

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

**Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando óleo essencial de
tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e suco de beterraba em pó (*Beta vulgaris* L.,
cultivar *Early Wonder*)**

Letícia Zarnott Lages

Pelotas, agosto de 2019

LETÍCIA ZARNOTT LAGES

Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e suco de beterraba em pó (*Beta vulgaris* L., cultivar *Early Wonder*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador – Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Co-orientadores – Prof^a. Dr^a. Carla Rosane Barboza Mendonça

– Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia dos Santos da Conceição

Pelotas, agosto de 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L174d Lages, Letícia Zarnott

Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando óleo essencial de tomilho (*thymus vulgaris* L.) e suco de beterraba em pó (*beta vulgaris* L., cultivar Early Wonder) / Letícia Zarnott Lages ; Eliezer Avila Gandra, orientador ; Carla Rosane Barboza Mendonça, Rita de Cássia dos Santos da Conceição, coorientadoras. — Pelotas, 2019.

138 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Produtos cárneos. 2. *Escherichia coli*. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Betalaínas. 5. Atividade antimicrobiana. I. Gandra, Eliezer Avila, orient. II. Mendonça, Carla Rosane Barboza, coorient. III. Conceição, Rita de Cássia dos Santos da, coorient. IV. Título.

CDD : 641.1

Agradecimentos

Agradeço a Deus.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos pela possibilidade de realizar o mestrado.

Aos meus pais, Edinei e Sonia, e a minha irmã, Joseane, pelo apoio e incentivo nesta caminhada.

Ao meu orientador Profº Drº Eliezer, por todos os ensinamentos, incentivo, ajuda e paciência.

Às minhas co-orientadoras, Profª Drª Carla e Profª Drª Rita, por todas as ajudas, conhecimentos e por disponibilizar os laboratórios para que eu realizasse as minhas análises.

À Profª Drª Nádia, por disponibilizar o uso do laboratório de Processamento de Origem Animal e a Profª Drª Caroline, por disponibilizar o uso do liofilizador.

Às minhas colegas e amigas, Fernanda e Pérsia, desde o início do mestrado, sempre juntas e enfrentando até o último dia do mestrado.

Às estagiárias, Bruna, Marina, Pâmela e Rafaela, pela ajuda, disponibilidade e pela amizade.

À Profª Drª Caroline e o Profº Drº Fabrizio, por aceitarem participar da banca.

À minha família e amigos, pelo apoio.

Obrigada a todos!

Resumo

LAGES, Letícia Zarnott. **Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e suco de beterraba em pó (*Beta vulgaris* L., cultivar *Early Wonder*)**. 2019. 138 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Ao longo dos últimos anos ocorreu um significativo aumento da preocupação da população em manter uma alimentação mais saudável, com a diminuição do consumo de produtos industrializados, principalmente, por estes apresentarem conservantes sintéticos com potencial carcinogênico. Produtos naturais de plantas, em particular os óleos essenciais e pigmentos, têm sido indicados como alternativas promissoras para inativar patógenos em alimentos e para conferir cor. Dentre os óleos que apresentam comprovada atividade antimicrobiana, se encontra o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*), que é uma planta medicinal, aromática e condimentar da família *Lamiaceae*. A aplicação desse óleo essencial em alimentos como um aditivo natural, individualmente ou associado a outros tratamentos, objetiva impedir o crescimento microbiano. As betalaínas são pigmentos naturais que estão presentes em beterrabas e são consideradas como importantes corantes naturais e dos primeiros desenvolvidos para uso em indústrias de alimentos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição conjunta de óleo essencial de tomilho e suco de beterraba em pó em um embutido cárneo, para redução parcial ou total da adição de nitrato e nitrito de sódio. Foi possível comprovar que o óleo essencial apresentou um efeito inibitório e bactericida frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O constituinte majoritário do óleo essencial de tomilho foi o carvacrol. A avaliação de parâmetros de cor dos produtos, tanto o suco integral de beterraba quanto o suco de beterraba em pó, mostraram tendência à cor vermelha escura, característica das betacianinas. O óleo essencial apresentou efeito inibitório contra *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes testado *in situ* em embutido cárneo em todas as concentrações. O suco de beterraba

em pó mostrou ser eficiente como um corante natural, conferindo a cor característica do embutido cárneo. O embutido cárneo elaborado mostrou boa aceitação sensorial. Assim, a associação de óleo essencial de tomilho e suco em pó de beterraba demonstrou ser uma alternativa viável para redução da adição de sais de cura ao produto.

Palavras-chave: produtos cárneos, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, betalaínas, atividade antimicrobiana.

Abstract

LAGES, Letícia Zarnott. **Development of meat sausage using thyme essential oil (*Thymus vulgaris* L.) and sugar beet juice (*Beta vulgaris* L., cultivar *Early Wonder*)**. 2019. 138 f. Dissertation (Master in Nutrition and Food) - Graduate Program in Nutrition and Food, Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2019.

Over the past few years there has been a significant increase in the concern of the population to maintain a healthier diet, with the decrease in the consumption of industrialized products, mainly because they have synthetic preservatives with carcinogenic potential. Natural plant products, in particular essential oils and pigments, have been indicated as promising alternatives for inactivating pathogens in foods and for imparting color. Among the oils that have proven antimicrobial activity is thyme essential oil (*Thymus vulgaris*), which is a medicinal, aromatic and flavoring plant of the Lamiaceae family. The application of this essential oil in food as a natural additive, individually or in combination with other treatments, aims to prevent microbial growth. Betalains are natural pigments that are present in beets and are considered as important natural and early colorants developed for use in the food industries. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of the combined addition of thyme essential oil and powdered beet juice in a meat sausage to partially or totally reduce the addition of sodium nitrate and nitrite. It was possible to prove that the essential oil had an inhibitory and bactericidal effect against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The major constituent of thyme essential oil was carvacrol. The evaluation of color parameters of the products, both the whole beet juice and the beet juice powder, showed a tendency to dark red color, characteristic of betacyanins. The essential oil showed an inhibitory effect against coagulase positive *Staphylococcus* and thermotolerant coliforms tested in situ in meat sausage at all concentrations. The beet juice powder proved to be efficient as a natural colorant, giving the characteristic color of the meat sausage. The elaborate meat embedded showed good sensory acceptance. Thus, the combination of thyme essential oil and beetroot juice powder proved to be a viable alternative for reducing the addition of curing salts to the product.

Keywords: meat products, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, betalains, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1: Estruturas químicas do óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	17
Figura 2. Estrutura química geral da betalaína	23

Artigo

Figura 1. Cromatografia do óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	82
Figura 2. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho em micro-atmosfera, sobre o crescimento de bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	86
Figura 3. Distribuição de frequência da escala hedônica para embutido cárneo com adição de óleo essencial de tomilho e suco de beterraba em pó	101
Figura 4. Teste de intenção de compra para embutido cárneo com adição de óleo essencial de tomilho e suco de beterraba em pó	102

Anexos

Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido	134
Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido	135
Anexo B – Ficha de avaliação	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes utilizados nas formulações dos embutidos cárneos em quatro tratamentos diferentes	79
Tabela 2. Composição química do óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	83
Tabela 3. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho por meio das técnicas de disco difusão, CIM e CBM	85
Tabela 4. Dados das análises físico-químicas do suco integral de beterraba e do suco de beterraba em pó	88
Tabela 5. Dados da determinação física de cor do suco integral de beterraba e suco de beterraba em pó	90
Tabela 6. Enumeração de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em embutido cárneo adicionado de óleo essencial de tomilho em 3 concentrações diferentes e suco de beterraba em pó, em 3 tempos distintos	91
Tabela 7. Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas em embutido cárneo adicionado de óleo essencial de tomilho em 3 concentrações diferentes e suco de beterraba em pó, em 3 tempos distintos	93
Tabela 8. Enumeração de coliformes termotolerantes em embutido cárneo adicionado de óleo essencial de tomilho em 3 concentrações diferentes e suco de beterraba em pó, em 3 tempos distintos	95
Tabela 9. Aceitação sensorial do embutido cárneo com adição do óleo essencial de tomilho e suco de beterraba em pó	99

SUMÁRIO

1 Introdução	12
2 Objetivos	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 Hipóteses	15
4 Revisão de literatura	16
4.1 Óleos essenciais	16
4.1.1 Óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	17
4.1.2 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais	17
4.2 Micro-organismos dos produtos cárneos	19
4.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	20
4.2.2 <i>Escherichia coli</i>	20
4.3 Aplicação do óleo essencial em produtos cárneos	21
4.4 Beterraba (<i>Beta vulgaris</i> L.)	22
4.5 Análise sensorial dos alimentos	24
5 Projeto de pesquisa	25
6 Relatório de campo	68
7 Artigo	69
8 Considerações finais	114
9 Referências bibliográficas	115

1 Introdução

O mercado de produtos cárneos industrializados tem se expandido ano a ano, pois os produtos são atrativos para os consumidores devido ao preço acessível de alguns, praticidade, facilidade e rapidez no preparo (MELO FILHO; BISCONTINI; ANDRADE, 2004; OLIVEIRA et al., 2013; VASCONCELLOS, 2015; BALDIN et al., 2016).

Ao longo dos últimos anos ocorreu significativo aumento da preocupação da população em manter uma alimentação mais saudável, com a diminuição do consumo de produtos industrializados, principalmente, por estes apresentarem conservantes sintéticos com potencial carcinogênico. Esse dado foi confirmado pela Agência Internacional de Investigação do Câncer, órgão da Organização Mundial de Saúde (OMS) que concluiu que o consumo de carnes processadas por defumação e/ou cura aumenta o risco de aparecimento de cânceres (OMS, 2015).

A busca por alimentos naturais tem se tornado uma grande preocupação para a indústria de alimentos, principalmente em relação a rejeição dos consumidores por conservantes químicos, servindo de motivação para encontrar alternativas naturais, que sirvam de substituto e sejam menos prejudiciais à saúde (VIUDA-MARTOS et al., 2008). Ainda, a indústria tem interesse em agentes antimicrobianos naturais que possam prolongar a vida útil dos produtos e combater micro-organismos patogênicos (CALO et al., 2015).

Neste contexto, a utilização de óleos essenciais, como uma alternativa para substituição aos aditivos químicos, que são comumente utilizados em produtos cárneos, tem ganhado mais atenção. A atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos mostra a viabilidade destes para muitas aplicações, incluindo conservação de alimentos crus e processados (MARTUCCI; GENDE; RUSECKAITE, 2015).

Os óleos essenciais são ricos em diferentes compostos, como terpenos e fenilpropanoides, e podem melhorar a qualidade dos alimentos através de diminuição do crescimento de micro-organismos (KIM; CHO; HAN, 2013), além de conferir propriedades sensoriais e apresentarem baixa toxicidade em relação aos conservantes sintéticos (SADEGHI et al., 2015).

Dentre os óleos que apresentam comprovada atividade antimicrobiana, se encontra o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*), que é uma planta

medicinal, aromática e condimentar da família *Lamiaceae*, originária da Europa e cultivada no sul e sudeste do Brasil (ROCHA, 2012). A aplicação do óleo essencial do *Thymus vulgaris* em alimentos, como um aditivo natural, individualmente ou associado a outros tratamentos, que objetivam impedir o crescimento microbiano, tem sido explorada por muitos autores (KOSTAKI et al., 2009; KARABAGIAS; BADEKA; KONTOMINAS, 2011; JAYASENA; JO, 2013; HAN et al., 2015; HYUN et al., 2015).

O desenvolvimento da indústria de alimentos levou à produção de diferentes aditivos, e entre estes estão os corantes naturais e artificiais. O uso destes é amplo em diversos alimentos e justifica-se por questões de hábitos alimentares, com o intuito de aumentar a aceitabilidade do consumidor, visto que a cor é um importante atributo sensorial (PRADO; GODOY, 2003).

No entanto, pesquisas apontam que aditivos artificiais não são desejados pelos consumidores, que procuram cada vez mais alimentos e ingredientes naturais (ROY et al., 2004; RAVICHANDRAN et al., 2013).

A coloração da beterraba é justificada pela presença das betalaínas, que são pigmentos nitrogenados, encontrados em abundância nesta hortaliça. A betalaína é bastante hidrossolúvel e inclui as betacianinas, responsáveis pela coloração vermelha-violeta e as betaxantinas, de coloração amarelo-laranja. As betalaínas são consideradas como importantes corantes naturais e foram dos primeiros desenvolvidos para uso em indústrias de alimentos (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002; CAI; SUN; CORKE, 2003; GANDÍA-HERRERO; GARCÍA-CARMONA; ESCRIBANO, 2005; STINTZING; CARLE, 2007).

Diante do contexto exposto, acredita-se que a adição conjunta de óleo essencial de tomilho e suco de beterraba em pó em substituição aos sais de cura, represente uma alternativa natural para produção de embutido cárneo, com boa manutenção das características microbiológicas e sensoriais.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da adição conjunta de óleo essencial de tomilho e de suco de beterraba em pó em embutido cárneo, para redução parcial ou total de utilização de nitrato e nitrito de sódio.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Determinar a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima do óleo essencial de tomilho frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Avaliar físico-quimicamente o suco de beterraba integral e em pó elaborados.

Desenvolver embutido cárneo adicionado de óleo essencial de tomilho e suco de beterraba em pó, reduzindo total ou parcialmente a utilização de nitrato e nitrito de sódio.

Avaliar a aceitabilidade sob o ponto de vista sensorial dos produtos elaborados.

3 Hipóteses

A adição conjunta de óleo essencial de tomilho e de suco de beterraba em pó inibe os micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e confere a coloração característica de embutido cárneo *in situ* permitindo a redução parcial de nitrato e nitrito em embutido cárneo.

O embutido cárneo adicionado de óleo essencial de tomilho e de suco de beterraba em pó apresenta uma boa aceitação sensorial.

4 Revisão de Literatura

4.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são substâncias naturais voláteis de origem vegetal, classificados como GRAS (*Generally Regarded As Safe*), o que os torna atrativos ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico, mesmo quando empregados em concentrações relativamente elevadas (PEREIRA et al., 2006).

Por algumas de suas características físico-químicas, podem receber outras denominações, como *óleos voláteis* (sua principal característica é a volatilidade, diferenciando-os dos óleos fixos), *óleos etéreos* (por serem solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter) ou ainda *essências* (pelo aroma agradável e intenso da maioria desses óleos) (MATTOS et al., 2007; SIMÕES; SPITZER, 2007).

Os óleos essenciais são compostos oleosos, líquidos, voláteis, límpidos e raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, que podem ser encontrados em diversas partes das plantas como folhas, raízes, rizomas, cascas, caule, flores, frutos e sementes (OUSSALAH; CAILLET; LACROIX, 2007). Os óleos essenciais não são moléculas simples, mas sim a mistura de vários compostos de substâncias ativas, entre elas os terpenos ou terpenoides, que compõem os metabólitos secundários de plantas e podem ser formados por duas (monoterpeno), três (sesquiterpenos) ou quatro (diterpenos) unidades de isopreno, e fenilpropanoides, que dependem do número de carbonos e variam conforme a composição (ASCENÇÃO; MOUCHREK FILHO, 2013). Tanto os fenilpropanoides quanto os terpenos compreendem o grupo dos compostos fenólicos (AMAROTI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013).

Os óleos essenciais são os produtos obtidos de partes de plantas através da destilação simples, a forma mais utilizada na obtenção dos óleos essenciais comerciais, mas podendo também ser feita por meio da fermentação, extração por solventes, destilação por arraste de vapor d'água, hidrodestilação ou a partir do processamento mecânico, como a prensagem, dos pericarpos de frutos cítricos (GREATHEAD, 2003; YANG et al., 2010; BUSATO et al., 2014).

4.1.1 Óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

O *Thymus vulgaris* é uma planta medicinal, aromática e condimentar da família *Lamiaceae*, popularmente conhecida como tomilho, originária da Europa e cultivada no sul e sudeste do Brasil (ROCHA, 2012).

A atividade biológica do óleo essencial de tomilho está relacionada com o timol e o carvacrol, seus principais constituintes, cujas estruturas químicas podem ser vistas na Figura 1. O timol tem demonstrado efeitos antibacterianos, antifúngicos e anti-helmínticos, enquanto o carvacrol tem sido estudado por seus efeitos bactericidas. O timol é o composto majoritário, seguido pelo carvacrol (OZCAN; CHALCHAT, 2004; PORTE; GODOY, 2008; HAJIMEHDIPOOR et al., 2010; LISI et al., 2011).

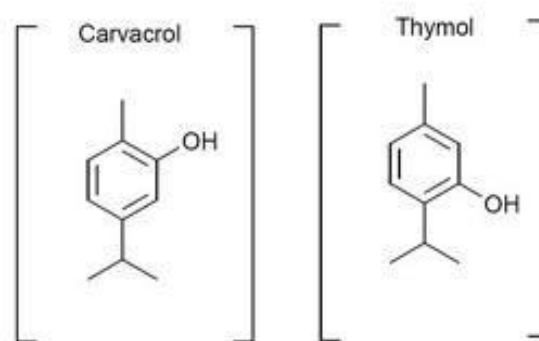


Figura 1: Estruturas químicas do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

A aplicação do óleo essencial do *Thymus vulgaris* em alimentos como um aditivo natural, individualmente ou associado a outros tratamentos que objetivam impedir o crescimento microbiano, tem sido explorada por muitos autores em virtude do seu potencial antimicrobiano já comprovado (KOSTAKI et al., 2009; KARABAGIAS; BADEKA; KONTOMINAS, 2011; JAYASENA; JO, 2013; HAN et al., 2015; HYUN et al., 2015).

4.1.2 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Entende-se que a inibição do crescimento microbiano pelos óleos essenciais seja devida ao dano causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, o que acaba por afetar a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos (COWAN, 1999; SHYLAJA; PETER, 2004).

Os óleos essenciais de condimentos podem ter muitos componentes, sendo os compostos fenólicos os principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas. Os compostos fenólicos são hidrofóbicos e o seu sítio de ação é a membrana celular da célula microbiana, onde se acumulam causando desarranjo na função e na estrutura da membrana e penetram a célula bacteriana, exercendo atividade inibitória no citoplasma celular, provocando lise e liberação do ATP intracelular e como resultado a morte celular (WALSH et al., 2003; CALO et al., 2015). Já é bem conhecido o caráter hidrofóbico dos óleos essenciais e seus componentes, que permite a sua ligação aos lipídeos da membrana celular modificando sua estrutura e aumentando sua permeabilidade. Devido a esta permeabilidade alterada, podem ocorrer a passagem de íons e outros constituintes celulares provocando a morte da célula, sendo este o principal mecanismo pelo qual os óleos essenciais têm ações letais (COX et al., 2000; BURT, 2004).

Alguns autores sugerem que a membrana ao redor da parede celular de bactérias Gram negativas pode restringir a difusão de compostos hidrofóbicos devido à cobertura de lipopolissacarídeos presentes (DAVIDSON; BRANEN, 2005 *apud* GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009; CALO et al., 2015). Porém, isso não significa que as bactérias Gram positivas sejam sempre mais susceptíveis (BURT, 2004). Bactérias Gram negativas são geralmente mais resistentes aos metabólitos antimicrobianos de plantas e, muitas vezes, não são inibidos por eles (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Alves (2010), Pozzo et al. (2011) e Pesavento et al. (2015) relataram que o óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho) também apresenta ação antimicrobiana isoladamente e em combinações frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas. Os autores também concluíram que a utilização do óleo essencial de *Thymus vulgaris* pode ser uma alternativa para a substituição dos sais de cura comumente utilizados em embutidos cárneos.

Santurio (2015) ao realizar um estudo sobre o uso de óleos essenciais para o controle de bactérias patogênicas em alimentos, concluiu que o uso de óleos essenciais adicionados em produtos cárneos podem aumentar a vida útil e diminuir a contaminação de patógenos.

4.2 Micro-organismos dos produtos cárneos

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são causadas devido à ingestão de alimentos contaminados com micro-organismos patogênicos, sendo estes bactérias, fungos e vírus (BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003).

A capacidade dos micro-organismos se desenvolverem em um alimento está relacionada a múltiplos fatores que proporcionam condições favoráveis para que ocorra a multiplicação, sendo divididos em fatores intrínsecos, os quais estão relacionados às características próprias do alimento, como umidade, potencial de oxido-redução e tensão de O₂, pH, composição do alimento, concentração salina e fatores extrínsecos, relacionados ao ambiente em que o alimento está presente, como temperatura, umidade relativa do ambiente, presença de gases no ambiente (CO₂ e O₃), substâncias adicionadas para inibir ou retardar a multiplicação microbiana (ácido ascórbico, dióxido de enxofre, ácido benzoico, nitrato, nitrito, antibióticos e irradiação) (SILVA JR., 2014).

A fabricação de linguiças tipo frescal requer uma série de etapas de manipulação, o que eleva as possibilidades de contaminação por diversas espécies de micro-organismos, patogênicos ou deterioradores, podendo comprometer a qualidade microbiológica do produto final (MARQUES et al., 2006). Desta forma, a qualidade do produto elaborado reflete as condições da matéria-prima e ingredientes empregados em sua produção (MOROT-BIZOT; LEROY; TALON, 2006). Além disso, o manipulador envolvido no processamento bem como os equipamentos e utensílios inadequadamente higienizados, podem ser importantes fontes de contaminação (CHEVALLIER et al., 2006).

Dentre os micro-organismos patogênicos frequentemente presentes em embutidos, destacam-se *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (BARBUTI; PAROLARI, 2002). Em função da presença destes agentes, os produtos cárneos podem constituir sérios problemas para a saúde pública, uma vez que estas bactérias são causas comuns de infecções e intoxicações alimentares (MARQUES et al., 2006).

4.2.1 *Staphylococcus aureus*

São bactérias Gram positivas no formato de cocos medindo entre 0,5-1,5 µm de diâmetro, não são móveis nem formam esporos. Podem estar sozinhas, em pares, em cadeias curtas ou reunidas em formato de cacho de uva devido a divisão celular que é feita em três planos perpendiculares (SANTOS et al., 2007).

