, 2016.

OLIVEIRA, T. L. C. de; LEITE JUNIOR, B. R. de C.; RAMOS, A. L.S.; RAMOS, E. M.; PICCOLI, R. H.; CRISTIANINI, M. Phenolic carvacrol as a natural additive to improve the preservative effects of high-pressure processing of low sodium sliced vacuum packed turkey breast ham. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 1297-1308, 2015.

OLIVO, R. **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. Criciúma, SC: Ed. Do Autor, 2006.

ONU - United Nations Organization (UNO). **World Population Prospects 2019**. Disponível em: <https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf>. Acesso em: 12 de abril de 2021.

ONU. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019). World Population Prospects 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/423).

ORDONEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, vol. 2, 2005. 279 p.

ORSI, R. H.; WIEDMANN, M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, p. 5273-5287, 2016.

OSAILI, T. M.; HASAN, F.; DHANASEKARAN, D. K.; OBAID, R. S.; AL-NABULSI, A. A.; AYYASH, M.; KARAM, L.; SAVVAIDIS, I. N.; HOLLEY, R. Effect of active essential oils added to chicken tawook on the behaviour of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 during storage. *International Journal of Food Microbiology*, v. 337, p. 1-7. 2020.

OSÓRIO, M. T. M; OSÓRIO, J. C.S. Condições de abate e qualidade de carne. In: EMBRAPA. (ed) **Curso de Qualidade de carne e dos produtos cárneos**. Bagé/RS: EMBRAPA, v. 4, cap.7, p.77-128, 2000.

PALLERONI, N. J. The Genus *Pseudomonas*. In: Goldman, E.; Green, L. H. **Practical Handbook of Microbiology**. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group p. 231– 242. 2009.

PATTERSON, M. F. Microbiology of pressure-treated foods. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p. 1400–1409, 2005.

PATTERSON, M. F.; KNOERZER, K. **High Pressure Processing**. In: Reference Module in Food Science. Encyclopedia of Food Safety. 2016.

PATTERSON, M. F.; MACKLE, A.; LINTON, M. Effect of high pressure, in combination with antilisterial agents, on the growth of *Listeria monocytogenes* during extended storage of cooked chicken. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1505-1508, 2011.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. das G.; ABREU, L. R. de; MORAIS, A. R. de; GUIMARÃES, G. de L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e o efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n.3, p. 887-893, 2008.

PERRIN, M.; BEMER, M.; DELAMARE, C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5308–5309, 2003.

PINTORE, G.; USAI, M.; BRADESI, P.; JULIANO, C.; BOATTO, G.; TOMI, F.; CHESSA, M.; CERRI, R.; CASANOVA, J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 15– 19, 2002.

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

POYART-SALMERON, C.; CARLIER, C.; TRIEU-CUOT, P.; COURTIEU, A. L.; COURVALIN, P. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. **Lancet**, v. 335, p. 1422–1426, 1990.

RAMASWAMY, V.; CRESENCE, V. M.; REJITHA, J. S.; LEKSHMI, M. U.; DHARSANA, K. S.; PRASAD, S. P.; VIJILA, H. M. *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection, Taiwan**, v.40, p. 4-13, 2007.

RAPOSO, A.; PÉREZ, E.; DE FARIA, C.T.; FERRÚS, M.A.; CARRASCOSA, C. Food Spoilage by *Pseudomonas* spp. – An Overview. In: SINGH, O. V.; HOBOKEN, N. J. **Food Borne Pathogens and Antibiotic Resistanc**. USA: Wiley-Blackwell. p. 41-71. 2016.

RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; NIRANJAN, K.; KNORR, D. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 69–112, 2007.

RENDUELES, E.; OMER, M. K.; ALVSEIKE, O.; ALONSO-CALLEJA, C.; CAPITA, R.; PRIETO, M. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: a review. **LWT- Food Science and Technology**, v. 44, p. 1251–1260. 2011.

RITCHIE, H.; ROSER, M. **Meat and Dairy Production**. 2017. Disponível em:< <https://ourworldindata.org/meat-production>>. Acesso em: 16 ago 2021.