Vale salientar, que cepas de *Staphylococcus aureus* podem estar presentes no conduto nasal, nos olhos, na garganta, no trato gastrointestinal e na superfície da pele de homens, onde é mais frequente nas mãos, braços, rosto e feridas, não são boas competidoras e não crescem bem na presença de outros micro-organismos (BARROS, 2009; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A enterotoxina estafilocócica é termoestável e pode permanecer no alimento mesmo após o cozimento, possibilitando desta forma, a instalação de um quadro de intoxicação alimentar, que causa náuseas, diarreia e vômitos dentro de uma a seis horas (BALABAN; RASOOLY, 2000; CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002; CARMO; LIMA; SOUZA, 2008; MADIGAN et al., 2010).

4.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é a espécie predominante entre os diversos micro-organismos anaeróbios facultativos. Esse micro-organismo pertence à família *Enterobacteriaceae* e entre suas principais características destacam-se: bacilos Gram negativos, não esporulados, capazes de fermentar a lactose, com produção de ácido e de gás (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Escherichia coli entero-hemorrágica (EHEC) tem a capacidade de produzir uma toxina quando se aloja no intestino chamada de verotoxina, que causa desde uma diarreia sanguinolenta até uma insuficiência renal. *Escherichia coli* entero-toxigênica (ETEC) causa uma infecção entérica que leva a diarreia aquosa, principalmente, em pessoas que estão viajando, já que os habitantes locais tendem a estar imunes à bactéria. A *Escherichia coli* entero-patogênica (EPEC) não é invasiva nem produz toxinas e está envolvida com casos de diarreia infantil e em bebês. *Escherichia coli* entero-invasiva (EIEC) causa doença invasiva do cólon, sendo responsável por diarreia aquosa, que por vezes pode ser sanguinolenta (MADIGAN et al., 2010). A

Escherichia coli entero-agregativa (EAEC) causa diarreia aguda e persistente que ocorre, principalmente, em crianças de países em desenvolvimento (REGUA-MANGIA et al., 2009). *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) possui a característica de se aderir de forma difusa em cultura de células epiteliais *in vitro*, pode causar infecções no trato urinário e a patogenicidade entérica ainda não é confirmada (SERVIN, 2005).

Estes micro-organismos apresentam baixa competitividade em relação a um grande número de micro-organismos competidores em um mesmo meio. Porém sua presença no produto representa risco à saúde dos consumidores por sua patogenicidade (MARQUES et al., 2006).

4.3 Aplicação do óleo essencial em produtos cárneos

Visando diminuir o risco de proliferação bacteriana nos alimentos, bem como a redução do uso de aditivos sintéticos, os compostos naturais apresentam-se como possíveis alternativas para serem adicionados em produtos cárneos. As plantas aromáticas têm sido muito estudadas e utilizadas, pois apresentam potencial como conservantes naturais (DJENANE et al., 2011).

Dentre os métodos de conservação disponíveis, a indústria alimentícia busca cada vez mais a substituição de métodos tradicionais de conservação, como os tratamentos térmicos intensos, por novas técnicas de preservação, principalmente devido à demanda crescente, por parte dos consumidores, por produtos saborosos, nutritivos, naturais e de conveniência (RAHMAN; KANG, 2009; VIUDA-MARTOS et al., 2010a). A segurança da utilização de aditivos químicos também tem sido cada vez mais questionada, como resultado de uma maior preocupação com os riscos à saúde e de uma maior capacidade para avaliar a segurança/toxicidade dos diversos aditivos (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Lemay et al. (2002) apontam que a utilização de óleos essenciais é particularmente viável em produtos cárneos, em função de que ervas e especiarias já são comumente utilizadas nestes produtos a fim de conferir sabores típicos aos mesmos.

Recentemente, muitas pesquisas têm sido realizadas com a utilização de óleos essenciais para prolongar a vida útil da carne e dos produtos à base

de carne. Tem-se comprovado que são passíveis de utilização nestes alimentos (GAIO et al., 2015; SHARAFATI-CHALESHTORI et al., 2015; ZENGİN; BAYSAL, 2015).

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

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

4.4 Beterraba (*Beta vulgaris* L.)

A beterraba (*Beta vulgaris* L.) é uma hortaliça originária das regiões de clima temperado da Europa e Norte da África, pertence à família *Chenopodiaceae*, caracterizada por possuir uma raiz tuberosa comestível. No Brasil é cultivada principalmente nas regiões Sudeste e Sul (CAMARGO FILHO; MAZZEI, 2002; INSTITUTO FNP, 2007). Existem poucas cultivares plantadas no Brasil, sendo a cultivar mais tradicional a *Early Wonder*, também chamada de beterraba vermelha ou “de mesa”, que apresenta raízes com formato regular e forte coloração vermelha (HERNANDES et al., 2007).

A beterraba, por ser planta típica dos climas temperados, se desenvolve bem sob regimes de temperaturas amenas a frias, preferencialmente entre 10 e 20°C, apresentando resistência ao frio intenso e a geadas leves. O calor é um fator limitante para a maioria das cultivares. Por conseguinte, quando plantada sob temperatura e pluviosidade elevadas, ocorre a destruição prematura das

folhas por doenças fúngicas e as beterrabas adquirem coloração interna indesejável, com anéis claros (FILGUEIRA, 2003).

A beterraba além de ser muito nutritiva, possui forte apelo sensorial, devido à sua cor vermelho-intensa (HERNANDES et al., 2007). A coloração da beterraba é justificada pela presença das betalaínas, que são pigmentos nitrogenados característicos de ordem *Caryophyllales*, da qual essa hortaliça faz parte. A betalaína é bastante hidrossolúvel e inclui as betacianinas, responsáveis pela coloração vermelha-violeta e as betaxantinas, de coloração amarelo-laranja. As betalaínas são consideradas como importantes corantes naturais e foram dos primeiros desenvolvidos para uso em indústrias de alimentos (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002; CAI; SUN; CORKE, 2003; GANDÍA-HERRERO; GARCÍA-CARMONA; ESCRIBANO, 2005; STINTZING; CARLE, 2007). Quimicamente, as betalaínas são definidas por uma estrutura que engloba todos os componentes que apresentam uma fórmula geral como na Figura 2.

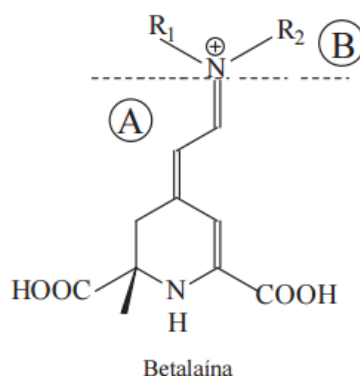


Figura 2. Estrutura química geral da betalaína

Fonte: Adaptado de VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009.

A beterraba, bem como seus extratos e corantes são universalmente permitidos como ingredientes na indústria de alimentos, sendo amplamente empregados. Além disso, esta hortaliça possui importantes compostos bioativos, dentre os quais se destacam as betalaínas, as fibras e o nitrato (KANNER; HAREL; GRANIT, 2001; CAI; SUN; CORKE, 2003).

Ainda, a beterraba vermelha possui uma alta capacidade de cultivo, baixo custo de processamento e término do produto final em relação aos demais corantes naturais, justificando assim sua utilização na indústria de

alimentos (DRUNKLER; FETT; BORDIGNON-LUIZ, 2003). No entanto, seu uso ainda é limitado devido à baixa estabilidade da cor, que é dependente de fatores como pH, temperatura, presença ou ausência de oxigênio e de luz, atividade de água, entre outros fatores (DUNKLER; FALCÃO; BORDIGNON-LUIZ, 2004).

4.5 Análise sensorial dos alimentos

Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1993), a análise sensorial é uma ciência que evoca, mede, analisa e interpreta as reações humanas frente às características dos alimentos e materiais, percebidas pelos cinco sentidos: paladar, olfato, tato, visão e audição.

É através da análise sensorial que é feita a seleção e caracterização de matérias-primas, melhoria de uma formulação, avaliação da correlação de análises químicas com as sensações dos sentidos humanos e desenvolvimento de novos produtos alimentícios (SANTURIO, 2015).

Os fenômenos de aceitação ou rejeição de um alimento sofrem influência direta das propriedades sensoriais do mesmo. Portanto, uma escala hedônica pode ser utilizada como método de avaliação da aceitação do consumidor (DANTAS et al., 2004).

A análise sensorial de um determinado produto é realizada por uma equipe que avalia suas características sensoriais. Para alcançar o objetivo específico de cada análise, são elaborados métodos de avaliação, visando à obtenção de respostas mais adequadas ao perfil do produto. Esses métodos apresentam características que se moldam com o objetivo da análise. O resultado, que deve ser expresso de forma específica, conforme o teste aplicado, é estudado estatisticamente, concluindo assim a viabilidade do produto (TEIXEIRA, 2009).

5 Projeto de Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) e extrato de beterraba (*Early Wonder*)

Letícia Zarnott Lages

Pelotas, julho de 2018

LETÍCIA ZARNOTT LAGES

Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) e extrato de beterraba (*Early Wonder*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador – Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Co-orientadores – Prof^a. Dr^a. Carla Rosane Barboza Mendonça

– Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia dos Santos da Conceição

Pelotas, julho de 2018

Resumo

LAGES, Letícia Zarnott. 43 f. **Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) e extrato de beterraba (*Early Wonder*)**. Universidade Federal de Pelotas. 2019.

A conservação de alimentos tem sido um desafio, considerando que boa parte dos conservantes e/ou aditivos químicos sintéticos podem, em determinados casos, apresentar problemas relacionados ao potencial alergênico e até mesmo carcinogênico. Dentre estes aditivos estão aqueles que atuam como inibidores microbianos e/ou que conferem e mantêm cores em produtos alimentícios, principalmente em produtos cárneos como nitratos e nitritos. Produtos naturais de plantas, em particular os óleos essenciais, têm sido indicados como alternativas promissoras para inibir patógenos em alimentos. As betalaínas são pigmentos naturais que estão presentes em beterrabas e são consideradas um dos mais importantes corantes naturais e dos primeiros desenvolvidos para uso em indústrias de alimentos. Neste contexto, o objetivo deste estudo será avaliar o efeito da adição conjunta de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba em um embutido cárneo, para redução parcial ou total de nitrato e nitrito de sódio. Neste estudo, o óleo de tomilho será testado como agente antimicrobiano frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e o extrato de beterraba será adicionado como corante natural em embutido cárneo fresco, a fim de verificar se é capaz de conferir a coloração característica, de forma similar ou superior ao nitrito de sódio. Serão executados determinações químicas e físicas compreendendo a cromatografia dos terpenos, compostos fenólicos totais, disco difusão, concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima, atividade antimicrobiana em micro-atmosfera e avaliação do concentrado de beterraba em pó (umidade, teor de açúcar, sólidos solúveis, cor e pH) e espera-se que o produto apresente também boa aceitação sensorial.

Palavras-chave: produtos cárneos, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, betalaínas.

Tabelas

Tabela 1. Ingredientes utilizados na formulação do embutido cárneo em três formulações diferentes	28
Tabela 2. Cronograma de atividades para o período de 2 anos	32
Tabela 3. Orçamento do projeto	33

Sumário

1 Introdução	7
2 Revisão Bibliográfica	9
2.1 Embutidos cárneos	9
2.2 Óleos essenciais	10
2.2.1 Óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	12
2.2.2 Atividades antimicrobianas do óleo essencial	12
2.3 Micro-organismos nos alimentos.....	14
2.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.3.2 <i>Escherichia coli</i>	16
2.4 Aplicação do óleo essencial em produtos cárneos	17
2.5 Extrato de beterraba	18
3 Objetivos	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 Hipóteses	22
5 Material e métodos	23
5.1 Material	23
5.2 Caracterização do óleo essencial de tomilho	23
5.2.1 Perfil cromatográfico de terpenos	23
5.2.2 Determinação de compostos fenólicos totais	23
5.2.3 Avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial de tomilho	23
5.2.3.1 Reativação dos micro-organismos	24
5.2.3.2 Disco difusão	24
5.2.3.3 Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera	24
5.2.3.4 Concentração Inibitória Mínima	25
5.2.3.5 Concentração Bactericida Mínima	25
5.3 Obtenção do pigmento de beterraba	26
5.3.1 Avaliação do concentrado em pó	26
5.3.1.1 Umidade	26
5.3.1.2 Teor de açúcar (reduzidos e totais)	26
5.3.1.3 Sólidos solúveis (no suco)	26
5.3.1.4 Cor	27

5.3.1.5 pH	27
5.4 Preparação do embutido cárneo	27
5.5 Contaminação intencional do embutido com <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	28
5.6 Aplicação do óleo essencial de tomilho e do extrato de beterraba no embutido cárneo	29
5.7 Avaliação da adição de óleo essencial de tomilho e de extrato de beterraba em embutido cárneo	29
5.7.1 Avaliação microbiológica	29
5.7.2 Avaliação sensorial	30
5.8 Análise Estatística	30
6 Resultados e impactos esperados	31
7 Cronograma de atividades	32
8 Orçamento	33
9 Referências Bibliográficas	34

1 Introdução

O mercado de produtos cárneos industrializados tem se expandido ano a ano, pois é atrativo para os consumidores devido ao preço acessível de alguns produtos, sua praticidade, facilidade e rapidez no preparo (MELO FILHO; BISCONTINI; ANDRADE, 2004; OLIVEIRA et al., 2013; VASCONCELLOS, 2015; BALDIN et al., 2016).

Por serem alimentos perecíveis, as carnes apresentam vida útil variável, em função de sua composição físico-química e suas condições de armazenamento. Nesse sentido, a fabricação de embutidos cárneos possibilitou o aumento do tempo de viabilidade deste tipo de produto e diversificou a oferta de derivados cárneos. Por meio do uso de tecnologias e processos que, além de conservarem a carne contra a deterioração bacteriana, mantenham a qualidade (CARTAXO, 2015).

A conservação da carne e de produtos cárneos envolve a aplicação de medidas para retardar ou prevenir alterações microbiológicas, químicas ou físicas que a tornam imprópria para o consumo ou que reduzem alguns aspectos da sua qualidade. Apesar de os vários tipos de alterações serem significativos, a deterioração microbiológica é a mais importante e geralmente precede os outros tipos de deterioração da carne (KINSMAN et al., 1994).

Uma alternativa que vem sendo a longo tempo utilizada em produtos cárneos são os aditivos e conservantes químicos sintéticos, que possuem ampla atuação contra micro-organismos, deteriorantes e patogênicos, além de conferirem características sensoriais interessantes como cores e aromas atrativos, como é o caso dos sais de cura compostos majoritariamente por nitratos e nitritos.

Considerando que boa parte dos conservantes e/ou aditivos químicos sintéticos pode, em determinados casos, desencadear problemas relacionados ao potencial alergênico e até mesmo a carcinogênico de alguns produtos, dentre estes estão aqueles que atuam como inibidores microbianos e/ou que conferem e mantêm cores em produtos alimentícios, principalmente em produtos cárneos como nitratos e nitritos.

Nos últimos anos, a utilização de conservantes naturais em alimentos tem encontrado grande aceitação perante o mercado consumidor, que busca cada vez mais produtos naturais, benéficos à saúde, juntamente à redução do

consumo de aditivos sintéticos. Produtos naturais de plantas, em particular os óleos essenciais e pigmentos, têm sido indicados como alternativas promissoras para inativar patógenos em alimentos e para conferir cor (CHORIANOPOULOS et al., 2004; RAHMAN; KANG, 2009; EBRAHIMABADI et al., 2010).

Muitas espécies vegetais possuem propriedades antimicrobiana e antioxidante, dentre estas espécies, destacam-se as plantas medicinais e condimentares que, além de conferirem características sensoriais próprias aos alimentos (BURT, 2004), o que as torna úteis e como alternativas mais saudáveis para as indústrias de alimentos, em comparação aos conservantes químicos.

Nesse contexto, o uso alternativo de produtos naturais obtidos de plantas tem tido mais atenção, principalmente porque esses produtos possuem propriedades funcionais adicionais. As betalaínas são pigmentos naturais que estão presentes em beterrabas sendo classificadas em betacianinas e betaxantinas. Devido a isso, as betalaínas podem ser empregadas como corante natural em alimentos (DRUNKLER, 2001).

Neste estudo, será adicionado óleo essencial de tomilho a fim de verificar se o mesmo é capaz de inibir *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli in situ*. Também foi adicionado extrato de beterraba como corante natural em embutido cárneo fresco, a fim de verificar se é capaz de reduzir a perda da coloração característica causada pela redução do nitrito de sódio ou até melhorar tal coloração, para que não ocorra comprometimento da aceitação sensorial.

Por fim espera-se verificar se a adição conjunta de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba em um embutido cárneo diminuirá a necessidade de adição de nitratos e nitritos neste tipo de produto.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Embutidos cárneos

As carnes e derivados constituem produtos altamente perecíveis. Cuidados muito especiais devem ser mantidos durante todas as operações. Os processos visam minimizar a deterioração e prolongar a vida útil com níveis de qualidade aceitáveis. Dentre as várias matrizes alimentares de origem vegetal e animal, os embutidos cárneos representam um segmento de relevante comercialização por todo mundo. No Brasil, fazem parte dos hábitos alimentares de uma parcela considerável da população (OLIVO, 2006; ORDÓÑEZ, 2005).

A presença de patógenos evidencia a necessidade de se investir em técnicas de descontaminação para garantir a segurança do alimento. Também há o interesse em reduzir ou eliminar os micro-organismos deteriorantes para aumentar a durabilidade do produto. Em muitos alimentos refrigerados, o crescimento microbiano é o principal responsável pela deterioração da carne e dos produtos cárneos, em conjunto com as alterações bioquímicas e enzimáticas (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

A Instrução Normativa nº 4 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000) define linguiça como o produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionado ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial e submetido ao processo tecnológico adequado. Ainda segundo este regulamento, as linguiças frescas caracterizam-se por apresentar teores máximos de 70% de umidade, 30% de gordura e 0,1% de cálcio (em base seca), e um teor mínimo de 12% de proteína. Dentre os produtos cárneos embutidos, a linguiça do tipo fresco se destaca por sua grande aceitação e comercialização (OLIVEIRA; ARAÚJO; BORG, 2005).

As linguiças constituem os derivados cárneos fabricados em maior quantidade em nosso país, uma vez que a sua elaboração não exige tecnologia sofisticada, utilizando poucos e baratos equipamentos. Entretanto, por não serem submetidas a um tratamento térmico, as linguiças frescas, com alta atividade de água, apresentam uma elevada carga microbiana e conseqüentemente uma reduzida vida de prateleira (TERRA, 1998; ORDÓÑEZ, 2005).

Em produtos cárneos são comumente utilizados para inibição microbiana e para manutenção da cor os chamados “sais de cura”, constituídos majoritariamente de nitratos e nitritos, que são largamente utilizados como aditivos alimentares no processamento de produtos cárneos. Os sais de nitrato e nitrito têm a finalidade de conservar, intensificar ou modificar as propriedades dos alimentos. Especificamente, nos produtos cárneos eles são empregados como aditivo alimentar devido sua ação preventiva na proliferação de esporos de algumas bactérias que podem causar alterações graves nestes produtos. A produção de linguiças envolve várias etapas de manipulação, aumentando o risco de contaminação por micro-organismos, patogênicos ou deterioradores, comprometendo a qualidade higiênico-sanitária do alimento (MOREAU, SIQUEIRA, 2008).

O consumo de sais de nitrato e nitrito de sódio, além de determinados limites, pode causar leve prejuízo à saúde, mas se o consumo for excessivo pode levar ao aumento da incidência de alguns tipos de câncer. Esse consumo ocorre através de uma reação natural do organismo e nos alimentos, na qual o nitrato transforma-se em nitrito, reagindo com as aminas e amidas secundárias e terciárias, formando compostos nitrosos como as nitrosaminas e nitroamidas, que são potencialmente carcinogênicas (OLIVEIRA; ARAÚJO; BORG, 2005; KREUTZ et al., 2012). Os nitratos são relativamente pouco tóxicos para os seres humanos, mas a sua toxicidade está atribuída principalmente a sua redução a nitrito (KREUTZ et al., 2012).

2.2 Óleos essenciais

As plantas condimentares são utilizadas como tempero, realçando o sabor e o aspecto do alimento, podendo apresentar propriedades de conservação. As plantas aromáticas possuem aroma capaz de sensibilizar nosso olfato, destas são extraídos os óleos essenciais, largamente conhecidos pela sua ação terapêutica e farmacológica, também estão sendo estudados quanto ao potencial antimicrobiano, antifúngico, citotóxico, anti-inflamatório e inseticida. Diversas pesquisas apontam nos óleos essenciais a presença de substâncias com tais atividades, prevenindo o início da deterioração e o crescimento de micro-organismos indesejáveis (CASTELLANI et al., 2011; CARVALHO; CRUZ; WIEST, 2005; OLIVEIRA et al., 2011; UPNMOOR, 2003).

Os óleos essenciais são substâncias naturais voláteis de origem vegetal classificados como GRAS (*Generally Regarded As Safe*), o que os torna atrativos ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico, mesmo quando empregados em concentrações relativamente elevadas (PEREIRA et al., 2006).

Os óleos essenciais são compostos oleosos, voláteis e aromáticos, produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, que podem ser encontrados em diversas partes das plantas como folhas, raízes, rizomas, cascas, caule, flores, frutos e sementes (OUSSALAH; CAILLET; LACROIX, 2007). Os óleos essenciais não são moléculas simples, mas sim a mistura de vários compostos de substâncias ativas, entre elas os terpenos, que podem ser formados por duas (monoterpeno), três (sesquiterpenos) ou quatro (diterpenos) unidades de isopreno, e derivados de fenilpropano (ASCENÇÃO; MOUCHREK FILHO, 2013). Tanto os fenilpropanoides quanto os terpenos compreendem o grupo dos compostos fenólicos (AMAROTI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013).

Há várias formas de extração, sendo a destilação simples a forma mais utilizada na obtenção dos óleos essenciais comerciais, mas podendo também ser feita por meio da fermentação, extração por solventes, destilação por arraste de vapor d'água, hidrodestilação ou a partir do processamento mecânico, como a prensagem, dos pericarpos de frutos cítricos (GREATHEAD, 2003; YANG et al., 2010; BUSATO et al., 2014).

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

Os óleos essenciais são conhecidos pela sua ação como potenciais agentes antimicrobianos, tendo a capacidade de controlar bactérias patogênicas (OUSSALAH; CAILLET; LACROIX, 2007). São vários os fatores responsáveis pela eficácia biológica dos óleos essenciais em alimentos, nomeadamente a temperatura, o pH, a carga microbiana e outros fatores ambientais (BAJPAI; KWANG-HYUN BAEK, 2012).

Embora a indústria de alimentos utilize os óleos essenciais principalmente como aromatizantes, os mesmos representam uma fonte

antimicrobiana e antioxidante natural alternativa, podendo ser utilizados na conservação dos produtos. No entanto, a aplicação dos óleos essenciais na conservação de alimentos, requer conhecimentos detalhados sobre suas propriedades, ou seja, a concentração inibitória mínima, os micro-organismos envolvidos, modo de ação, além do efeito dos componentes da matriz do alimento sobre suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

2.2.1 Óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

O *Thymus vulgaris* é uma planta medicinal, aromática e condimentar da família *Lamiaceae*, popularmente conhecida como tomilho, originária da Europa e cultivada no sul e sudeste do Brasil (ROCHA, 2012).

A atividade biológica do óleo essencial de tomilho está relacionada com o timol e o carvacrol, seus principais constituintes. O timol tem demonstrado efeitos antibacterianos, antifúngicos e anti-helmínticos, enquanto o carvacrol tem sido estudado por seus efeitos bactericidas. O timol é o composto majoritário, seguido pelo carvacrol (OZCAN; CHALCHAT, 2004; PORTE; GODOY, 2008; HAJIMEHDIPOOR et al., 2010; LISI et al., 2011).

A aplicação do óleo essencial do *Thymus vulgaris* em alimentos como um aditivo natural, individualmente ou associado a outros tratamentos que objetivam impedir o crescimento microbiano, tem sido explorada por muitos autores em virtude do seu potencial antimicrobiano já comprovado (HAN et al., 2015; HYUN et al., 2015; JAYASENA; JO, 2013; KARABAGIAS; BADEKA; KONTOMINAS, 2011; KOSTAKI et al., 2009). O elevado potencial antioxidante do óleo essencial de *Thymus vulgaris* também é de grande interesse, sobretudo na indústria de produtos cárneos (JAYASENA; JO, 2014).

2.2.2 Atividades antimicrobianas do óleo essencial

Entende-se que a inibição do crescimento microbiano pelos óleos essenciais seja devida ao dano causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, o que acaba por afetar a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos (COWAN, 1999; SHYLAJA; PETER, 2004).

As plantas produzem uma grande variedade de compostos com atividade antimicrobiana. Destes, alguns estão sempre presentes, enquanto outros são produzidos em resposta ao ataque de micro-organismos ou devido a danos físicos. A identificação dos compostos antimicrobianos mais ativos presentes nos óleos essenciais é complexa, tendo em vista que, dependendo do óleo, pode haver a presença de mais de quarenta e cinco componentes diferentes, os quais sofrem variações percentuais de acordo com alguns fatores (ESPINA et al., 2011). A grande variabilidade que ocorre entre resultados obtidos a partir de óleos de uma mesma planta está relacionada com as variáveis da planta e condições de cultivo, a época da colheita e o método utilizado para extrair o óleo, variação geográfica, climática e genótipo, estes fatores podem interferir na composição química e proporção dos compostos individuais do óleo essencial (OUSSALAH; CAILLET; LACROIX, 2007).

Helander et al. (1998) investigaram o modo de ação de alguns componentes de óleos essenciais sobre *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella typhimurium*. Observaram que o timol e o carvacrol promoveram a liberação de lipopolissacarídeos da membrana externa e de proteína para o meio extracelular. Através da estimativa do peso molecular da proteína liberada, os autores sugeriram tratar-se de uma das principais porinas da membrana externa da parede celular de *E. coli*.

Os óleos essenciais atuam na estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando as proteínas, ou seja, alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática (BENCHAAAR et al., 2008). A alteração dos gradientes de íons conduz à deterioração dos processos essenciais da célula como transporte de elétrons, translocação de proteínas, etapas da fosforilação e outras reações dependentes de enzimas, resultando em perda do controle quimiosmótico da célula afetada e, conseqüentemente, a morte bacteriana (DORMAN; DEANS, 2000).

Os óleos essenciais de condimentos podem ter muitos componentes, sendo os compostos fenólicos os principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas e antioxidantes dos mesmos. Os compostos fenólicos são hidrofóbicos e o seu sítio de ação é a membrana celular da célula microbiana, onde se acumulam causando desarranjo na função e na estrutura da

membrana e penetram a célula bacteriana, exercendo atividade inibitória no citoplasma celular, provocando lise e liberação do ATP intracelular (WALSH et al., 2003). Juntos, os diferentes compostos presentes nos óleos essenciais produzem um arranjo de antioxidantes que pode agir por diferentes mecanismos para conferir um sistema de defesa efetivo contra o ataque dos radicais livres (SHAHIDI, 1997). O mecanismo de ação dos óleos essenciais sobre os micro-organismos é complexo e ainda não foi totalmente elucidado. Já é bem conhecido o caráter hidrofóbico dos óleos essenciais e seus componentes, que permite a sua ligação aos lipídeos da membrana celular modificando sua estrutura e aumentando sua permeabilidade. Devido a esta permeabilidade alterada, podem ocorrer a passagem de íons e outros constituintes celulares provocando a morte da célula, sendo este o principal mecanismo pelo qual os óleos essenciais têm ações letais (COX et al., 2000; BURT, 2004).

As bactérias Gram negativas têm duas camadas lipoproteicas; a membrana externa contém lipossacarídeos caracterizando uma membrana hidrofílica de qualidade acarretando em uma barreira à permeabilidade de substâncias hidrofóbicas, tais como os óleos essenciais. Isto pode explicar a resistência frequente de bactérias Gram negativas para efeito antimicrobiano de alguns óleos essenciais (CHAO; YOUNG, 2000).

Os métodos normalmente utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais são o método de difusão em disco, difusão utilizando cavidades feitas no ágar, diluição em ágar e diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) (BURT, 2004; NASCIMENTO et al., 2007; OSTROSKY et al., 2008).

2.3 Micro-organismos nos alimentos

A capacidade dos micro-organismos se desenvolverem em um alimento está relacionada a múltiplos fatores que proporcionam condições favoráveis para que ocorra a multiplicação, sendo divididos em fatores intrínsecos, os quais estão relacionados às características próprias do alimento, como umidade, potencial de óxido-redução e tensão de O₂, pH, composição do alimento, concentração salina, estrutura biológica do alimento, substâncias

inibidoras e fatores extrínsecos, relacionados ao ambiente em que o alimento está presente, como temperatura, umidade relativa do ambiente, presença de gases no ambiente (CO_2 e O_3), substâncias adicionadas para inibir ou retardar a multiplicação microbiana (ácido ascórbico, dióxido de enxofre, ácido benzoico, nitrato, nitrito, antibióticos e irradiação) (SILVA JR., 2014).

Os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos, podendo levar a doenças por ação de micro-organismos patogênicos ou de suas toxinas (STAMFORD et al., 2006), afetando a saúde humana. Doenças veiculadas por alimentos são um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, sendo responsáveis por reduções no crescimento econômico global. A contaminação de alimentos com patógenos e seu crescimento, multiplicação e/ou produção de toxinas é de interesse da saúde pública (CARMO; LIMA; SOUZA, 2008). Para garantir que os alimentos são microbiologicamente seguros, tanto os manipuladores e os alimentos precisam ser continuamente monitorados. As análises microbiológicas refletem as condições higiênicas que envolvem a produção, armazenamento, transporte e manuseio além de elucidar a ocorrência de enfermidades transmitidas por alimentos (EFSA, 2006).

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

2.3.1 *Staphylococcus aureus*

Bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Micrococcaceae*, são esféricas, Gram positiva, aeróbia ou anaeróbia facultativa, não formadora de esporos, com diâmetro variando de 0,5 a 1,5 μm (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008), mesófila, com uma temperatura mínima para a sua proliferação a 10°C, mas são necessárias temperaturas mais altas para

produzir toxina ($>15^{\circ}\text{C}$). *Staphylococcus aureus* é halotolerante e capaz de se desenvolver em meios com atividade de água baixa como 0,86. A presença deste micro-organismo em grande número costuma indicar práticas ineficientes de produção e higiene (BEIRÃO et al., 2000). O pH mínimo para a sua proliferação é 4,5. Estas exigências de desenvolvimento acima referidas estão relacionadas com a proliferação em meio laboratorial quando outros fatores são ótimos. Isto nem sempre é o caso nos alimentos em que outros fatores limitantes podem atuar conjuntamente. Vale salientar, que cepas de *Staphylococcus aureus* pode estar presente no conduto nasal, nos olhos, na garganta, no trato gastrintestinal e na superfície da pele de homens, onde é mais frequente nas mãos, braços, rosto e feridas, não são boas competidoras e não crescem bem na presença de outros micro-organismos (BARROS, 2009; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A enterotoxina estafilocócica é termoestável e pode permanecer no alimento mesmo após o cozimento, possibilitando desta forma, a instalação de um quadro de intoxicação de origem alimentar (CARMO; LIMA; SOUZA, 2008; BALABAN; RASOOLY, 2000; CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002).

2.3.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é a espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos. Esse micro-organismo pertence à família *Enterobacteriaceae* e entre suas principais características destacam-se: bacilos Gram negativos, não esporulados, capazes de fermentar a lactose, com produção de ácido e de gás, embora alguns sejam anaerogênicos (FRANCO, LANDGRAF, 2008). Também são capazes de crescer na presença de sais biliares, os quais inibem as bactérias Gram positivas (JAY; TONDO, 2005).

Escherichia coli patogênica pode ser veiculada por meio de alimentos contaminados, sendo capaz de ocasionar desde leve diarreia até doenças graves com a síndrome urêmica hemolítica, dependendo do sorogrupo incriminado. Os manipuladores de alimentos podem desempenhar importante papel na transmissão de enfermidades veiculadas por alimentos, tanto por hábitos inadequados de higiene pessoal, ou por serem portadores de micro-organismos patogênicos. Os equipamentos e utensílios mal higienizados, assim como os vetores e pragas, também contribuem para a contaminação dos

produtos industrializados (FRANCO, 2010). O período de incubação é de 8 a 72 horas e causa diarreia, vômito, cólica e náuseas (SILVA JR., 2014). A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância para a saúde pública, pelo potencial risco de causar doenças transmitidas pelo alimento (CATÃO; CEBALLOS, 2001).

2.4 Aplicação do óleo essencial em produtos cárneos

A conservação da carne envolve a aplicação de medidas para retardar ou prevenir alterações microbiológicas, químicas e/ou físicas que a tornam imprópria para o consumo ou que reduzem alguns aspectos da sua qualidade. Apesar de os vários tipos de alterações serem significativos, a deterioração microbiológica é a mais importante e geralmente precede aos outros tipos de deterioração da carne (KINSMAN et al., 1994).

De acordo com Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008), a aplicação de óleos essenciais de plantas para o controle de micro-organismos patogênicos e deteriorantes associados a alimentos requer a avaliação do espectro de ação frente aos micro-organismos associados ao alimento em questão, bem como dos efeitos que a própria composição do alimento exercerá sobre esta atividade.

Dentre os métodos de conservação disponíveis, a indústria alimentícia busca cada vez mais a substituição de métodos tradicionais de conservação, como os tratamentos térmicos intensos, por novas técnicas de preservação, principalmente devido à demanda crescente, por parte dos consumidores, por produtos saborosos, nutritivos, naturais e de conveniência (RAHMAN; KANG, 2009; VIUDA-MARTOS et al., 2010a). A segurança da utilização de aditivos químicos também tem sido cada vez mais questionada, como resultado de uma maior preocupação com os riscos à saúde e de uma maior capacidade para avaliar a segurança/toxicidade dos diversos aditivos (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Lemay et al. (2002) apontam que a utilização de óleos essenciais é particularmente viável em produtos cárneos, em função de que ervas e especiarias já são comumente utilizadas nestes produtos a fim de conferir sabores típicos aos mesmos. Desta forma, a adição de óleos essenciais não seria tão limitante quanto o que é em outros tipos de alimentos.

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

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

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

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

2.5 Extrato de beterraba

A perda da qualidade em carnes e produtos cárneos tem por principais causas a deterioração química e microbiológica. A deterioração química está associada principalmente à oxidação lipídica, que ocasiona alterações na qualidade sensorial do produto em atributos como cor, sabor, odor e textura, e

também na formação de compostos tóxicos, afetando a qualidade nutricional. O processo de oxidação lipídica depende de fatores como a composição da carne ou produto cárneo, presença de luz, temperatura de armazenamento e principalmente, a disponibilidade de oxigênio (KARRE; LOPEZ; GETTY, 2013; SHAH; DON BOSCO; MIR, 2014). A perda de cor e a oxidação lipídica correspondem aos maiores problemas apresentados por produtos à base de carne suína, como linguiças frescas, nos períodos de processamento e estocagem (BALDIN et al., 2016). Por isso, a indústria da carne tem utilizado corantes para reduzir a perda da cor durante a vida útil dos produtos cárneos processados. Tem-se observado uma popularização dos corantes naturais entre os consumidores nos últimos vinte anos devido aos riscos que os corantes sintéticos trazem, como intolerância e aumento ou desenvolvimento de alergias (BLOUKAS; ARVANITOYANNIS; SIOPI, 1999; VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

A beterraba é uma hortaliça originária das regiões de clima temperado da Europa e Norte da África, que pertence à família *Chenopodiaceae*, caracterizada por possuir uma raiz tuberosa comestível. No Brasil é cultivada principalmente nas regiões Sudeste e Sul (CAMARGO FILHO; MAZZEI, 2002; INSTITUTO FNP, 2007). Existem poucas cultivares plantadas no Brasil, sendo a cultivar mais tradicional a *Early Wonder*, também chamada de beterraba vermelha ou “de mesa”, que apresenta raízes com formato regular e forte coloração vermelha (HERNANDES et al., 2007).

A beterraba além de ser muito nutritiva, possui forte apelo sensorial, devido à sua cor vermelho-intensa (HERNANDES et al., 2007). A coloração da beterraba é justificada pela presença das betalaínas, que são pigmentos nitrogenados característicos de ordem *Caryophyllales*, da qual essa hortaliça faz parte. Este pigmento é bastante hidrossolúvel e inclui as betacianinas, responsáveis pela coloração vermelha-violeta e as betaxantinas, de coloração amarelo-laranja. As betalaínas são consideradas um dos mais importantes corantes naturais e foram dos primeiros desenvolvidos para uso em indústrias de alimentos. Entretanto, pouco se conhece sobre os efeitos na saúde das betalaínas em comparação a outros corantes naturais, tais como carotenoides e antocianinas (CAI; SUN; CORKE, 2003; CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002; GANDÍA-HERRERO; GARCÍA-CARMONA; ESCRIBANO, 2005;

STINTZING; CARLE, 2007). As betalaínas são pigmentos naturais que estão presentes em beterrabas sendo classificadas em betacianinas, que conferem cor vermelho-violeta à beterraba, e as betaxantinas, um corante amarelo-laranja também presente na beterraba vermelha em menor proporção que as betacianinas (DRUNKLER, 2001).

Esta hortaliça, bem como seus extratos e corantes são universalmente permitidos como ingredientes na indústria de alimentos, sendo amplamente empregados. Além disso, a beterraba possui importantes compostos bioativos, dentre os quais se destacam as betalaínas, as fibras e, atualmente, o nitrato (KANNER; HAREL; GRANIT, 2001; CAI; SUN; CORKE, 2003).

Além disso, a beterraba vermelha possui uma alta capacidade de cultivo, baixo custo de processamento e término do produto final em relação aos demais corantes naturais, justificando assim sua utilização na indústria de alimentos (DRUNKLER; FETT; BORDIGNON-LUIZ, 2003). No entanto, seu uso ainda é limitado devido à baixa estabilidade da cor, que é dependente de fatores como pH, temperatura, presença ou ausência de oxigênio e de luz, atividade de água. Vários aditivos, como os ácidos ascórbicos, tânico e gálico demonstraram exercer efeitos positivos na estabilidade de betalaínas em sua matriz natural, bem como no pigmento purificado e preparações (DUNKLER; FALCÃO; BORDIGNON-LUIZ, 2004).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da adição conjunta de óleo essencial de tomilho e de extrato de beterraba em embutido cárneo para redução parcial ou total de nitrato e nitrito de sódio.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar físico-quimicamente o extrato de beterraba.

Detectar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Determinar a concentração mínima inibitória e a concentração mínima bactericida do óleo essencial frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Desenvolver embutido cárneo adicionado de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba reduzindo total ou parcialmente nitratos e nitritos.

Monitorar a evolução da contaminação microbiana, do pH e da rancificação do embutido cárneo adicionado de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba durante o armazenamento a 7°C.

Avaliar a aceitabilidade sob o ponto de vista sensorial dos produtos elaborados.

4 Hipóteses

O óleo essencial de tomilho apresenta efeito antimicrobiano *in vitro* frente às bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

A adição conjunta de óleo essencial de tomilho e de extrato de beterraba inibe os micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e confere a coloração característica de embutido cárneo *in situ* permitindo a redução parcial ou total de nitritos e nitratos em embutido cárneo.

O embutido cárneo adicionado de óleo essencial de tomilho e de extrato de beterraba apresentará boa aceitação sensorial.

5 Materiais e métodos

5.1 Material

Será utilizado o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), obtido comercialmente da empresa Ferquima, Indústria e Comércio de Óleos Essenciais, acondicionado em frasco âmbar, lacrados, com volume total de 100 mL.

5.2 Caracterização do óleo essencial de tomilho

5.2.1 Perfil cromatográfico de terpenos

O perfil cromatográfico dos terpenos será realizado por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (VALLILO et al., 2006).

5.2.2 Determinação de compostos fenólicos totais

O teor total de compostos fenólicos será determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (SWAIN; HILLS, 1959). Para isto, 0,1 g de óleo essencial de tomilho será diluído em 10 mL de metanol e ficará em repouso por 24 h. Após, 1 mL desta solução será diluído em 9 mL de etanol, desta nova solução serão retirados 0,1 mL e diluídos em 4 mL de etanol, posteriormente, serão retirados 0,5 mL da solução final para a reação, sendo a esta adicionados 250 μ L de solução de Folin-Ciocalteu 0,25 mol.L⁻¹, que reagirá por 3 min. Após, 500 μ L de carbonato de sódio 1 mol.L⁻¹ será adicionado. A mistura reacional será armazenada no escuro por 2 h e após será realizada a leitura em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.) a 725 nm. Para a quantificação dos compostos fenólicos será utilizada uma curva padrão preparada com ácido gálico, sendo os resultados expressos em mg de ácido gálico (EAG) 100g⁻¹ de amostra.

5.2.3 Avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial de tomilho

A avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial será realizada através de quatro metodologias fenotípicas: disco difusão, atividade antimicrobiana em micro-atmosfera, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima. Serão testados os efeitos antimicrobianos do composto sobre as cepas padrão das espécies de bactérias *Staphylococcus*

aureus (ATCC 10832) e *Escherichia coli* (ATCC 43895). A escolha destas espécies se deu pelo fato de possibilitar o teste do óleo essencial contra modelos de bactérias Gram positivas (*S. aureus*) e Gram negativas (*E. coli*).

5.2.3.1 Reativação dos micro-organismos

As bactérias utilizadas no experimento são mantidas sob congelamento em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção 3:1 (v:v). Para realizar a reativação, uma alçada dessas bactérias será transferida para caldo Soja Trypticaseína (TSB) ou BHI e incubadas em estufa durante 24 h a 37 °C. Após uma alçada desse crescimento será estriada em placas de Petri com meios seletivos, sendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *E. coli* e ágar Baird-Parker para *S. aureus*, e incubadas por 24 h a 37°C, para o isolamento das colônias.

Do crescimento bacteriano nas placas de Petri, será extraída uma alçada e re-suspendida em solução salina (NaCl 0,85%), a qual será padronizada na concentração 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Todos os ensaios serão realizados em triplicata.

5.2.3.2 Disco difusão

A análise de disco difusão será realizada de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2015a) com pequenas modificações.

A solução salina contendo o inóculo será semeada com auxílio de um swab estéril na superfície de placas com ágar Muller-Hinton. Em seguida serão adicionados discos de papel filtro esterilizados com diâmetro de 6 mm. Após 10 µL do óleo essencial de tomilho serão impregnados sobre os discos de papel e as placas incubadas por 24 h a 37 °C. Logo após este período será efetuada a medição dos halos de inibição, sendo os resultados expressos em centímetros.

5.2.3.3 Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera

A atividade antimicrobiana em micro-atmosfera será avaliada pela técnica proposta por Ghabraie et al. (2016) com pequenas modificações. Alíquotas de 0,1 mL de suspensões celulares das bactérias serão inoculadas na superfície de placas com Agar BHI (15 mL – camada de 6 mm). Na tampa

de cada placa serão posicionados discos de papel estéreis nos quais serão adicionados diferentes volumes da substância antimicrobiana (100, 50, 25, 12,5 µL), as placas serão imediatamente fechadas de modo invertido (tampa para baixo), e incubadas a 37°C por 24 h. A ação antimicrobiana será expressa pelo percentual de redução na contagem celular (UFC) dos tratamentos com a substância antimicrobiana comparados com um controle contendo água estéril. A concentração da substância antimicrobiana será expressa em função do volume de substância e do espaço livre na placa ($\pi \times r^2 \times h = 3.14 \times 4.52 \times 1.5 = 95 \text{ cm}^3$; 95 - 15 mL de ágar = 80 cm³ de espaço livre).