ROCHA, Bárbara Costa Antunes 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.2012.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n.2, p. 235-254. 2005.

ROUGER, A.; TRESSE, O.; ZAGOREC, M. Review: Bacterial contaminants of poultry meat: sources, species, and dynamics. **Microorganisms**, v. 50, n. 5, p. 1-16, 2017.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T.; DEANS, S. G.; DORMAN, H. J. D. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. **Planta Medica**, v. 66, p. 687– 693. 2000.

RYSER, E. T.; DONNELLY, C. W. *Listeria*. In: Downes, F.P. e ITO, k. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association, 2001.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M. V.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. . Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food chemistry**, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. 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.

SAUDERS, B. D.; OVERDEVEST, J.; FORTES, E.; WINDHAM, K.; SCHUKKEN, Y.; LEMBO, A.; WIEDMANN, M. Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 4420-4433, 2012.

SAUDERS, B. D.; WIEDMANN, W. Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. In: Ryser, E. T.; Marth, E. H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 21-53, 2007.

SENATORE, F.; NAPOLITANO, F.; OZCAN, M. Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, p. 186– 189. 2000.

SHEELADEVI, A.; RAMANATHAN, N. Antibacterial activity of plants essential oils against Food Borne Bacteria. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives**, v. 3, n.5, p. 1106-1109, 2012.

SILVA, M. G. V.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; MACHADO M. I. L.; ALENCAR, J. W. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1, p. 32-34, 1999.

SILVA, N. C. C.; BARBOSA, L. SEITO, L. N.; FERNANDES JÚNIOR, A. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. **Natural Product Research**, v. 26, n. 16, p. 1510–1514, 2012.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4 ed. São Paulo: Livraria Varela, p. 262, 2010.

SIM, J.; HOOD, D.; FINNIE, L.; WILSON, M.; GRAHAM, C.; BRETT, M.; HUDSON, J.A. Series of incidents of *Listeria monocytogenes* noninvasive febrile gastroenteritis involving read-to-eat meats. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 409–413, 2002.

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. Effect of oregano essential oil on microbiological and physicochemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 1011-1022. 2001.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n.2, p. 118-122. 1998.

SOKOVIC, M.; GLAMOCLIJAJ, J.; MARIN, P. D.; BRKIC, D.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. **Molecules**, v. 15, p. 7532-7546, 2010.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Biotechnology**, v. 23, p. 136-141, 2012.

SOUZA, H.B.A. **Parâmetro físicos e sensoriais utilizados para avaliação da qualidade da carne de frango**. In: SEMINÁRIO DE AVES E SUÍNOS – AVESUI, 2006, Florianópolis. Anais. São Paulo: Gessuli Agribusiness, 2006. p.91-96.

SOUZA, X. R. **Características de carcaça, qualidade de carne e composição lipídica de frangos de corte criados em sistema de produção caipira e convencional**. Universidade Federal da Lavras, Lavras, 2004.

SOUZA-SOARES, L. A.; SIEWERDT, F. **Aves e ovos**. Pelotas: Ed. Da Universidade UFPEL, 2005. p. 67-76.

STEHLING, E. G.; SILVEIRA, W. D.; LEITE, D. da S. A study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 86-88. 2008.

SUHAJ, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 19. p. 531-537, 2006.

SUMAN, S. P.; JOSEPH, P. Myoglobin chemistry and meat color. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, p. 79–99, 2013.

TAUXE, R. V.; DOYLE, M. P.; KUCHENMULLER, T.; SCHLUNDT, J.; STEIN, C. E. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 16-28, 2010.

TÖPFL, S.; HEINZ, V. New options for targeted product modification. **Fleischwirtschaft International**, v. 3, p. 11–13, 2009.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M. T.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 6, p. 2474–2478, 2005.

TSIGARIDA, E.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G. J. E. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 degrees C. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 901–909, 2000.

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

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F. A.; SMID, E. J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**, v. 174, n. 4, p. 233–238, 2000.