5.2.3.4 Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CMI) será realizada de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2015b) com pequenas modificações.

Para isto serão utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, em que serão acrescentados em cada poço 100 µL de caldo BHI, 100 µL de inóculo (80 µL de caldo BHI e 20 µL de água salina com crescimento bacteriano) e o composto em cinco diferentes concentrações de composto (100 µL de composto puro); 1:5 (20 µL de composto e 80 µL de dimetilsulfóxido (DMSO)); 1:10 (10 µL de composto e 90 µL de DMSO); 1:100 (1 µL de composto e 99 µL de DMSO) e 1:1000 (0,1 µL de composto e 99,9 µL de DMSO).

Após o preparo da amostra, as placas de microtitulação serão lidas em espectrofômetro (Biochrom EZ Read 400) entre 620 nm e 630 nm. Em seguida, serão incubadas por 24 h a 37°C, e, após, será realizada uma nova leitura em espectrofotômetro. A CMI será considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura.

5.2.3.5 Concentração Bactericida Mínima

Após a realização da CMI, serão retirados 15 µL dos poços das amostras que tiveram inibição e espalhados em placas de Petri com ágar TSA ou BHA (*Brain Heart Infusion Agar*) e incubados por 24 h a 37°C. Será considerada a mínima concentração bactericida as placas onde não houver crescimento bacteriano.

5.3 Obtenção do pigmento de beterraba

O suco de beterraba será extraído em extratora de suco e posteriormente liofilizado para obtenção do concentrado em pó.

5.3.1 Avaliação do concentrado em pó

5.3.1.1 Umidade

De acordo com Instituto Adolfo Lutz (2008), a forma mais simples de obter esse valor é a utilização do método de perda por dessecação em estufa a 105°C. A técnica consiste em pesar de 2 a 10 gramas de amostra (pulverizada) em cápsula de porcelana (com peso conhecido e previamente seca em estufa) e levar a estufa para aquecimento a 105°C. Após 3 horas, retirar da estufa e resfriar em dessecador e pesar. Repetir as operações de aquecimento/resfriamento até peso constante. Após, aplicar os valores obtidos à fórmula:

$$\text{Umidade, \% (m/m)} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Em que:

P_i = Peso inicial da amostra (amostra úmida) em gramas (descontado o peso da cápsula)

P_f = Peso final da amostra (amostra seca) em gramas (descontado o peso da cápsula)

5.3.1.2 Teor de açúcar (redutores e totais)

A determinação de açúcares redutores (AR) e açúcares totais (AT) será realizada pelo método de Fehling, segundo descrição das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

5.3.1.3 Sólidos solúveis (no suco)

A partir dos sucos de beterraba homogeneizados serão realizadas as análises de sólidos solúveis em refratômetro de bancada do tipo Abbé (AOAC, 1995).

5.3.1.4 Cor

Para determinação física de cor será utilizado um colorímetro Minolta CR 400, através do sistema de leitura CIELAB (*Commission Internationale de Eclairage*), representado pelos seguintes parâmetros: coordenada L^* expressa o grau de luminosidade da cor medida ($L^* = 100 =$ branco; $L^* = 0 =$ preto), a coordenada a^* expressa o grau de variação entre o vermelho (+60) e o verde (-60) e a coordenada b^* expressa o grau de variação entre o azul (-60) e o amarelo (+60). Os valores a^* e b^* serão utilizados para calcular o ângulo Hue [$\arctan(b^*/a^*)$] e o Croma [$(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$] (BORGES et al., 2013).

5.3.1.5 pH

A partir dos sucos de beterraba homogeneizados e da re-suspensão do concentrado em pó serão realizadas as análises de pH em potenciômetro (Digimed pHmetro DM-20) (AOAC, 1995).

5.4 Preparação do embutido cárneo

Os embutidos cárneos serão elaborados no laboratório de processamento da Universidade Federal de Pelotas, de acordo com a formulação apresentada na Tabela 1. Além dos ingredientes utilizados na formulação controle, as formulações serão adicionadas de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba, conforme a seguinte descrição:

- Óleo essencial = 0,5%
- Extrato de beterraba = 1,5%

A carne e gordura suína (toucinho) serão moídos em moedor de carne (Britânia) com disco de 6 mm de diâmetro. Os demais ingredientes e aditivos passarão por uma pré-mistura antes de serem manualmente misturados à carne e a gordura, em recipientes de aço inoxidável previamente lavados e sanificados com álcool 70%.

Tabela 1. Ingredientes utilizados na formulação do embutido cárneo em três formulações diferentes.

Ingrediente/aditivo	Controle (%)	F1 (%)	F2 (%)
Carne suína magra	77,43	76,23	75,83
Toucinho	12,13	12,13	12,13
Água gelada/gelo	7,76	7,76	7,76
Sal (NaCl)	1,18	1,18	1,18
Sal de Cura (nitrito e nitrato de sódio)	0,28	-	0,14
Estabilizante (polifosfato)	0,26	-	0,13
Fixador de cor (eritorbato de sódio)	0,26	-	0,13
Condimento comercial para linguiça Toscana	0,52	0,52	0,52
Açúcar	0,18	0,18	0,18
Óleo essencial de tomilho	-	0,5	0,5
Extrato de beterraba	-	1,5	1,5

A massa cárnea resultante será embutida em tripa natural suína, em embutideira elétrica, e as linguiças serão acondicionadas em porções, identificadas e armazenadas a 7°C.

5.5 Contaminação intencional do embutido com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

O embutido cárneo sem (controle negativo) e com adição do óleo essencial e extrato de beterraba para avaliação da atividade antimicrobiana será experimentalmente contaminado com os micro-organismos que se mostrarem sensíveis ao óleo correspondente. No final do preparo do embutido cárneo, será adicionado separadamente inóculos de 1 mL (padronizados na concentração 0,5 na escala de McFarland que equivale $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) de *S. aureus* (ATCC 10832) e *E. coli* (ATCC 43895). Como controle também será

preparado embutido com e sem adição de óleo e de extrato de beterraba e não contaminado experimentalmente.

5.6 Aplicação do óleo essencial de tomilho e do extrato de beterraba no embutido cárneo

Serão aplicadas na forma de quatro formulações, conforme descrito a seguir. As formulações onde houver contaminação microbiana serão repetidas para cada microrganismo separadamente.

Formulação 1 – embutido cárneo com adição de conservante químico e sem contaminação microbiana, sem adição de óleo essencial e extrato de beterraba.

Formulação 2 – embutido cárneo com adição de conservante químico e com contaminação microbiana, sem adição de óleo essencial e extrato de beterraba.

Formulação 3 – embutido cárneo sem adição de conservante químico e com contaminação microbiana, com adição de óleo essencial (0,5%) e extrato de beterraba (1,5%).

Formulação 4 – embutido cárneo com adição de 50% de conservante químico e com contaminação microbiana, com adição de óleo essencial (0,5%) e extrato de beterraba (1,5%).

5.7 Avaliação da adição de óleo essencial de tomilho e de extrato de beterraba em embutido cárneo

5.7.1 Avaliação microbiológica

Os produtos após elaborados de acordo com os tratamentos serão mantidos em temperatura de refrigeração (<7 °C) por até dez dias. A partir de cada um dos produtos será retirada uma amostra de 25 g em quatro tempos, logo após a elaboração do produto, três dias após a elaboração dos produtos, sete dias após a elaboração e dez dias após a elaboração. Estas amostras serão submetidas a contagem bacteriana nos meios ágar para contagem total - PCA (todas as amostras), após incubação a 37 °C por 24/48 h; ágar Baird-Parker (amostras contaminadas com *S. aureus*) após incubação a 37 °C por 48 h e ágar EMB (amostras contaminadas com *E. coli*) após incubação a 37 °C por 24/48 h.

5.7.2 Avaliação sensorial

Para avaliação sensorial os embutidos serão submetidos a cocção. Serão avaliados os atributos sabor, cor, aparência e odor. A análise será executada em cabines individualizadas, com a participação de no mínimo 80 julgadores não treinados, de ambos os sexos, pertencentes à comunidade acadêmica da Universidade Federal de Pelotas - UFPel. Para tanto, será empregada uma escala hedônica de 9 pontos, em que o valor 1 corresponderá a descrição “desgostei extremamente” e o valor 9 a “gostei extremamente” (GULARTE, 2009).

Cada julgador receberá uma ficha de avaliação e o termo de consentimento livre e esclarecido, juntamente das amostras apresentadas em recipientes descartáveis, de cor branca, codificados com três dígitos aleatórios. Será também solicitado aos julgadores que expressem sua intensão de compra do produto, através de uma escala hedônica de 5 pontos, tendo por extremos as expressões “só compraria se fosse forçado” (1) e “compraria muito frequentemente” (5). Ainda, será pesquisada a frequência de consumo do produto pelos avaliadores, tendo como opções: “consumo todos os dias”, “consumo frequentemente”, “consumo ocasionalmente”, “consumo raramente” ou “nunca consumo” (GULARTE, 2009).

Será calculado o índice de aceitabilidade (IA), através da equação 1:

$$IA (\%) = A \times 100 / B \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que: A = nota média obtida para o produto e B = nota máxima dada ao produto.

Os resultados serão expressos em porcentagem.

5.8 Análise Estatística

Análises de regressão polinomial serão realizadas para descrever as variações em relação ao tempo de estocagem. Será também aplicado uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Fisher de Mínima Diferença Significativa (*LSD test*) para verificar se existirão diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações utilizadas em relação a inibição microbiana.

6 Resultados e impactos esperados

Com este estudo, espera-se que o óleo essencial apresente um efeito antimicrobiano frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli* e o extrato de beterraba reduza a perda da coloração causada pela redução de nitrito ou mesmo confira melhor coloração ao produto, sem afetar a estabilidade físico-química e sensorial. Também, que estes resultados sejam uma alternativa promissora para conservantes químicos artificiais em embutidos cárneos, diminuindo riscos a saúde e atendendo as necessidades e expectativas dos consumidores.

8 Orçamento

O projeto será realizado com recursos do PROAP-CAPES e do comitê de orientação (principalmente do orientador) oriundo de outras fontes de financiamento. O orçamento pode ser visualizado na tabela 3.

Tabela 3. Orçamento do projeto.

Descrição	Quantidade	Valor Total (R\$)
Cloreto de Sódio (NaCl)	500 g	8,20
Ágar Triptona de Soja (TSA)	500 g	207,70
Infusão Cérebro e Coração (BHI)	500 g	218,65
Caldo Triptona de Soja (TSB)	500 g	182,75
Etanol P. A.	1 L	15,45
Papel toalha	1 Pacote	14,50
Caixa porta ponteira de 200 microlitros	1	5,40
Microtubo 1,5 mL pacote com 1000 unidades	1 Pacotes	30,00
Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG)	500g	484,00
Glicerol P. A.	1 L	23,50
Swab estéril com 100	1 Caixa	14,00
Papel filtro 50x50	1 Caixa	61,30
Placas de Petri estéreis descartáveis 90x15 (com 10 unid.)	10 Pacotes	52,00
Placas microtitulação de 96 poços com tampa com 50 unid.	1 Pacote	146,80
Ponteiras descartáveis brancas 1-20ul com 1000 unid.	1 Unidade	14,00
Tubos de Ensaio com rosca e tampa 16 x150	50 Unidades	112,50
Ponteira amarela 1-200 uL com 1000 unid.	1 Pacote	12,45
Ponteira azul 100-1000 ul com 1000 unid.	1 Pacote	26,80
TOTAL		1630

9 Referências Bibliográficas

AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI. Antioxidant Activity of Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 10835–10847, 2013.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 16th ed. Washington, 1995.

ASCENÇÃO, V. L.; MOUCHREK FILHO, V. E. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Caderno de Pesquisa**, v. 20, n. especial, 2013.

BAJPAI, V. K.; KWANG-HYUN BAEK, S. C. K. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**. Volume 45. Issue 2. March 2012. p. 722-734. 2012.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 1-10, Oct. 2000.

BALDIN, J. C.; MICHELIN, E. C.; POLIZER, Y. J.; RODRIGUES, I.; GODOY, S. H. S.; FREGONESI, R. P.; PIRES, M. A.; CARVALHO, L. T.; FERNANDES, A. M.; TRINDADE, M. A. Microencapsulated jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract added to fresh sausage as natural dye with antioxidant and antimicrobial activity. **Meat Science**, v. 118, p. 15-21, 2016.

BARROS, B. C. V. **Avaliação da qualidade sanitária do pescado Salgado seco comercializado nas feiras livres de Belém-PA**. 45p. Trabalho de Conclusão de Programa de Especialização em Veterinária de Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal – HIPOA. 2009. Universidade Castelo Branco. Belém. 2009.

BEIRÃO, H. et al. Processamento e industrialização de moluscos. In: Seminário e Workshop Tecnologias para Aproveitamento Integral Do Pescado, 1., 2000. Campinas. **Anais...** Campinas: Centro de Tecnologia de Carnes, ITAL, 2000. p. 38-84. 2000.

BENCHAAAR, C.; CALSAMIGLIA, S.; CHAVES, A. V.; FRASER, G. R.; COLOMBATTO, D.; MCALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 209-228. 2008.

BLOUKAS, J. G.; ARVANITOYANNIS, I. S.; SIOPI, A. A. Effect of naturals and nitrites on colour attributes of frankfurters. **Meat Science**, v. 52, p. 257-265, 1999.

BORGES, C. D. et al. Conservação de morangos com revestimentos à base de goma xantana e óleo essencial de sálvia. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 29, n. 5, p. 1071-1083, Sept./Oct. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa n. 4, de 31 de março de 2000**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. Diário Oficial da União, Brasília 05/04/2000, Seção 1, p. 6-10, 2000.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

BUSATO, N. V. et al. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1574-1582, 2014.

CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2288-2294, 2003.

CAMARGO FILHO, W. P.; MAZZEI, A. R. O Mercado de beterraba em São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 56-58, 2002.

CARMO, E. S.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L. S. The potential of *oreganum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 362-367, 2008.

CARTAXO, J. L. S. **Riscos associados aos níveis de nitritos em alimentos : uma revisão**. 2015. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

CARVALHO, H. H. C.; CRUZ, F. T.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 7, n. 3, p. 25-32, 2005.

CASTELLANI, D. C.; DOMENICO, C. I.; RONCOLETTA, L. M. A.; SILVA, A. C.; TOZAKI, R. M.; OLIVEIRA, D. H. Coeficientes técnicos de produção de priprioca (*Cyperus articulatus* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, especial, p. 606-611, 2011.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. Pesquisa de *Listeria spp.*, coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Cienc. Tecnol. Aliment.** v. 21, p. 281-287, 2001.

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oils Research**. s.l. n.12, p. 630-649, 2000.

CHEVALLIER, I. et al. Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. **Food Control**, [S.l.], v. 17, n. 6, p. 446-453, June 2006.

CHORIANOPOULOS, N. et al. Essential oils of satureja, origanum, and thymus species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 8261-8267, 2004.

CLSI, 2015a. M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI (Clinical Lab. Stand. Institute) 35.

CLSI, 2015b. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI (Clinical Lab. Stand. Institute) 35.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes Alimentícios. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 203-220, jul.-dez. 2002.

COWAN, M. M. Plant product as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 12, no. 4, p. 564-582. 1999.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R. The Mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* tea tree oil. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 88, n. 1, p. 170–175, 2000.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**. 2002, vol.22, n.3, pp. 263-271. 2002.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: Possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, vol. 14, p. 273–285, 2004.

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.

DRUNKLER, D. A. **Estudo da estabilidade de betalaínas em diferentes solventes e em extrato de beterraba (*Beta vulgaris* L.) adicionado de ciclodextrinas (alfa, β -e γ) e ácidos orgânicos (tânico e gálico)**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

DRUNKLER, D. A.; FALCÃO, L. D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Influência dos ácidos tânico e gálico na estabilidade de betacianinas do extrato bruto de beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.). **Alim Nutr**. 15 (1): 35-41. 2004.

DRUNKLER, D. A.; FETT, R.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Betalaínas extraídas da beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.). Bol. **SBCTA**. 37 (1): 14-21. 2003.

EBRAHIMABADI, A. H. et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, v. 119, p. 452-458, 2010.

ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCÍA, D.; ANDPAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**. vol. 22, p. 896–902, 2011.

European Food Safety Authority (EFSA) – Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004. **EFSA J.**, n. 310 , 10; 23-95. 2006.

FRANCO, B. D. G. M. et al. Viabilidade de *Escherichia coli* patogênica em linguiça frescal suína. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 3, p. 319-325, 2010.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FRATIANNI, F. et al. Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 8, p. 528-535, 2010.

GAIO, I. et al. Antibacterial activity of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) in Italian-type sausage. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 10, n. 4, p. 323-329, 2015.

GANDÍA-HERRERO, F.; GARCÍA-CARMONA, F.; ESCRIBANO, J. A novel method using high-performance liquid chromatography with fluorescence for the determination of betaxanthins. **Journal of chromatography A**, v. 1078, p. 83-89. 2005.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: Princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 511 p. 2008.

GHABRAIE, M.; VU, K. D.; TATA, L.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. **LWT - Food Science Technology** v. 66, p. 332–339, 2016.

GREATHEAD, H. Plants and plant extracts for improving animal productivity. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 2, p. 279-290, 2003.

GULARTE, M. A. **Manual de análise sensorial de alimentos**. Pelotas: Edigraf UFPel, 2009.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology** , v. 124, p. 91–97, 2008.

HAJIMEHDIPOOR, H.; SHEKARCHI. M.; KHANAVI, M.; ADIB, N.; AMRI, M. A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. **Pharmacognosy Maganize**, 6:154-158. 2010.

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

HELANDER, I. M. et al. Action of Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 46, No. 9, 1998.

HERNANDES, N. K.; CONEGLIAN, R. C. C.; GODOY, R. L. O.; VITAL, H. C.; FREIRE JUNIOR, M. Testes Sensoriais de Aceitação da Beterraba Vermelha (*Beta vulgaris* ssp. *Vulgaris* L.), cv. *Early Wonder*, minimamente processada e irradiada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27 (supl.), p. 64-68, ago. 2007.

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

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IV ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 1020p. 2008.

INSTITUTO FNP. *Agrianual 2007: anuário da agricultura brasileira*, São Paulo, 516 p. 2007.

JAY, J. M.; TONDO, E. C. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

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

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

KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Betalains: a new class of dietary cationized antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5178-5185. 2001.

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

KARRE, L.; LOPEZ, K.; GETTY, K. J. K. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Sci.** 94, 220-227. 2013.

KERROLA, K.; GALAMBOSI, B.; KALLIO, H. Volatile components and odor intensity of four phenotypes of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 776-781, 1994.

KINSMAN et al. Muscle Foods, Meat, Poultry and Seafood Technology, New York: Chapman & Hall, 1994.

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

KREUTZ, D. H.; WEIZENMANN, M.; MACIEL, M. J.; SOUZA, C.F.V. Avaliação das concentrações de nitrito e nitrato em hortaliças produzidas em cultivos convencional e orgânico na região do Vale do Taquari. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde.**; 14(2):105-10. 2012.

LEMAY, M. et al. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 217 – 226, 2002.

LISI, A.; TEDONE, L.; MONTESANO, V.; SARLI, G.; NEGRO, D. Chemical characterisation of Thymus populations belonging from southern Italy. **Food Chemistry**, 125:1284-1286. 2011.

MARQUES, S. C. et al. Avaliação higiênico-sanitária de linguças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras MG. **Ciênc Agrotec.**, v. 30, n. 6, p. 1120-3, 2006.

MELO FILHO, A. B.; BISCONTINI, T. M. B.; ANDRADE, S. A. C. Níveis de nitrito e nitrato em salsichas comercializadas na região metropolitana do Recife. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 390–392, 2004.

MOREAU, R. L. M., SIQUEIRA, M. E. P. B. Toxicologia Analítica. Rio de Janeiro: Guanabarra Koogan; 2008.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Antimicrobial activity of the essentials oils: a multifactor approach of the methods. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 1, p.108-113, 2007.

OLIVEIRA, D. F.; COELHO, A. R.; BURGARDT, V. C. F.; HASHIMOTO, E. H.; LUNKES, A. M.; MARCHI, J. F.; TONIAL, I. B. Alternativas para um

produto cárneo mais saudável: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 3, p. 163-174, 2013.

OLIVEIRA, J. M., ARAÚJO, W. M. C., BORGO, L. A. Quantificação de nitrato e nitrito em linguiça do tipo frescal. **Ciênc Tecnol Aliment.**; 25(4):736-42. 2005.

OLIVEIRA, L. M.; NEPOMUCENO, C. F.; FREITAS, N. P.; PEREIRA, D. M. S.; SILVA, G. C.; LUCCHESI, A. M. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. Ex Benth. e *Hyptis platanifolia* Mart ex Benth. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 1, p. 73-78, 2011.

OLIVO, R. Alterações oxidativas em produtos cárneos. In OLIVO, R. **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. Criciúma, SC: Ed. Do Autor. Cap. 44, p. 533-542. 2006.

ORDOÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos**. Vol. 2 - Alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed. 279 p. 2005.

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

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

OZCAN, M.; CHALCHAT, J.C. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 30:68-73. 2004.

PEREIRA M. C.; VILELA, G. R.; COSTAS, L. M. A. S.; COSTAS, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciências Agrotecnicas**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus Officinalis* L.): Propriedades Antimicrobiana e Química do Óleo Essencial. *Boletim CEPPA*, 19:193-210. 2008.

RAHMAN, A.; KANG, S. inhibition of foodborne pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of *Erigeron ramosus* (walt.) b.s.p. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 176–189, 2009.

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

SHAH, M. A; DON BOSCO, S.J.; MIR, S. A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*, v. 9, p. 21-33, 2014.

SHAHIDI, F. **Natural Antioxidants - Chemistry, Health Effects and Applications.** Champaign, Illinois: AOCS Press, 1997.

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

SHYLAJA, M. R.; PETER, K. V. The functional role of herbal spices. In: *Handbook of herbs and spices*. V.2. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 360 p., 2004.

SILVA JR., E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação.** 7. ed. São Paulo: Varela, 2014.

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

STAMFORD, T.L., *et al.* Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. **Ciênc. Tecnol. Aliment. [online]**. vol.26, n.1, pp. 41-45. 2006.

STINTZING, F. C.; CARLE, R. Betalains – emerging prospects for food scientists. **Trends in Food Science and Technology**, n. 12, p. 514-525. 2007.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.19, p. 63-68, 1959.

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**, São Leopoldo: Editora Unisinos, 216p. 1998.

UPNMOOR, I. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares.** Guaíba: Agropecuária. 56p. 2003.

VALLILO, M. I.; LAMARDO, L. C. A.; GABER-LOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E.; MORENO, P. R. H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.4, p. 805-810, 2006.

VASCONCELLOS, F. Após baixa, consumo de carne suína sobe 26% no Brasil, 2015. Disponível em: <<http://blogs.oglobo.globo.com/na-base-dos-dados/post/apos-baixaconsumo-de-carne-suina-sobe-26-no-brasil.html>>.

Acesso em fevereiro de 2018.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Chemical composition and antioxidant and anti-*Listeria* activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9063-9070, 2010a.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. *Alimentos e Nutrição*, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

WALSH, S. E.; MAILLARD J.-Y.; RUSSELL, A. D.; CATRENICH, C. E.; CHARBONNEAU, D. L., BARTOLO, R. G. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 94, p. 240-247, 2003.

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

YANG, W. Z.; AMETAJ, B. N.; BENCHAAAR, C.; HE, M. L.; BEAUCHEMIN, K. A. Cinnamaldehyde in feedlot cattle diets: Intake, growth performance, carcass characteristics, and blood metabolites. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 3, p. 1082-1092, 2010.

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

6 Relatório de Campo

Não foi realizada a determinação de compostos fenólicos totais, optando-se por fazer somente a cromatografia gasosa para avaliação do perfil químico do óleo essencial.

O objetivo inicial do projeto foi contaminar o embutido cárneo para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho frente às duas bactérias, porém devido a problema nos resultados, optou-se por fazer embutido cárneo sem a contaminação intencional.

Nos ingredientes, a carne suína foi substituída pela carne bovina, em razão da matéria-prima ser mais acessível.

Na avaliação microbiológica, acrescentou-se a análise de contagem de bactérias aeróbias mesófilas.

Os tratamentos foram submetidos a teste de atividade *in situ* em produto cárneo e avaliado nos tempos 1, 7 e 15 dias.

7 Artigo

Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e suco de beterraba em pó (*Beta vulgaris* L., cultivar *Early Wonder*)

Resumo

Introdução: Óleos essenciais tem sido estudados para substituir conservantes químicos com potencial cancerígeno. Dentre os óleos, se encontra o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*), oriundo de uma planta medicinal, tem mostrado atuar bem como aditivo natural na conservação de alimentos. As betalaínas são pigmentos naturais que estão presentes em beterrabas e são consideradas como importantes corantes naturais e dos primeiros desenvolvidos para uso em indústrias de alimentos. *Objetivo:* Avaliar o efeito da adição conjunta de óleo essencial de tomilho e suco de beterraba em pó em um embutido cárneo, para redução parcial ou total da adição de nitrato e nitrito de sódio. *Resultados:* Foi possível comprovar que o óleo essencial apresentou um controle microbiológico frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Ainda, apresentou efeito inibitório contra *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes testado *in situ* em embutido cárneo, podendo ser uma alternativa viável como conservante natural. O suco de beterraba em pó também demonstrou ser uma alternativa para atuar como um corante natural, produzindo boas características sensoriais no embutido cárneo. *Conclusão:* O uso conjunto de óleo essencial de tomilho e suco de beterraba em pó mostra viabilidade para utilização em substituição a nitrato e nitrito em embutido cárneo.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, produtos cárneos, betalaínas

Abstract

Introduction: Essential oils have been studied to replace carcinogenic chemical preservatives. Among the oils is thyme essential oil (*Thymus vulgaris*), derived from a medicinal plant, has been shown to act well as a natural additive in food preservation. Betalains are natural pigments that are present in sugar beets and are considered as important natural and early colorants developed for use in the food industries. *Objective:* To evaluate the effect of the combined addition of thyme essential oil and powdered beet juice on a meat sausage to partially or completely reduce the use of sodium nitrate and nitrite. *Results:* It was possible to prove that the essential oil presented a microbiological control against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. It also showed an inhibitory effect against positive coagulase *Staphylococcus* and thermotolerant coliforms tested in situ in meat sausage, and may be a viable alternative as a natural preservative. Powdered sugar beet juice has also been shown to be an alternative to act as a natural colorant, producing good sensory characteristics in the meat sausage. *Conclusion:* The combined use of thyme essential oil and beetroot juice powder shows viability for substitution to nitrate and nitrite in meat sausage.

Keyword: antimicrobial activity, meat products, betalains

1 Introdução

O mercado de produtos cárneos industrializados tem se expandido ano a ano, pois estes alimentos são atrativos para os consumidores, devido ao preço acessível de alguns produtos, praticidade, facilidade e rapidez no preparo (MELO FILHO; BISCONTINI; ANDRADE, 2004; OLIVEIRA et al., 2013; VASCONCELLOS, 2015; BALDIN et al., 2016).

Ao longo dos últimos anos ocorreu significativo aumento da preocupação da população em manter uma alimentação mais saudável, com a diminuição do consumo de produtos industrializados, principalmente, por estes apresentarem conservantes sintéticos com potencial carcinogênico. Esse dado foi confirmado pela Agência Internacional de Investigação do Câncer, órgão da Organização Mundial de Saúde (OMS) que concluiu que o consumo de carnes processadas por defumação e/ou cura aumenta o risco de aparecimento de cânceres (OMS, 2015).

A busca por alimentos naturais tem se tornado uma grande preocupação para a indústria de alimentos, principalmente devido a rejeição dos consumidores por conservantes químicos, servindo de motivação para encontrar alternativas naturais, que sirvam de substituto e sejam menos prejudiciais à saúde (VIUDA-MARTOS et al., 2008). Ainda, a indústria tem interesse em agentes antimicrobianos naturais que possam prolongar a vida de prateleira dos produtos e combater micro-organismos patogênicos (CALO et al., 2015).

Produtos naturais de plantas, em particular os óleos essenciais e pigmentos, têm sido indicados como alternativas promissoras para inativar patógenos em alimentos e para conferir cor (CHORIANOPOULOS et al., 2004; RAHMAN; KANG, 2009; EBRAHIMABADI et al., 2010).

Os óleos essenciais são ricos em diferentes compostos, como terpenos e fenilpropanoides, e podem melhorar a qualidade dos alimentos através de diminuição do crescimento de micro-organismos (KIM; CHO; HAN, 2013), além de conferir propriedades sensoriais e apresentarem baixa toxicidade em relação aos conservantes sintéticos (SADEGHI et al., 2015).

Dentre os óleos que apresentam comprovada atividade antimicrobiana, se encontra o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*), oriundo de uma planta medicinal, aromática e condimentar da família *Lamiaceae*, originária da

Europa e cultivada no sul e sudeste do Brasil (ROCHA, 2012). A aplicação do óleo essencial do *Thymus vulgaris* em alimentos como um aditivo natural, individualmente ou associado a outros tratamentos que objetivam impedir o crescimento microbiano, tem sido explorada por muitos autores em virtude do potencial antimicrobiano já comprovado (KOSTAKI et al., 2009; KARABAGIAS; BADEKA; KONTOMINAS, 2011; JAYASENA; JO, 2013; HAN et al., 2015; HYUN et al., 2015).

A coloração da beterraba é justificada pela presença das betalaínas, que são pigmentos nitrogenados, abundantes nessa hortalíça. A betalaína é bastante hidrossolúvel e inclui as betacianinas, responsáveis pela coloração vermelha-violeta e as betaxantinas, de coloração amarelo-laranja. As betalaínas são consideradas como importantes corantes naturais e foram dos primeiros desenvolvidos para uso em indústrias de alimentos (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002; CAI; SUN; CORKE, 2003; GANDÍA-HERRERO; GARCÍA-CARMONA; ESCRIBANO, 2005; STINTZING; CARLE, 2007).

Diante deste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da adição conjunta de óleo essencial de tomilho e de suco de beterraba em pó em embutido cárneo para redução parcial ou total da utilização de nitrato e nitrito de sódio.

2 Materiais e métodos

2.1 Material

Foi utilizado óleo essencial de tomilho branco (*Thymus vulgaris*), obtido comercialmente da empresa Ferquima, Indústria e Comércio de Óleos Essenciais, acondicionado em frasco âmbar, lacrados, com volume total de 100 mL.

E também foram utilizadas as amostras de beterraba (*Beta vulgaris* L.) de cultivar *Early wonder*, adquiridas diretamente com um produtor local do interior da cidade de Canguçu/RS, a qual localiza-se a uma latitude 31°23'42" sul e a uma longitude 52°40'32" oeste.

Foram utilizadas as cepas padrão das espécies de bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832) e *Escherichia coli* (ATCC 43895). A escolha destes micro-organismos foi para avaliar o efeito do óleo essencial de

tomilho frente a bactérias Gram positivas (*S. aureus*) e Gram negativas (*E. coli*).

2.2 Caracterização do óleo essencial de tomilho

2.2.1 Composição química do óleo essencial de tomilho

A determinação da composição química do óleo essencial de tomilho foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (GC/MS – marca Shimadzu), empregando coluna capilar RTx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Foi utilizado Hélio como gás de arraste a um fluxo de 1,82 mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 220 e 240 °C; respectivamente. A temperatura de aquecimento foi programada partindo de 40 °C por 2 min., seguido de um aumento de 3 °C/min. até 178 °C, na qual permaneceu por 5 min. O tempo total da corrida foi de 53 min. A identificação dos compostos presentes no óleo foi baseada no espectro de massas (em comparação com a biblioteca NIST 05), e as concentrações apresentadas como porcentagens relativas da área de cada pico sobre a área total.

2.2.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho

2.2.2.1 Reativação dos micro-organismos

As bactérias utilizadas no experimento foram mantidas sob congelamento em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção 3:1 (v:v). Para realizar a reativação, uma alçada dessas bactérias foi transferida para caldo Soja Trypticaseína (TSB) e incubadas em estufa durante 24 h a 37 °C. Após uma alçada desse crescimento foi estriada em placas de Petri com meios seletivos, sendo ágar Baird-Paker para *S. aureus* e ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *E. coli*, e incubadas por 24 h a 37 °C, para o isolamento das colônias.

Do crescimento bacteriano nas placas de Petri, foi extraída uma alçada e re-suspendida em solução salina (NaCl 0,85%), a qual foi padronizada na concentração 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

2.2.2.2 Disco difusão

A análise de disco difusão foi realizada de acordo com protocolo proposto pelo Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (CLSI, 2005a).

A solução salina padronizada contendo o inóculo foi semeada com auxílio de um swab estéril na superfície de placas com ágar Mueller-Hinton. Em seguida foram adicionados discos de papel filtro esterilizados com diâmetro de 6 mm. Após, 5 µL de óleo essencial de tomilho foram impregnados sobre os discos de papel e as placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. Logo após este período foi efetuada a medição dos halos de inibição, sendo os resultados expressos em milímetros.

2.2.2.3 Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera

A atividade antimicrobiana em micro-atmosfera foi avaliada pela técnica proposta por Ghabraie et al., (2016). Alíquotas de 0,1 mL de suspensões celulares das bactérias foram inoculadas na superfície de placas com ágar Soja Trypticaseína (TSA) (15 mL – camada de 6 mm). Na tampa de cada placa foram posicionados discos de papel estéreis nos quais foram adicionados diferentes volumes do óleo essencial de tomilho (100, 50, 25, 12,5 µL), as placas foram imediatamente fechadas de modo invertido (tampa para baixo), e incubadas a 37 °C por 24h. A ação antimicrobiana foi expressa pelo percentual de redução na contagem celular (UFC) dos tratamentos com o óleo essencial comparados com um controle contendo solução salina. A concentração de óleo essencial foi expressa em função do volume de óleo essencial e do espaço livre na placa ($\pi \times r^2 \times h = 3,14 \times 4,52 \times 1,5 = 95 \text{ cm}^3$; 95 -15 mL de ágar = 80 cm³ de espaço livre).

2.2.2.4 Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com protocolo proposto pelo Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (CLSI, 2005b), com pequenas modificações.

Para CIM, foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, em cada um dos poços foram inseridos 100 µL de caldo BHI e 80 uL de BHI com Tween 80. Em seguida, inseriu-se 100 µL do óleo essencial para obtenção da

concentração inicial. As concentrações subsequentes do óleo essencial foram diluídas de forma seriada. Posteriormente, foram inseridos 20 µL da suspensão do micro-organismo ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) em todos os poços, exceto na coluna correspondente ao controle.

Após o preparo da amostra, as placas de microtitulação foram lidas em espectrofotômetro (Biochrom EZ Read 400) a 620 nm. Em seguida, foram incubadas por 24 h a 37 °C, e, após, foi realizada uma nova leitura em espectrofotômetro. A CIM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura.

2.2.2.5 Concentração Bactericida Mínima

Para concentração bactericida mínima (CBM), após a realização da CMI, foram retirados 15 µL dos poços das amostras que tiveram inibição e espalhados por superfície em placas de Petri com ágar TSA e incubados por 24h a 37°C. Foi considerada a mínima concentração bactericida as placas onde não houve crescimento bacteriano neste meio.

2.3 Obtenção do suco de beterraba

Primeiramente efetuou-se uma limpeza e sanitização, através de solução de hipoclorito de sódio 200 ppm por 15 minutos, havendo um posterior enxágue em água corrente para remoção do sanitizante químico. As amostras de beterraba foram processadas em um extrator (Phillips) para obtenção do suco, o qual ainda passou por filtração em peneira para remoção de resíduo sólido do vegetal. O suco foi armazenado em ultra *freezer* (Coldlab), posteriormente submetido ao processo de liofilização (Liotop L-101 – Liobras) para obtenção do concentrado da beterraba em pó. O pó obtido foi armazenado em ultra *freezer* até o momento da sua utilização.

2.3.1 Avaliação do suco de beterraba nas formas líquida e em pó

2.3.1.1 Umidade (líquido e em pó)

De acordo com Instituto Adolfo Lutz (2008), a forma mais simples de obter esse valor é a utilização do método de perda por dessecação em estufa a 105 °C. A técnica consistiu-se em pesar de 2 a 10 gramas de amostra (pulverizada) em cápsula de porcelana (com peso conhecido e previamente

seca em estufa) e levar a estufa para aquecimento a 105 °C. Após 3 horas, retirou-se da estufa e resfriou-se em dessecador para pesagem da amostra. Repetiu-se as operações de aquecimento/resfriamento até obter o peso constante.

2.3.1.2 Teor de açúcar (sólido)

A determinação dos açúcares redutores e totais foi realizada pelo método de Fehling, segundo descrito por Instituto Adolfo Lutz (2008) com modificações.

2.3.1.2.1 Açúcares Redutores

Inicialmente, pesou-se 1 grama de amostra, adicionou-se 50 mL de água, filtrou-se no balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água. Em seguida, transferiu-se o filtrado para bureta de 25 mL.

Em um erlenmeyer, adicionou-se 2 mL de solução de Fehling A e 2 mL de solução de Fehling B, após adicionou-se 40 mL de água e levou-se em ebulição, com a ebulição adicionou-se 2 gotas de azul de metileno.

Titulou-se a solução de Fehling (sempre em ebulição) com a amostra até perda total da cor azul e formação de precipitação avermelhada.

2.3.1.2.2 Açúcares Totais

Inicialmente, pesou-se 5 gramas de amostra, adicionou-se 50 mL de água, filtrou-se no balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água. Em seguida, transferiu-se o filtrado para bureta.

Em um erlenmeyer, adicionou-se 2 mL de solução de Fehling A e 2 mL de solução de Fehling B, após adicionou-se 40 mL de água levando-se em ebulição, com a ebulição adicionou-se 2 gotas de azul de metileno.

Titulou-se a solução de Fehling (sempre em ebulição) com a amostra até perda total da cor azul e formação de precipitação avermelhada.

2.3.1.3 Sólidos solúveis (líquido)

A partir do suco de beterraba, foram realizadas as análises de sólidos solúveis em refratômetro de bancada do tipo Abbé (AOAC, 1995).

2.3.1.4 Cor (líquido e sólido)

Para determinação física de cor foi utilizado um colorímetro Minolta CR 400, através do sistema de leitura CIELAB (*Comission Internatinal de E'clairage*), representado pelos seguintes parâmetros: coordenada L^* expressa o grau de luminosidade da cor medida ($L^* = 100 =$ branco; $L^* = 0 =$ preto), a coordenada a^* expressa o grau de variação entre o vermelho (+60) e o verde (-60) e a coordenada b^* expressa o grau de variação entre o azul (-60) e o amarelo (+60). Os valores a^* e b^* foram utilizados para calcular o ângulo Hue [$\arctan(b^*/a^*)$] e o Croma [$(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$] (BORGES et al., 2013).

2.3.1.5 pH (líquido e sólido)

A partir dos sucos de beterraba homogeneizados e da re-suspensão do concentrado em pó foram realizadas as análises de pH em potenciômetro (Digimed pHmetro DM-20) (AOAC, 1995).

2.4 Preparação do embutido cárneo

Os embutidos cárneos foram elaborados no laboratório de processamento de origem animal, na Área de Alimentos do CCQFA - UFPel. Os produtos cárneos foram preparados seguindo a formulação padrão utilizada para a elaboração destes produtos, sendo: 77,5% de carne bovina, 12% de gordura suína (banha), 7,5% de água gelada e 3% de sal (NaCl).

Primeiramente foi realizada a higienização de todos os materiais e utensílios, bancadas e das mãos, utilizando água, detergente e álcool 70%. Após, com o auxílio de uma faca, a carne foi cortada em pedaços e posteriormente moída no “cutter”. Em seguida, foram misturados a carne, a banha, a água gelada e o sal.

A seguir, foram adicionados a massa obtida, quando previsto, o óleo essencial, o suco de beterraba em pó e o conservante (sal de cura contendo nitrato e nitrito de sódio). No final do preparo do produto foi embutido em tripa natural suína e mantido sob refrigeração a 4 °C por 15 dias. Na Tabela 1 podem-se visualizar as formulações utilizadas neste estudo.

Tabela 1. Ingredientes utilizados nas formulações dos embutidos cárneos em quatro tratamentos diferentes.

Tratamento	Ingredientes
Controle	FPPC*
Tratamento 1	FPPC, com 100% do conservante sal de cura
Tratamento 2, 4, 6	FPPC, com 50% de conservante sal de cura, óleo essencial de tomilho** e 1% de suco de beterraba em pó
Tratamento 3, 5, 7	FPPC, com óleo essencial de tomilho** e 1% de suco de beterraba em pó

* FPPC – Formulação padrão do produto cárneo

** Foi utilizado o óleo essencial de tomilho nas concentrações de 0,95, 0,0095 e 0,00095%

2.4.1 Avaliação da adição de óleo essencial de tomilho e de suco de beterraba em pó em embutido cárneo

2.4.1.1 Avaliação microbiológica

Os produtos após elaborados, de acordo com os tratamentos foram mantidos em temperatura de refrigeração (< 4 °C) por até 15 dias. De cada um dos produtos foi retirada uma amostra de 25 g em três tempos (1, 7 e 15 dias) a qual foi submetida às análises microbiológicas citadas a seguir:

2.4.1.1.1 Enumeração de *Staphylococcus coagulase positiva*

Para avaliar o efeito inibitório do óleo essencial de tomilho, foi realizada enumeração de *Staphylococcus coagulase positiva*. Para isto, foram retiradas 25 g de cada uma das formulações dos produtos cárneos e foram homogeneizados com 225 mL de água peptonada estéril. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas até 1:10000 (10^{-4}) com água peptonada estéril. Após a diluição foram retirados 0,1 mL da solução e transferidas para placas de Petri contendo ágar Baird-Parker, espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski e incubadas por até 48 h a 37 °C. A contagem manual das colônias

bacterianas foi realizada após 48 h de incubação e os resultados expressos em UFC.g⁻¹.

2.4.1.1.2 Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas

Para avaliar, também, o efeito inibitório do óleo essencial de tomilho, foi realizada enumeração de bactérias aeróbias mesófilas pelo método de semeadura em superfície. Para isto, foram retiradas 25 g de cada uma das formulações dos produtos cárneos e foram homogeneizados com 225 mL de água peptonada estéril. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas até 1:10000 (10^{-4}) com água peptonada estéril. Após a diluição foram retirados 0,1 mL da solução e transferidas para placas de Petri contendo ágar Plate Count Agar (PCA), espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski e incubadas por até 48 h a 37 °C. A contagem manual das colônias bacterianas foi realizada após 48 h de incubação e os resultados expressos em UFC.g⁻¹.

2.4.1.1.3 Enumeração de coliformes termotolerantes

Foi realizada enumeração de coliformes termotolerantes. Para isto, foram retiradas 25 g de cada uma das formulações dos produtos cárneos e foram homogeneizados com 225 mL de água peptonada estéril. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas até 1:1000 (10^{-3}) com água peptonada estéril. Após a diluição foram retirados 1 mL da solução e transferidas para 3 tubos contendo o caldo Lauril Sulfato Tryptose (LST) e incubados por até 48 h a 37 °C. Decorrido o tempo de incubação, separou-se os tubos positivos na prova presuntiva, ou seja, que apresentaram gás no interior dos tubos de Duhran e após passou-se para a etapa de confirmação dos coliformes termotolerantes.

Para a etapa da pesquisa de coliformes termotolerantes, transferiu-se uma alçada de cada tubo positivo de caldo LST para outro tubo contendo o caldo EC e incubado por até 24 h a 45 °C em banho-maria. Decorrido o tempo de incubação, selecionou-se os tubos positivos (presença de gás no interior do tubo de Duhran), utilizou-se a tabela do NMP para expressar os resultados das contagens de coliformes termotolerantes em Número Mais Provável por grama de alimento.