USDA – United States Department of Agriculture. **Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, ready-to-eat siluriformes (fish) and egg products, and environmental samples**. 2017. Disponível em: <<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/MLG-8.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 16 de jan. 2020.

USDA. United States Department of Agriculture. **Foreign Agricultural Service**. 2022. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>>. Acesso em: 14 dez. 2022.

USDA. United States Department of Agriculture. **USDA Agricultural Projections to 2031**. 2019. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>>. Acesso em: 16 mar de 2022.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; GALVÃO, J. A.; AMBROSIO, C. M. S.; GLORIA, E. M.; OETTERER, M. Single and binary applications of essential oils effectively control

Listeria monocytogenes biofilms. **Industrial Crops and Products**, v. 121, p. 452-460. 2018.

VENTURINI, K. S.; SAECINELLI, M. F.; SILVA, L. C. **Características da Carne de Frango**. Universidade Federal do Espírito Santo - UFES Pró-Reitoria de Extensão – Programa Institucional de Extensão, PIE-UFES:01307,2007.

VIEIRA, R. F.; GRAYER, R. J.; PATON, A.; SIMON, J. E. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, p.287-304, 2001.

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

WAGNER, J. R.; AÑÓN, M. C., Effect of freezing rate on the denaturation of myofibrillar proteins. **International Journal Food Science Technology**, v. 20, p. 735–744, 1985.

WANG, S.; MECKLING, K. A.; MARCONE, M. F.; KAKUDA, Y.; TSAO, R. Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 960–968, 2011.

WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant/Lipoxygenase Inhibitory Activities and Chemical Compositions of Selected Essential Oils. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 58, p. 7218–7225, 2010.

WELLER, D.; ANDRUS, A.; WIEDMANN, M.; DEN BAKKER, H. C. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 286-292, 2015.

WESCHE, A. M.; GURTLER, J. B.; MARKS, B. P.; RYSER, E. T. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 1121–1138. 2009.

WIKTORCZYK-KAPISCHKE, N.; SKOWRON, K.; GRUDLEWSKA-BUDA, K.; WAŁECKA-ZACHARSKA, E.; KORKUS, J.; GOSPODAREK-KOMKOWSKA, E. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to the stress factors in the food processing environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, artigo 710085, 2021.

WILKINSON, J. M.; HIPWELL, M.; RYAN, T.; CAVANAGH, H. M. A. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 76–81, 2003.

YAMAZAKI, K.; YAMAMOTO, T.; KAWAI, Y.; INOUE, N. Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. **Food Microbiology**, v. 21, p. 283–289. 2004.

YONEDA, K.; CHIKUMIA, H.; MURATAB, T.; GOTOHB, N.; YAMAMOTOA, H.; GUJIWARAC, H.; NISHINOB, T.; SHIMIZU, E. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, n. 1, p. 125-31, 2005.

YOUART, A. M., HUANG, Y., STEWART, C. M., KALINOWSKI, R. M., LEGAN, J. D. Modelling time to inactivation of *Listeria monocytogenes* in response to high pressure, sodium chloride and sodium lactate. **Journal of Food Protection**, v. 73, p. 1793-1802, 2010.

YUSTE, J.; CAPELLAS, M.; FUNG, D. Y. C.; MOR-MUR, M. Inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens by high pressure processing: evaluation with conventional media and thin agar layer method. **Food Research International**, v. 37, p. 861–866, 2004.

8. ANEXO

8.1 Cadastro de patrimônio genético



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A0E7669

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A0E7669**
 Usuário: **UNICAMP**
 CPF/CNPJ: **46.068.425/0001-33**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Ocimum gratissimum

Título da Atividade: **Uso de antimicrobianos naturais e processamento por alta pressão aplicado em cortes de aves**

Equipe

Marta Cristina Teixeira Duarte	UNICAMP
Joyce de Almeida Carminati	UNICAMP
Marcelo Cristianini	UNICAMP
Adilson Sartoratto	UNICAMP

Data do Cadastro: **03/10/2018 16:17:59**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **16:19 de 03/10/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**