Dos tubos positivos do caldo EC, foram retirados 0,1 mL da solução e transferiu-se para placas de Petri contendo ágar EMB, espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski e incubados por até 24 h a 37 °C, para a confirmação da presença de *Escherichia coli* nas amostras.

2.4.1.2 Avaliação sensorial

Para avaliação sensorial os embutidos foram submetidos à cocção na temperatura de 180 °C por aproximadamente 1 h, em forno convencional. Foi analisada a aceitação das amostras por meio da avaliação dos atributos aparência, cor, odor, textura, sabor e impressão global. A análise foi executada em cabines individualizadas, com a participação de 50 julgadores não treinados, de ambos os sexos, pertencentes à comunidade acadêmica da Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão.

Cada julgador recebeu um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A) e uma ficha de avaliação (Apêndice B), juntamente das amostras apresentadas em recipientes descartáveis, de cor branca, codificados com três números aleatórios. Foi solicitado aos julgadores que expressassem sua intenção de compra do produto, através da escala hedônica de 5 pontos, tendo por extremos as expressões “certamente não compraria” (1) e “certamente compraria” (5). Ainda foi empregada um teste de aceitação com escala hedônica de 9 pontos, em que o valor 1 corresponde a descrição “desgostei muitíssimo” e o valor 9 a “gostei muitíssimo” (GULARTE, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem.

2.5 Análise estatística

Foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Fisher de Mínima Diferença Significativa (LSD test) para verificar se existiam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações utilizadas em relação à inibição microbiana, e o teste de Tukey ($p < 0,05$) para avaliar as diferenças em relação aos atributos sensoriais pesquisados, utilizando o programa Statistix 10.

3 Resultados e discussão

3.1 Caracterização do óleo essencial de tomilho

3.1.1 Composição química do óleo essencial de tomilho

Na Figura 1 é possível visualizar a composição química do óleo essencial de tomilho, determinada por CG/MS. Por meio deste estudo, detectou-se a presença de 12 compostos, sendo o carvacrol o majoritário com 54,47% (Tabela 2).

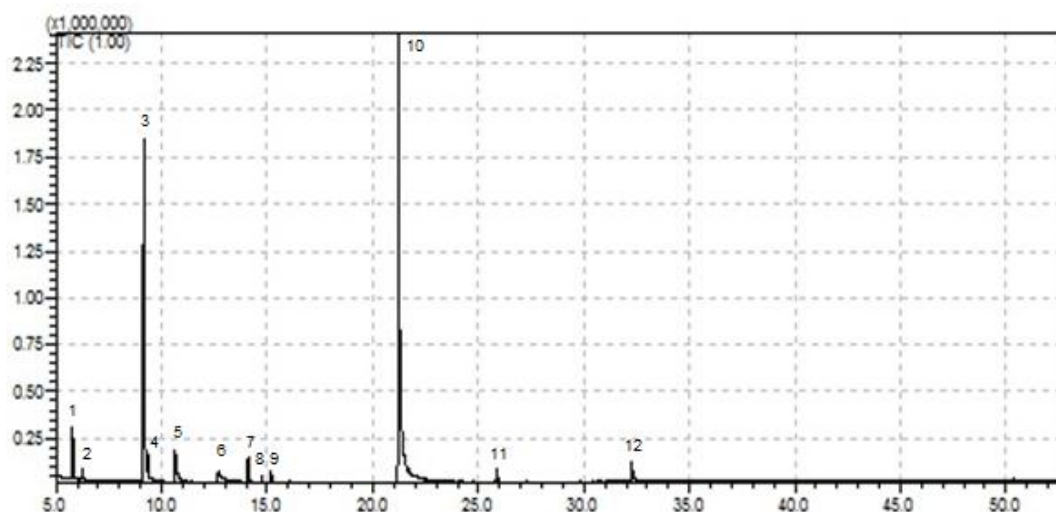


Figura 1. Cromatografia do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)

Tabela 2. Composição química do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)

Pico	Compostos	Tempo de retenção (min)	Área do pico (%)
1	1R-a-pineno	5.777	2.86
2	p-Menth-8-en-2-ol, acetato	6.223	0.69
3	o-Cymol	9.137	26.93
4	beta-pineno,3- (acetilmetil) -	9.356	1.29
5	4-Carene	10.638	3.99
6	beta-linalol	12.685	2.81
7	Cânfora	14.083	2.34
8	1,4-Pentadieno, 2,3,3-trimetil-	14.736	0.41
9	Isoborneol	15.174	0.81
10	Carvacrol	21.226	54.47
11	Bicyclo [7.2.0] undec-4- eno, 4,11,11-trimetil-8- metileno -, [1R-	25.874	1.05
12	Epóxido de cis-Z- α - bisaboleno	32.268	2.36

Alguns estudos indicaram o carvacrol como o componente majoritário na composição do óleo essencial de tomilho (EL-NEKEETY et al., 2011; LIMA, 2018). Em outro estudo, os compostos carvacrol, o-cimeno e timol identificados no óleo essencial de *Thymus vulgaris*, apresentaram-se em maior quantidade e com valores próximos (23,93%, 22,57% e 20,23%, respectivamente). No entanto, pode-se considerar o componente carvacrol como o majoritário do óleo testado, uma vez que se apresentou em maior percentual frente aos outros compostos (VIEIRA, 2017). Entretanto, os valores foram inferiores aos encontrados no presente estudo, reforçando a interferência de fatores externos, como ambiente de crescimento da planta, época e técnica de extração do óleo na composição dos seus constituintes (PORTE; GODOY, 2008).

Os teores encontrados nesta análise divergem dos resultados obtidos por autores como Al-Shuneigat et al. (2014), Nikolić et al. (2014) e Nemati et al. (2017), os quais obtiveram o timol como componente majoritário de *Thymus vulgaris* cultivado na Jordânia (37,05%), Sérvia (49,10%) e no Irã (40,03%). O carvacrol demonstrou-se como segundo componente mais presente nas análises de Nikolić et al. (2014) e Nemati et al. (2017), resultando em 14% e 18,31%, enquanto que no estudo de Al-Shuneigat et al. (2014) resultou em apenas 8,45% da composição deste óleo essencial. Mancini et al. (2015) analisaram a composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de cinco amostras diferentes de *Thymus vulgaris* de áreas distintas do Sul da Itália. Neste estudo, os óleos foram obtidos por hidrodestilação das partes aéreas e o composto predominante em todas as amostras analisadas foi o timol (46,2 – 67,5%), seguido pelo carvacrol (5,7 – 7,3%).

Os óleos essenciais são derivados do metabolismo secundário das plantas, e podem ser retirados das diferentes partes desta. Alguns estudos realizados demonstraram que a forma como o óleo essencial é extraído, a época do ano em que a planta é colhida e as condições do clima fazem com que haja diferenças significativas na composição final dos óleos, podendo variar entre as concentrações dos componentes e alterar entre os compostos majoritários encontrados (HUDAIB, et al., 2002). Também deve ser observado de que parte da planta o óleo essencial foi extraído, sendo que, cada parte como flores, folhas, caules ou raízes possuem diferenças de concentrações entre os componentes. Devido a isso, muitos resultados diferentes podem ser encontrados ao estudar o óleo essencial da mesma planta.

3.1.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho

3.1.2.1 Disco difusão, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Por meio da técnica de disco difusão verificou-se que o óleo essencial de tomilho apresentou ação antimicrobiana contra duas bactérias. A CIM que proporcionou a inibição de crescimento de *S. aureus* e *E. coli*, foi de 9,17 mg.mL⁻¹ para as duas bactérias e quanto a CBM, foi de 9,17 e 36,68 mg.mL⁻¹ para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho por meio das técnicas de disco difusão, CIM e CBM

Bactérias	Disco difusão (mm)	CIM (mg.mL ⁻¹)	CBM (mg.mL ⁻¹)
<i>S. aureus</i>	36,5 ± 1,32	9,17	9,17
<i>E. coli</i>	57,8 ± 4,07	9,17	36,68

Segundo Rota et al. (2008), a ação inibitória avaliado por disco difusão pode ser classificada como tendo uma forte atividade antibacteriana (quando a zona de inibição for igual ou superior a 20 mm), atividade moderada (quando a zona de inibição for entre 12 – 20 mm) e nenhuma atividade inibitória (quando a zona de inibição for menor que 12 mm). Seguindo esse critério o óleo essencial de tomilho frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli* teve uma forte ação inibitória.

Entretanto, estudos divergentes foram encontrados na literatura consultada, no estudo de Millezi et al. (2012) o óleo de tomilho não demonstrou atividade antimicrobiana sobre *Escherichia coli*, ao passo que para Rota et. al. (2008) o resultado foi similar ao do presente estudo, uma vez que encontraram atividade antimicrobiana deste óleo essencial contra as bactérias *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. entérica* Enteritidis e *S. aureus*.

O efeito sobre *E. coli* verificado neste estudo pode ter relação com as afirmações de Sharififar et al. (2007), os quais afirmaram que os componentes presentes em óleo essencial de tomilho, como timol e carvacrol, apresentam maior bioatividade sobre bactérias Gram negativas, devido à maior afinidade destas pela estrutura lipídica da membrana que as envolve. Timol e carvacrol atuam induzindo deformações na membrana citoplasmática alterando sua permeabilidade (LAMBERT; SKANDAMIS; COOTE, 2001; ULTEE; BENNINK; MOEZELAAR, 2002).

A CMI e CBM do óleo essencial de tomilho contra *S. aureus* foi de 9,17 mg.mL⁻¹ e 9,17 mg.mL⁻¹, respectivamente, já para contra *E. coli* foi de 9,17 mg.mL⁻¹ e 36,68 mg.mL⁻¹, respectivamente. Dal Pozzo et al. (2011) analisaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. Os autores analisaram as CIM para diversos óleos

essenciais, tais como os de orégano e tomilho, bem como suas frações majoritárias, carvacrol e timol. O resultado para CIM e CBM foi $1,47 \text{ mg.mL}^{-1}$ para óleo essencial de tomilho, valores um pouco inferiores aos resultado deste estudo. Rota et al. (2008) verificaram que o óleo essencial de *Thymus vulgaris* apresentou ação antimicrobiana contra *E. coli*, com CMI e CBM de $0,0005 \text{ mg.mL}^{-1}$, e contra *S. aureus* com CIM e CBM de $<0,0002 \text{ mg.mL}^{-1}$, o que também foi inferior ao resultado do presente estudo. No entanto, deve-se levar em consideração a constituição química dos óleos essenciais, pois apresentam porcentagens diferentes de seus isolados, inclusive dentro da mesma espécie. Esta pode ser uma provável explicação para as maiores concentrações de CBM e CIM encontradas neste estudo. Convém também lembrar que princípio ativo está relacionado aos compostos fenólicos presentes em composição do óleo essencial e que estes podem variar significativamente em função de fatores ambientais a que os vegetais são submetidos durante o seu cultivo (BEHBAHANI et al., 2013).

3.1.2.2 Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera

Os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho em micro-atmosfera estão apresentados na Figura 2.

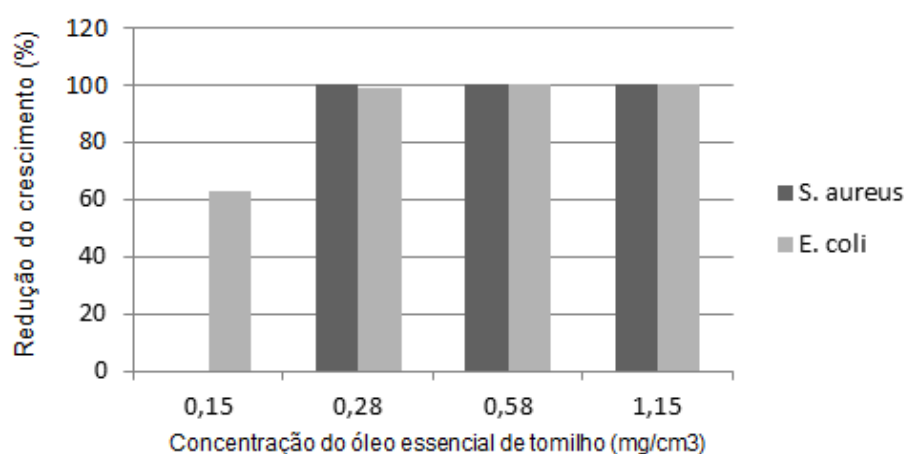


Figura 2. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho em micro-atmosfera, sobre o crescimento de bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

A aplicação de óleo essencial de tomilho nas concentrações de 0,15, 0,28, 0,58 e $1,15 \text{ mg/cm}^3$ em micro-atmosfera, reduziu a contagem de células

viáveis de *E. coli* em 62,5, 99,09, 100 e 100%, respectivamente. Já *S. aureus* apresentou reduções de 100% em 0,28, 0,58 e 1,15 mg/cm³, não apresentando redução significativa para a menor concentração testada (0,15 mg/cm³).

Alguns estudos ainda demonstraram que o óleo essencial de tomilho está entre os antimicrobianos voláteis mais ativos (DIMITRIJEVIĆ et al., 2007), segundo Moreira et al. (2005), isso relaciona-se também ao seu caráter lipofílico, que liga a bicamada fosfolipídica da membrana celular aumentando sua permeabilidade e disseminando o conteúdo intracelular ou prejudicando o sistema enzimático da célula, uma vez que, pequenas alterações que ocorram na estrutura da membrana citoplasmática podem afetar o metabolismo.

Não foram encontrados na literatura trabalhos específicos do óleo essencial de tomilho avaliado em micro-atmosfera. Em estudos recentes, a atividade antimicrobiana de outros óleos essenciais foram avaliadas também em micro-atmosfera, verificando sua ação por volatilização (GOÑI et al., 2009; CLEMENTE et al., 2016; GHABRAIE et al., 2016; DANNENBERG et al., 2017). A análise em micro-atmosfera vem apresentando bons resultados em diferentes trabalhos. As inibições verificadas em fase de vapor (micro-atmosfera) para os óleos essenciais de cravo e canela foram maiores que as verificadas por contato direto (ágar) contra *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *S. choleraesuis*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis* e *S. aureus* (GOÑI et al., 2009). Foram verificadas reduções de 100% do crescimento bacteriano de *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* e *Pectobacterium carotovorum* pelo efeito antimicrobiano de óleo essencial de canela e mostarda, em fase de vapor (CLEMENTE et al., 2016).

Em micro-atmosfera, os componentes antimicrobianos dos óleos essenciais volatilizam formando uma fase de vapor, a qual atinge as células bacterianas diretamente sem necessidade de difusão no meio em que a bactéria se encontra (ágar). Nos ensaios em meio sólido e líquido (ágar e caldo), existe a interferência da capacidade de difusão/dispersão dos componentes do óleo essencial no meio, que não é favorável para óleo essencial, uma vez que são constituídos por substâncias apolares enquanto os meios usuais (ágares e caldos) são formados por base aquosa (GHABRAIE et al., 2016).

3.2 Avaliação do suco de beterraba nas formas líquida e em pó

Estão apresentados nas Tabelas 4 e 5 os resultados obtidos nas avaliações físico-químicas do suco integral de beterraba.

Tabela 4. Dados das análises físico-químicas do suco integral de beterraba e do suco de beterraba em pó

	Umidade (%)	Açúcares Redutores	Açúcares Totais	Açúc. Não Redutores	Sólidos Solúveis (° Brix)	pH
Suco integral	89,46 ± 0,03	-	-	-	10,6	6,62 ± 0,18
Suco em pó	6,03 ± 1,23	6,11 ± 0,14	30,34 ± 2,62	23,02	-	6,52 ± 0,01

O resultado obtido na determinação de umidade para o suco de beterraba mostrou expressivo conteúdo de água (89,46%), como já era de se esperar, entretanto, este valor foi um pouco inferior ao reportado por Santos et al. (2015) para suco de beterraba (93,97%), também ao de Ferreira (2018) para extrato de beterraba (93,013%) e ao de Lima et al. (2017) que encontrou no suco de beterraba (93,98%) de umidade.

Segundo Santos et al. (2004), a concentração dos sólidos solúveis totais no suco de beterraba altera-se de acordo com os fatores climáticos, variedade, maturação do fruto, solo e da adição de água durante o processamento. Encontrou-se para o suco extraído o teor de sólidos solúveis de 10,60 °Brix. Valor dentro da faixa encontrada por Kluge et al. (2006) em beterraba minimamente processada, da mesma cultivar, entre cerca de 4 e 12 °Brix, conforme o tipo de corte (fatia, cubo e retalho). Os autores justificam as diferenças devido a diluição dos sólidos durante a sanitização e enxague, especialmente com o aumento da área de contato em função do tipo de corte. Porém, o valor encontrado neste estudo foi bastante superior ao mencionado por Santos et al. (2015) em suco de beterraba (5 °Brix) e ao descrito por Lima et al. (2017) para esta raiz tuberosa (4 °Brix).

Em relação à análise de pH (6,62), o valor foi próximo ao de Santos et al. (2015) para suco de beterraba (6,10), também ao de Lima et al. (2017) para o suco de beterraba (6,33) e um pouco superior ao reportado por Ferreira

(2018) para o extrato de beterraba (5,92). A constância do pH é de extrema importância para estabilidade das betalaínas, visto que a manutenção de suas características depende da faixa de pH (excelente estabilidade entre pH 4 e 5 na ausência de oxigênio, e entre pH 5 e 6 em presença de oxigênio) (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009; SCHIOZER; BARATA, 2013).

O resultado obtido na determinação de umidade para o suco de beterraba em pó foi de 6,03%, este valor foi inferior ao reportado por Costa, Medeiros e Mata (2003) que obtiveram um teor de umidade de 13% para pó de beterraba obtido pelo processo de leito de fluidizado e dentro da faixa encontrada por Ferreira (2010), em que os valores encontrados para farinha de beterraba variaram de 4,25 a 8,78%.

A diminuição do teor de umidade, e consequente aumento no teor de matéria seca, é um fator positivo, pois está diretamente ligada à vida útil do produto, uma vez que os micro-organismos necessitam de água para seu metabolismo e multiplicação (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O valor encontrado para os açúcares redutores no suco de beterraba liofilizado (6,11%) foi próximo ao de Alexandre et al. (2014) para pitanga em pó (6,45%) e Lisboa, Figueirêdo e Queiroz (2012) que verificaram uma redução nos teores de açúcares redutores do figo-da-india em pó seco, e o valor ainda foi inferior aos reportados por Oliveira, Junqueira e Mascarenhas (2011) e Almeida et al. (2009) para as polpas do fruto da palma (figo da índia) e mandacaru de 7,28 e 10,40%, respectivamente, e foi superior ao encontrado por Silva e Alves (2009) também estudando as características físico-químicas do mandacaru, obtiveram um teor de açúcares redutores de 5,76%. O teor de açúcares totais (30,34%), foi superior aos valores encontrados por Alexandre et al. (2014) para pitanga em pó (3,5%) e Wichienchot, Jatupornpipat e Rastall (2010) para duas variedades de pitaya, a de polpa vermelha e a de polpa branca, com 6,49 e 6,77 g.100g⁻¹, respectivamente. O conteúdo de açúcares não redutores (23,02%) apresentou resultado próximo ao de Alexandre et al. (2014) para pitanga em pó (21,60%) e valor superior ao encontrado por Bahia et al. (2010) para o mandacaru (2,94%). Evidenciando a característica da beterraba de ser um vegetal com expressivo teor de açúcares.

Em relação a análise de pH (6,52), o valor foi encontrado dentro da faixa encontrada por Ferreira (2010), sendo esta compreendida entre 3,5 a 7 para

farinha de beterraba. Assim, a estabilidade dos pigmentos pode ser justificada pelos valores desejáveis do pH, bem como pela redução da atividade de água (HERBACH; STINTZING; CARLE, 2006).

A liofilização tem a vantagem de manter os produtos com estrutura/característica inalterada, fáceis de transformar em pó e dissolver, fáceis de reidratar, além de mantêm propriedades nutritivas do alimento. Isso é possível porque a liofilização não rompe as membranas das células de proteínas e vitaminas, a sua maior desvantagem é o custo, pois equivale a 3 vezes mais que outra técnica de secagem (FELLOWS, 2006).

Tabela 5. Dados da determinação física de cor do suco integral de beterraba e suco de beterraba em pó

Cor	a*	b*	L*
Suco integral	0,49 ± 0,19	0,28 ± 0,15	22,48 ± 1,33
Suco em pó	11,77 ± 2,09	3,76 ± 0,59	18,65 ± 1,25

Como pode ser observado na Tabela 5, os parâmetros de cor, tanto para o suco integral de beterraba e suco de beterraba em pó, revelaram uma luminosidade tendendo ao escuro, já que este parâmetro varia de 100 (branco) a 0 (preto), sendo no suco em pó esta tendência mais acentuada, possivelmente pela concentração da matéria seca. Os valores de cromaticidade a* e b* foram positivos, próximos de 0. Considerando que a coordenada a* expressa o grau de variação entre o vermelho (+60) e o verde (-60) e a coordenada b* expressa o grau de variação entre o azul (-60) e o amarelo (+60), pode-se inferir que há tendência ao vermelho e amarelo, entretanto, com mistura de cores. Os resultados observados para os parâmetros de cor mostraram um comportamento esperado para betacianinas. A redução da umidade favoreceu a concentração dos pigmentos intensificando os parâmetros de cor (a e b) na amostra em pó.

Além de muito instável na presença de luz e oxigênio, as betalaínas podem ser facilmente lixiviadas em água, pois são altamente hidrossolúveis. Os processos de sanitização favorecem a perda desses pigmentos, que são facilmente perdidos quando em contato com meios aquosos (VITTI, 2003b).

3.3 Avaliação da adição de óleo essencial de tomilho e do suco de beterraba em pó em embutido cárneo

3.3.1 Avaliação microbiológica

Os resultados encontrados para avaliação da adição de óleo essencial de tomilho em diferentes concentrações e de suco de beterraba em pó em embutido cárneo, como alimento teste em 3 tempos distintos (1, 7 e 15 dias) encontram-se descritos nas tabelas a seguir (6 a 8).

Tabela 6. Enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva em embutido cárneo adicionado de óleo essencial de tomilho em 3 concentrações diferentes e suco de beterraba em pó, em 3 tempos distintos.

¹ ECP	1 dia	7 dias	15 dias
² Controle (UFC/g)	$8,2 \times 10^3$	9×10^5	$5,03 \times 10^5$
³ Tratamento 1 (UFC/g)	$3,1 \times 10^3$	$2,66 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$
⁴ Tratamento 2 (UFC/g)	$1,46 \times 10^3$	$2,8 \times 10^4$	$3,43 \times 10^4$
⁵ Tratamento 3 (UFC/g)	$2,63 \times 10^3$	$1,18 \times 10^4$	$2,41 \times 10^4$
⁶ Tratamento 4 (UFC/g)	$2,93 \times 10^3$	$1,63 \times 10^4$	$2,31 \times 10^4$
⁷ Tratamento 5 (UFC/g)	$3,16 \times 10^3$	$1,05 \times 10^4$	$1,02 \times 10^4$
⁸ Tratamento 6 (UFC/g)	$1,76 \times 10^3$	$1,29 \times 10^4$	$1,15 \times 10^4$
⁹ Tratamento 7 (UFC/g)	$2,33 \times 10^3$	$1,51 \times 10^4$	$1,27 \times 10^4$

¹ *Staphylococcus* coagulase positiva

² Controle - Formulação padrão do produto cárneo

³ Tratamento 1 - Formulação padrão do produto cárneo, com 100% do conservante sal de cura

⁴ Tratamento 2 - Formulação padrão do produto cárneo, 50% de conservante sal de cura, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,00095% e 1% de suco de beterraba em pó

⁵ Tratamento 3 - Formulação padrão do produto cárneo, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,00095% e 1% de suco de beterraba em pó

⁶ Tratamento 4 - Formulação padrão do produto cárneo, 50% de conservante sal de cura, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,0095% e 1% de suco de beterraba em pó

⁷ Tratamento 5 - Formulação padrão do produto cárneo, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,0095% e 1% de suco de beterraba em pó

⁸ Tratamento 6 - Formulação padrão do produto cárneo, 50% de conservante sal de cura, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,95% e 1% de suco de beterraba em pó

⁹ Tratamento 7 - Formulação padrão do produto cárneo, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,95% e 1% de suco de beterraba em pó

Primeiramente, foi realizada uma análise para verificar a influência das variáveis conservante e óleo essencial de tomilho nas amostras, nos três tempos propostos.

Na contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (ECP) com concentração de óleo essencial de tomilho de 0,0095% (Tabela 6), verificou-se que as contagens do tempo 1 se diferenciaram significativamente ($p < 0,05$) das contagens do tempo 3, e as contagens do tempo 2 não apresentaram diferenças significativas em relação aos demais tempos. Em relação à presença de conservante verificou-se que a contagem de ECP das amostras com a dose especificada de conservante (100%) se diferenciaram significativamente ($p < 0,05$) das amostras controle e das amostras sem conservante e com óleo essencial. E a contagem das amostras com metade do conservante e com óleo essencial não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) nem das amostras com conservante nem das amostras sem conservante e com óleo essencial. Em relação às amostras somente com óleo verificou-se que foram encontradas contagens inferiores ($p < 0,05$) em relação a amostra controle nos tempos 2 e 3.

Nas amostras com conservante e óleo essencial de tomilho na concentração de 0,0095% (Tabela 6), verificou-se que as contagens do tempo 1 se diferenciaram significativamente ($p < 0,05$) do tempo 3 e as contagens no tempo 2 novamente não se diferenciaram significativamente ($p > 0,05$) nem do tempo 1 nem do tempo 3. Em relação à presença de conservante verificou-se que as amostras com conservante se diferenciaram significativamente ($p < 0,05$) das amostras controle e das sem conservante e com óleo essencial. E as amostras com metade do conservante e com óleo essencial não se diferenciaram significativamente ($p > 0,05$) nem das amostras com conservante nem das amostras sem conservante e com óleo essencial. Em relação as amostras somente com óleo essencial, verificou-se novamente nos tempos 2 e

3, aquelas contendo com óleo essencial apresentaram menores contagens que as amostras controle.

Nas amostras com óleo essencial de tomilho na concentração de 0,95% (Tabela 6), verificou-se resultados similares aos anteriores, as contagens do tempo 1 se diferenciaram significativamente ($p < 0,05$) do tempo 3 e as contagens no tempo 2 não se diferenciaram significativamente ($p > 0,05$) nem do tempo 1 nem do tempo 3. Em relação à presença de conservante verificou-se que as contagens nas amostras com conservante se diferenciaram significativamente ($p < 0,05$) das amostras controle e sem conservante com óleo essencial. E as amostras com metade do conservante e óleo essencial não se diferenciaram significativamente ($p > 0,05$) das amostras com conservante. Neste caso novamente a associação de metade do conservante com óleo essencial apresentou efeito similar a concentração recomendada de conservante.

Tabela 7. Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas em embutido cárneo adicionado de óleo essencial de tomilho em 3 concentrações diferentes e suco de beterraba em pó, em 3 tempos distintos.

¹ BAM	1 dia	7 dias	15 dias
² Controle (UFC/g)	$4,36 \times 10^6$	$1,93 \times 10^7$	$2,79 \times 10^7$
³ Tratamento 1 (UFC/g)	$1,11 \times 10^6$	8×10^6	$1,45 \times 10^6$
⁴ Tratamento 2 (UFC/g)	$6,3 \times 10^5$	$7,2 \times 10^6$	$4,84 \times 10^7$
⁵ Tratamento 3 (UFC/g)	$2,73 \times 10^6$	$2,41 \times 10^7$	$4,08 \times 10^7$
⁶ Tratamento 4 (UFC/g)	$8,53 \times 10^4$	$1,72 \times 10^6$	$7,93 \times 10^6$
⁷ Tratamento 5 (UFC/g)	$3,8 \times 10^5$	$5,13 \times 10^6$	$3,25 \times 10^7$
⁸ Tratamento 6 (UFC/g)	$3,4 \times 10^4$	$4,53 \times 10^6$	$1,07 \times 10^6$
⁹ Tratamento 7	$2,12 \times 10^4$	$9,43 \times 10^6$	$2,48 \times 10^6$

(UFC/g)

¹ Bactérias aeróbias mesófilas

² Controle - Formulação padrão do produto cárneo

³ Tratamento 1 - Formulação padrão do produto cárneo, com 100% do conservante sal de cura

⁴ Tratamento 2 - Formulação padrão do produto cárneo, 50% de conservante sal de cura, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,00095% e 1% de suco de beterraba em pó

⁵ Tratamento 3 - Formulação padrão do produto cárneo, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,00095% e 1% de suco de beterraba em pó

⁶ Tratamento 4 - Formulação padrão do produto cárneo, 50% de conservante sal de cura, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,0095% e 1% de suco de beterraba em pó

⁷ Tratamento 5 - Formulação padrão do produto cárneo, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,0095% e 1% de suco de beterraba em pó

⁸ Tratamento 6 - Formulação padrão do produto cárneo, 50% de conservante sal de cura, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,95% e 1% de suco de beterraba em pó

⁹ Tratamento 7 - Formulação padrão do produto cárneo, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,95% e 1% de suco de beterraba em pó

Na enumeração de bactérias aeróbias mesófilas com concentração de óleo essencial de tomilho de 0,00095% (Tabela 7), verificou-se que houve diferença significativa nas contagens do tempo 1 em relação ao tempo 3, e novamente o tempo 2 as contagens não se diferenciaram significativamente ($p > 0,05$) nem do tempo 1 nem do tempo 3. Em relação à presença de conservante verificou-se que as contagens de bactérias aeróbias mesófilas das amostras com conservante se diferenciaram significativamente ($p < 0,05$) das amostras controle e sem conservante e com óleo essencial. E as contagens das amostras com metade do conservante e com óleo essencial não se diferenciaram significativamente ($p > 0,05$) nem das amostras com conservante nem das amostras sem conservante com óleo essencial.

Nas amostras com concentração de óleo essencial de tomilho de 0,0095% (Tabela 7), verificou-se que as contagens do tempo 1 se diferenciaram significativamente ($p < 0,05$) do tempo 3 e as do tempo 2 não se diferenciaram significativamente ($p > 0,05$) nem do tempo 1 nem do tempo 3. Em relação à presença de conservante, verificou-se que as contagens da amostra controle e sem conservante se diferenciaram significativamente ($p < 0,05$) das amostras com conservante e com metade do conservante e óleo essencial, porém as amostras com conservante e com metade do conservante e óleo essencial não apresentaram diferenças significativas entre elas,

explicitando que neste caso a associação de metade do conservante com o óleo essencial tiveram o mesmo efeito que a dose recomendada de conservante, reduzindo o crescimento de bactérias aeróbias mesófilas.

Nas amostras com concentração de óleo essencial de tomilho de 0,95% (Tabela 7), verificou-se que as contagens do tempo 1 se diferenciaram significativamente ($p < 0,05$) do tempo 2 e as contagens no tempo 3 não se diferenciaram significativamente ($p > 0,05$) nem do tempo 1 nem do tempo 2. Em relação à presença de conservante, as contagens das amostras sem conservante, com conservante e metade conservante e óleo essencial não se diferenciaram significativamente ($p > 0,05$) entre elas.

Tabela 8. Enumeração de coliformes termotolerantes em embutido cárneo adicionado de óleo essencial de tomilho em 3 concentrações diferentes e suco de beterraba em pó, em 3 tempos distintos.

¹ CT	1 dia	7 dias	15 dias
² Controle (UFC/g)	< 0,3	< 0,3	< 0,3
³ Tratamento 1 (UFC/g)	1,5	< 0,3	< 0,3
⁴ Tratamento 2 (UFC/g)	< 0,3	< 0,3	< 0,3
⁵ Tratamento 3 (UFC/g)	< 0,3	< 0,3	< 0,3
⁶ Tratamento 4 (UFC/g)	< 0,3	< 0,3	< 0,3
⁷ Tratamento 5 (UFC/g)	< 0,3	< 0,3	< 0,3
⁸ Tratamento 6 (UFC/g)	< 0,3	< 0,3	< 0,3
⁹ Tratamento 7 (UFC/g)	0,9	< 0,3	< 0,3

¹ Coliformes Termotolerantes

² Controle - Formulação padrão do produto cárneo

³ Tratamento 1 - Formulação padrão do produto cárneo, com 100% do conservante sal de cura

⁴ Tratamento 2 - Formulação padrão do produto cárneo, 50% de conservante sal de cura, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,00095% e 1% de suco de beterraba em pó

⁵ Tratamento 3 - Formulação padrão do produto cárneo, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,00095% e 1% de suco de beterraba em pó

⁶ Tratamento 4 - Formulação padrão do produto cárneo, 50% de conservante sal de cura, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,0095% e 1% de suco de beterraba em pó

⁷ Tratamento 5 - Formulação padrão do produto cárneo, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,0095% e 1% de suco de beterraba em pó

⁸ Tratamento 6 - Formulação padrão do produto cárneo, 50% de conservante sal de cura, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,95% e 1% de suco de beterraba em pó

⁹ Tratamento 7 - Formulação padrão do produto cárneo, óleo essencial de tomilho na concentração de 0,95% e 1% de suco de beterraba em pó

Na contagem de coliformes termotolerantes com óleo essencial de tomilho na concentração de 0,00095% (Tabela 8), verificou-se que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao tempo, nem em relação presença de conservante ou do óleo essencial. Isto se deve ao fato da amostra praticamente não apresentar bactérias do grupo coliformes o que inviabilizou uma avaliação mais eficiente dos efeitos do conservante e do óleo essencial.

Na contagem de coliformes termotolerantes das amostras com óleo essencial de tomilho na concentração de 0,0095% (Tabela 8), verificou-se novamente que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao tempo, conservante ou presença do óleo. Novamente a provável explicação para isto se deve ao fato da amostra praticamente não apresentar bactérias do grupo coliformes o que inviabilizou uma avaliação mais eficiente dos efeitos do conservante e do óleo essencial nos três tempos propostos.

Nas amostras com óleo essencial de tomilho na concentração de 0,95% (Tabela 8), verificou-se o mesmo que nos casos anteriores, não houveram diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao tempo, conservante e óleo essencial.

Quando avaliada a atividade antimicrobiana *in situ* dos produtos cárneos, foi observado que o óleo essencial na concentração de 0,00095, 0,0095 e 0,95% promoveram efeito microbiológico contra *Staphylococcus* coagulase positiva quando comparados as amostras controle, destacando o efeito combinado de metade da concentração recomendada do conservante associada ao óleo essencial, que promoveram efeitos similares a concentração recomendada de conservante.

Em relação a contagem de bactérias aeróbias mesófilas, observou-se que o óleo essencial na concentração de 0,00095% foi efetivo somente com adição da metade do conservante (nitrato e nitrito de sódio) até 7 dias de armazenamento. Já na concentração de 0,0095% do óleo essencial, observou-se que com adição da metade do conservante, houve efeito efetivo no controle microbiológico, e o produto cárneo sem adição de conservante ficou estabilizado até 7 dias de armazenamento. E na concentração de 0,95% do óleo essencial, observou-se que houve um controle microbiológico contra as bactérias aeróbias mesófilas, mais efetiva que o conservante.

Em ambos os casos de ECP e de mesófilos aeróbios ficou clara a viabilidade de utilização do óleo essencial com metade da concentração recomendada de conservante. Este resultado tem grande importância em razão dos nitritos poderem formar nitrosaminas em determinadas situações, que podem apresentar potencial cancerígeno, assim a substituição parcial deste por óleo essencial de tomilho se torna uma alternativa viável e desejável. Porém, sabe-se que os nitritos, além da atuação como antimicrobianos, também atuam gerando características sensoriais típicas de produtos cárneos como cor e sabor, sendo a sua substituição total pelo óleo possível, desde que se encontrem também alternativas para suprir as características sensoriais esperadas nestes produtos, neste caso, o suco de beterraba em pó pode representar uma alternativa para atuar como um corante natural.

Em relação a coliformes esperava-se uma ação mais efetiva do óleo essencial do que em relação a ECP, considerando os relatos do efeito deste óleo essencial contra bactérias Gram negativas, por exemplo Ivanovic et al. (2012) relataram significativa atividade antibacteriana de extrato de tomilho e óleo essencial de tomilho contra bactérias Gram negativas (*E. coli* e *Salmonella*). Silva et al. (2013) também relataram atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Thymus vulgaris* contra *E. coli* além de outras bactérias de origem alimentar. Porém, devido a baixa concentração de coliformes nas amostras ficou difícil de avaliar este efeito, sendo sugerido que em estudos posteriores se façam ensaios com matérias-primas com concentrações maiores de coliformes ou intencionalmente contaminadas.

Em alguns casos, é necessária a aplicação de altas concentrações do óleo no alimento para atingir o efeito antimicrobiano desejado (SMITH et al.,

2005), visto que, em alguns estudos tem-se registrado baixos efeitos antimicrobianos nos alimentos se comparado aos resultados obtidos nos testes *in vitro* (SHARAFATI-CHALESHTORI et al., 2015). Isso ocorre porque muitos componentes presentes nos alimentos, tais como lipídeos, proteínas, carboidratos e água, reduzem a eficiência dos óleos essenciais (WEISS et al., 2015).

Neste estudo a concentração de óleo essencial *in situ* poderia ainda ter sido aumentada buscando efeitos mais efetivos, porém haveria interferência nas características sensoriais. Alguns estudos apresentaram resultados efetivos utilizando concentrações maiores, porém não descreveram a interferência sensorial destas concentrações. Santurio (2015) observaram que a adição do óleo de tomilho em linguiça toscana apresentou atividade antimicrobiana somente a partir da aplicação de 1600, 3200 e 8000 ug/mL, apresentando um decréscimo na contagem de coliformes totais até 15º dia de armazenamento. E Giatrakou, Ntzimani e Savvaidis (2010), que, avaliando a adição de óleo essencial de tomilho (0,2%) em um produto à base de carne de frango fresca, reportaram um aumento de dois dias na vida de prateleira do produto, determinada microbiologicamente através da contagem total de micro-organismos mesófilos.

3.3.2 Avaliação sensorial

As diferentes formulações do embutido cárneo com adição de óleo essencial de tomilho e suco de beterraba em pó foram avaliadas sensorialmente quanto a aceitação, utilizando escala hedônica e teste de intenção de compra, os resultados podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9. Aceitação sensorial do embutido cárneo com adição do óleo essencial de tomilho e suco de beterraba em pó

	F1	F2	F3	F4
Aparência	6,5 ± 1,7 b	7,3 ± 1,6 a	7,1 ± 1,5 ab	7,3 ± 1,5 a
Cor	6,4 ± 1,7 b	7,2 ± 1,5 a	7,0 ± 1,7 ab	7,4 ± 1,4 a
Odor	6,9 ± 1,6 a	7,6 ± 1,4 a	7,4 ± 1,5 a	7,3 ± 1,7 a
Textura	6,5 ± 1,6 b	6,9 ± 1,8 ab	7,3 ± 1,7 a	7,1 ± 1,6 ab
Sabor	6,5 ± 1,7 b	7,4 ± 1,6 a	7,6 ± 1,5 a	7,7 ± 1,3 a
Imp. global	6,8 ± 1,6 b	7,4 ± 1,5 ab	7,4 ± 1,4 a	7,6 ± 1,2 a

F1-formulação 1, embutido cárneo com adição de metade do conservante sal de cura, 0,0095% do óleo essencial de tomilho e 1% de suco de beterraba em pó, F2-formulação 2, embutido cárneo com adição de 0,0095% do óleo essencial de tomilho e 1% de suco de beterraba em pó, F3-formulação 3, embutido cárneo com adição de metade do conservante sal de cura, 0,00095% do óleo essencial de tomilho e 1% de suco de beterraba em pó, F4-formulação 4, embutido cárneo com adição de 0,00095% do óleo essencial de tomilho e 1% de suco de beterraba em pó. Letras diferentes na linha indicam diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

As notas atribuídas pelos julgadores para os atributos tiveram como base a escala hedônica de nove pontos, variando de 1 (desgostei muitíssimo) a 9 (gostei muitíssimo). Os resultados da avaliação de todos os parâmetros (aparência, cor, odor, textura, sabor e impressão global) encontram-se dentro da zona de aceitação, com valores variando entre 6 (Gostei Ligeiramente) e 8 (Gostei Muito). Entretanto, observou-se que F1, a exceção do atributo odor, em que não houve diferença significativa entre as formulações, em todos os demais apresentou alguma diferença. F1 foi considerada significativamente inferior em relação à aparência e a cor, quando comparada a F2 e F4; em relação à textura, comparativamente a F3; em termos de sabor, relativamente a todas as demais, e segundo a impressão global, com respeito a F3 e F4.

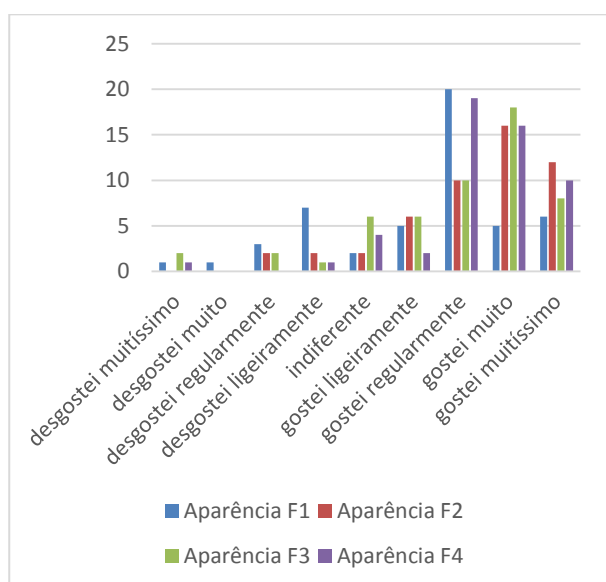
A impressão global das amostras apresentou resultados médios entre 6,8 a 7,6, demonstrando satisfatória aceitação sensorial para o produto. Entre os atributos avaliados pelos provadores, a impressão global pode ser considerada dos mais importantes, pois engloba todas as características avaliadas.

Quanto ao índice de aceitação (IA), segundo Gularte (2009), um alimento é considerado aceito quando possuir índice de aceitação superior a 70%. Sendo assim, pode-se inferir que as amostras F1, F2, F3 e F4 apresentaram boa aceitação pelos consumidores, apresentando índices de aceitabilidade de 75, 82, 82 e 84%, respectivamente. Cabe destacar que a amostra F4 foi a que apresentou o melhor índice de aceitabilidade (84%).

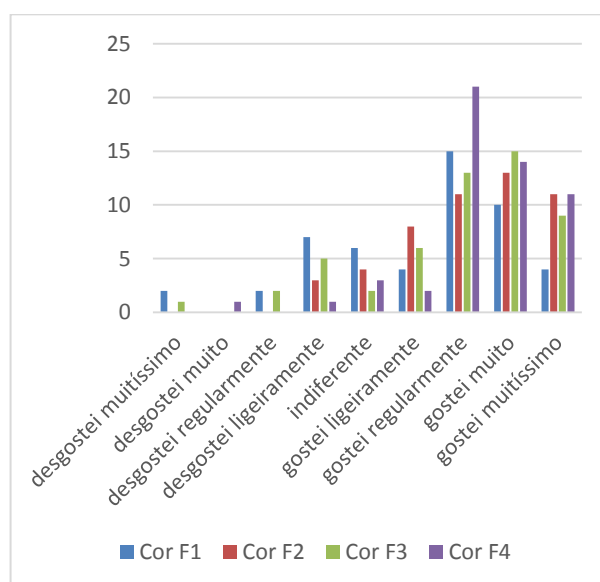
Na Figura 3 são mostradas as distribuições de frequência da escala hedônica para os atributos avaliados. Constatou-se que em relação a aparência, F2, F3 e F4 obtiveram, respectivamente, 76% 72% e 90%, das respostas entre as descrições “Gostei regularmente” e “Gostei muitíssimo”, portanto, todos acima de 70%. Somente para F1 o percentual de respostas entre estas descrições foi menor, representando 62%.

Para a cor, observou-se comportamento similar ao da aparência, F2, F3 e F4 obtiveram, respectivamente, 70% 74% e 92%, das respostas entre as descrições “Gostei regularmente” e “Gostei muitíssimo” e F1, 58% das respostas entre estas descrições.

Em relação ao odor, todas as formulações receberam indicações entre as descrições “Gostei regularmente” e “Gostei muitíssimo” acima de 70% (F1 = 65%; F2 = 80%; F3 = 86% e F4 = 78%).



a)



b)

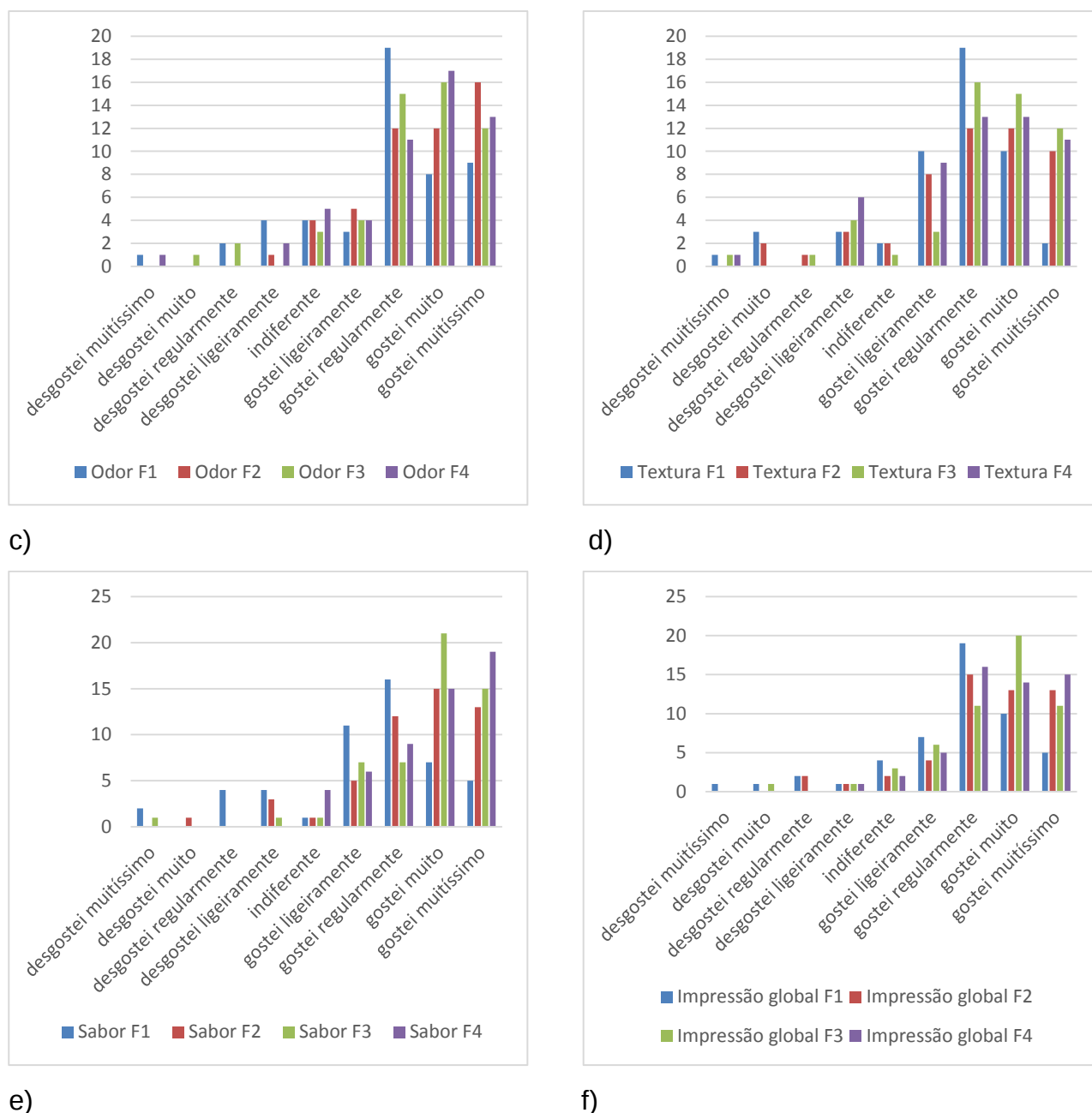


Figura 3. Distribuição de frequência da escala hedônica para embutido cárneo com adição de óleo essencial de tomilho e suco de beterraba em pó. a) aparência, b) cor, c) odor, d) textura, e) sabor e f) impressão global. F1-formulação 1, embutido cárneo com adição de metade do conservante sal de cura, 0,0095% do óleo essencial de tomilho e 1% de suco de beterraba em pó, F2-formulação 2, embutido cárneo com adição de 0,0095% do óleo essencial de tomilho e 1% de suco de beterraba em pó, F3-formulação 3, embutido cárneo com adição de metade do conservante sal de cura, 0,00095% do óleo essencial de tomilho e 1% de suco de beterraba em pó, F4-formulação 4, embutido cárneo com adição de 0,00095% do óleo essencial de tomilho e 1% de suco de beterraba em pó.

Para textura e sabor, verificou-se tendência semelhante entre os resultados, tendo F1 e F2 apresentado menores percentuais de respostas entre as descrições “Gostei regularmente” e “Gostei muitíssimo”. Em relação à

textura, estes dados representaram 62% para F1, 68% para F2, 86% para F3 e 74% para F4. Já quanto ao sabor, representaram 52% para F1, 60% para F2, 86% para F3 e 84% para F4. Nestes atributos, além de F1, também F2 ficou abaixo de 70% de respostas entre as descrições que representam maior aceitação.

Em relação à impressão global, os resultados seguiram o comportamento observado para aparência e cor, ou seja, novamente, apenas F1 obteve percentual de respostas abaixo de 70% entre as descrições “Gostei regularmente” e “Gostei muitíssimo”, representando 68%. Para as demais formulações os dados foram bastante satisfatórios, sendo as respostas entre as referidas descrições, para F2 = 82%; F3 = 84% e F4 = 90%.

A distribuição de frequência da escala hedônica, no global, indicou maior vantagem sensorial para F4 (adição de 0,00095% do óleo essencial de tomilho e 1% de suco de beterraba em pó) e menor para F1 (adição de metade do conservante sal de cura, 0,0095% do óleo essencial de tomilho e 1% de suco de beterraba em pó), o que pode ser considerado como bastante positivo.

A elevada aceitação da análise sensorial para todas as formulações refletiu-se na intenção de compra dos consumidores, os resultados estão descritos na Figura 4.

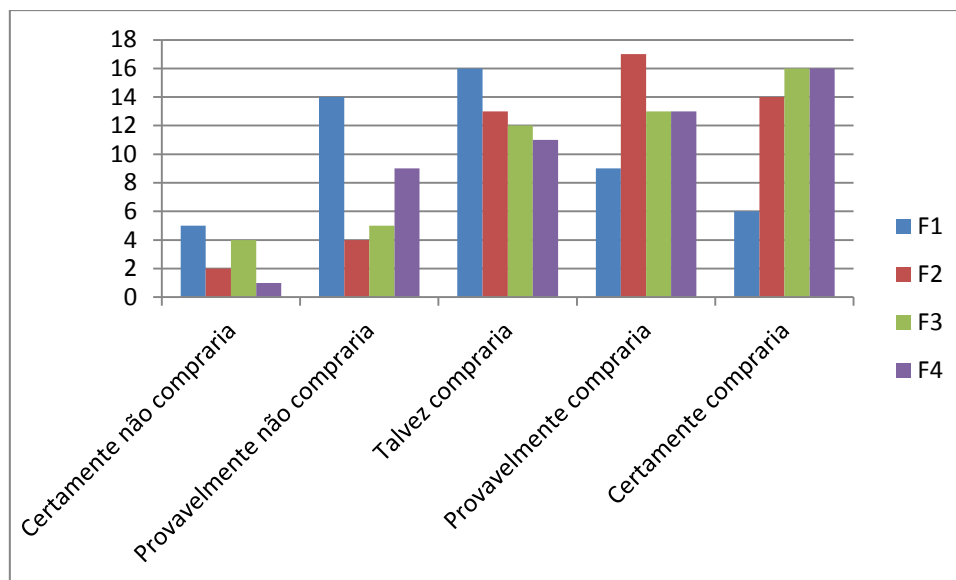


Figura 4. Teste de intenção de compra para embutido cárneo com adição de óleo essencial de tomilho e suco de beterraba em pó. F1-formulação 1, embutido cárneo com adição de metade do conservante sal de cura, 0,0095% do óleo essencial de tomilho e 1% de suco de beterraba em pó, F2-formulação 2, embutido cárneo com adição de 0,0095% do óleo essencial de tomilho e 1% de suco de beterraba em pó, F3-formulação 3, embutido cárneo com adição de metade do conservante sal de cura, 0,00095% do óleo essencial de tomilho e 1% de suco de beterraba em pó, F4-formulação 4, embutido cárneo com adição de 0,00095% do óleo essencial de tomilho e 1% de suco de beterraba em pó.

É possível observar que no gráfico da distribuição de frequência da escala hedônica, que a intenção de compra das amostras F2 a F4 apresentaram percentuais elevados, sendo que no mínimo 80% das respostas ficou entre as descrições “Talvez compraria” e “Certamente compraria”. Apenas F1 mostrou percentual mais expressivos de respostas entre as descrições “Certamente não compraria” e “Provavelmente não compraria” (38%). Estes resultados apontam para a boa aceitação pelos consumidores do produto contendo a combinação do óleo essencial de tomilho e o suco de beterraba em pó, mostrando que o produto poderia ser adquirido, caso estivesse disponível para a comercialização, inclusive sem a adição dos sais de cura.

A maioria dos estudos realizados aponta para o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais, sem mencionar a sua aplicação em alimentos e a aceitabilidade dos consumidores (ERNANDES; CRUZ, 2007; MENEZES et al., 2009; CARAVIC-STANKO et al., 2010, ALVES, 2010; POZZO et al. 2011; PROBIT, 2012; ANDRADE, 2013; AL ABBASY et al., 2015; ANSESIO; GROSSO; JULIANI, 2015; ARAUJO; LONGO, 2016) ou testam seu efeito antimicrobiano no alimento sem realizar avaliação sensorial (BOTRE et al., 2010). Dos poucos estudos que avaliaram a aceitação de alimentos adicionados de óleo essencial de tomilho está o trabalho de Karabagias, Badeka e Kontominas (2011), com adição de óleo de tomilho (0,1 g.100 g⁻¹) em carne de cordeiro, o qual mostrou que essa dose causou um odor forte e sabor desagradável no produto.

4 Conclusão

Pode-se concluir que o óleo essencial de tomilho apresentou uma forte atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* testadas *in vitro*. Ainda, apresentou efeito inibitório contra *Staphylococcus coagulase positiva* *in situ* em embutido cárneo, em todas as concentrações, enquanto que para bactérias aeróbias mesófilas, na concentração de 0,95% apresentou controle microbiológico, e na concentração de 0,0095% foi efetivo com adição da metade da concentração de conservantes (sais de cura) por maior tempo de armazenamento. Portanto, verificou-se o potencial do óleo essencial como conservante natural. O suco de beterraba em pó também pode

ser uma alternativa de corante natural que produz coloração característica ao embutido cárneo. O embutido cárneo adicionado de óleo essencial de tomilho e de suco de beterraba em pó apresentou boa aceitação sensorial. Assim, o uso associado de óleo essencial de tomilho e suco de beterraba em pó, pode representar boa alternativa à substituição dos sais de cura (nitratos e nitritos) na elaboração de embutidos cárneos.

5 Referências bibliográficas

AKONO, P. N. et al. Chemical composition and Insecticidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus grandis*, *Citrus medica* and *Citrus sinensis* leaves from Cameroon on *Anophelesgambiae* Giles, 1902. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 4, n. 6, p. 17-23, nov. 2016.

AL ABBASY, D. W.; PATHARE, N.; AL-SABAHI, J. N.; KHAN, S. A. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil isolated from *Omani basil* (*Ocimum basilicum* Linn.) **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n.8, p. 645-649, 2015.

ALEXANDRE, H. V.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M.; OLIVEIRA, E. N. A. Armazenamento de pitanga em pó. **Comunicata Scientiae**, v. 5, n. 1, p. 83-91, 2014.

ALMEIDA, M. M. de.; SILVA, F. L. H.; CONRADO, L. S.; FREIRE, R. M. M., VALENÇA, A. R. Caracterização física-química de frutos do mandacaru. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 11, n. 1, p. 15-20, 2009.

AL-SHUNEIGAT, J. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of wild *Thymus vulgaris* grown in South Jordan. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 9, n. 5, p. 78-82, 2014.

ALVES, R. **Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais obtidos de folhas de manjerição, pimenta de macaco e tomilho sobre patógenos em alimentos**. 2010, 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) –Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

ANDRADE, M. A. **Óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet: Composição química, caracterização das estruturas secretoras e avaliação do potencial**

biológico. 2013. 227f. Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2013.

ANSESIO, C. M.; GROSSO, N. R.; JULIANI, H. R. Quality characters, chemical composition and biological activities of oregano (*Origanum* spp.). Essential oils from Central and Southern Argentina. **Industrial Crops and Products**, v.63, p. 203-213, 2015.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 16th ed. Washington, 1995.

ARAUJO, M. M.; LONGO, L. P. Teste de ação antimicrobiana *in vitro* de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Institute Biológico**, v. 83, p. 1-7. 2016.

BAHIA, E. V. A.; MORAIS, L. R. V.; SILVA, M. P.; LIMA, O. B. V.; SANTOS, S. F. Estudo das características físico-químicas do fruto do Mandacaru (*Cereus jamacaru* P.DC.) cultivado no sertão Pernambucano. In: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, 2010, Maceió. **Anais...** Maceió: 2010. CD Rom.

BALDIN, J. C.; MICHELIN, E. C.; POLIZER, Y. J.; RODRIGUES, I.; GODOY, S. H. S.; FREGONESI, R. P.; PIRES, M. A.; CARVALHO, L. T.; FERNANDES, A. M.; TRINDADE, M. A. Microencapsulated jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract added to fresh sausage as natural dye with antioxidant and antimicrobial activity. **Meat Science**, v. 118, p. 15-21, 2016.

BEHBAHANI, M. H.; et al. Volatile oil composition and antimicrobial activity of two *Thymus* species. **Pharmacognosy Journal**, v.5, p. 77-79, 2013.

BORGES, C. D. et al. Conservação de morangos com revestimentos à base de goma xantana e óleo essencial de sálvia. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 29, n. 5, p. 1071-1083, Sept./Oct. 2013.

BOTRE, D. A.; SOARES, N. F.; ESPIRITA, P. J. P.; SOUSA, S.; RENHE, I. R. T. Avaliação de filme com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Revista Ceres**, v. 57, p. 283-291, 2010.

CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2288-2294, 2003.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems -A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CARAVIC-STANKO, K.; ORLIC, S.; POLITEO, O.; STRIKIC, F; KOLAK, I.; MILOS, M.; SATOVIC, Z. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**, v. 119, p. 196-201, 2010.

CHORIANOPOULOS, N. et al. Essential oils of *satureja*, *origanum*, and *thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 8261-8267, 2004.

CLEMENTE, I. et al. Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 26–33, 2016.

CLSI, 2015a. M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI (Clinical Lab. Stand. Institute) 35.

CLSI, 2015b. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI (Clinical Lab. Stand. Institute) 35.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 203-220, jul.-dez. 2002.

COSTA, J. M. C.; MEDEIROS, M. F. D.; MATA, A. L. M. L. Isotermas de adsorção de pós de beterraba (*Beta vulgaris* L.), abóbora (*Cucurbita moschata*) e cenoura (*Daucus carota*) obtidos pelo processo de secagem em leito de jorro: estudo comparativo. **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n.1, 2003.

DAL POZZO, M.; VIÉGAS, J.; SANTURIO, D. F.; ROSSATTO, L.; SOARES, I. H.; ALVES, S. H.; DA COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.41, n.4, p.667-672, 2011.

DANNENBERG, G. DA S. et al. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 314–318, 2017.

DIMITRIJEVIĆ, S. I.; MIHAJLOVSKI, K. R.; ANTONOVIĆ, D. G.; MILANOVIC-STEVANOVIC, M. R.; MIJIN, D.Ž. Um estudo dos efeitos aneristeriais sinérgicos de uma dose subletal de ácido láctico e óleos essenciais de *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. e *Origanum vulgare* L. **Food Chemistry**, v.104, p.774-782. 2007.

EBRAHIMABADI, A. H. et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, v. 119, p. 452-458, 2010.

EL-NEKEETY, A. A.; MOHAMED, S. R.; HATHOUT, A. S.; HASSAN, N. S.; ALY, S. E.; ABDEL-WAHAB, M. A. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. **Toxicon**, v. 57, n. 7-8, p. 984-991, 2011.

ERNANDES, G. O. M. F.; CRUZ, G. H. C. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente. **B.CEPPA**, v. 25, p. 193-206, 2007.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: princípios e prática**. 2ª Edição. Porto Alegre. Artmed, 2006.

FERREIRA, L. P. C. **Microencapsulação de extrato de beterraba pelo processo de gelificação iônica** [Dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, Universidade Federal de Sergipe; 2018.

FERREIRA, N. A. **Aproveitamento de resíduos do processamento mínimo de beterraba: elaboração de produtos tecnológicos, avaliação sensorial, físico-química e de compostos funcionais**. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília: 2010. Orientador: Dr. Celso Luiz Moretti. 2010.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

GANDÍA-HERRERO, F.; GARCÍA-CARMONA, F.; ESCRIBANO, J. A novel method using high-performance liquid chromatography with fluorescence for the determination of betaxanthins. **Journal of chromatography A**, v. 1078, p. 83-89. 2005.

GHABRAIE, M.; VU, K. D.; TATA, L.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and

their effect on sensorial quality of ground meat. **LWT - Food Science Technology** v. 66, p. 332–339, 2016.

GIATRAKOU, V.; NTZIMANI, A.; SAVVAIDIS, I. N. Effect of chitosan and thyme oil on a ready to cook chicken product. **Food Microbiology**, v. 27, p. 132-136, 2010.

GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; GÓMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, 116(4), 982–989. 2009.

GULARTE, M. A. **Manual de análise sensorial de alimentos**. Pelotas: Edigraf UFPel, 2009.

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

HERBACH K. M.; STINTZING F. C.; CARLE R. Betalain stability and degradation - Structural and chromatic aspects. **J Food Sci** 71:R41–R50. 2006.

HUDAIB, M.; SPERONI, E.; PIETRA, A. M. D.; CAVRINI, V. CG/EM evaluation of thyme (*Thymus Vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.29, p. 691–700, 2002.

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IV ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 1020p. 2008.

IVANOVIC, J. et al. *In vitro* control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. **Food Control**, v. 25, p. 110-116, 2012.

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

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, maio 2011.

KIM, S-J., CHO, R.; HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extract and their applications to meat product preservation. **Food Control**, v. 29, p. 112-120, 2013.

KLUGE, R. A.; COSTA, C. A.; VITTI, M. C. D.; ONGARELLI, M. G.; JACOMINO, A. P.; MORETTI, C. L. Armazenamento refrigerado de beterraba minimamente processada em diferentes tipos de corte. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p.263-270, 2006.

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

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **J. Appl. Microbiol.**, v.91, p.453-462, 2001.

LIMA, A. R. C.; SANTOS, F. S.; SILVA, R. M.; FIGUEIREDO, R. M. F. Elaboração e caracterização físico-química de suco misto de caju com beterraba. **REVISTA BRASILEIRA DE AGROTECNOLOGIA (BRASIL)** ISSN: 2317-3114. v. 7, n. 2. Páginas 92 – 96. 2017.

LIMA, W. P. **Efeito dos óleos essenciais de *thymus vulgaris* e *cinnamomum zeylanicum* e seus componentes majoritários sobre o fungo *fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici***. 2018. 59p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde - CCENS, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2018.

LISBOA, C. G. C.; FIGUEIRÊDO R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Armazenamento de figo da Índia em pó. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 2, p.216–221, 2012.

MANCINI, E. et al. Studies on Chemical Composition Antimicrobial and Antioxidant Activities of Five *Thymus vulgaris* L. Essential Oils. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12016-12028, 2015.

MASTRO, G. et al. Essential oil diversity of *Origanum vulgare* L. populations from Southern Italy. **Food Chemistry**, v. 235, p. 1-6, mai. 2017.

MELO FILHO, A. B.; BISCONTINI, T. M. B.; ANDRADE, S. A. C. Níveis de nitrito e nitrato em salsichas comercializadas na região metropolitana do Recife. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 390–392, 2004.

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

MILLEZI, A. F.; CAIXETA, D. S.; ROSSONI, D. F.; CARDOSO, M. G.; PICCOLI, R. H. P. Propriedades antimicrobianas *in vitro* de óleos essenciais de plantas *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* e *Laurus nobilis* contra cinco importantes patógenos veiculados por alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** vol.32 nº.1 Campinas Mar. 2012.

MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G.; VALLE, C; ROURA, I. E. Parâmetros inibitórios de óleos essenciais para reduzir um patógeno veiculado por alimentos. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, p.565-570, 2005.

NEMATİ, Z. et al. Chemical composition and antioxidant activity of Shirazi *Thymus vulgaris* essential oil. **Advanced Herbal Medicine**, v. 3, n. 2, p. 26-32, 2017.

NIKOLIĆ, M. et al. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 183-190, jan. 2014.

OLIVEIRA, D. F.; COELHO, A. R.; BURGARDT, V. C. F.; HASHIMOTO, E. H.; LUNKES, A. M.; MARCHI, J. F.; TONIAL, I. B. Alternativas para um produto cárneo mais saudável: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 3, p. 163-174, 2013.

OLIVEIRA, E. A.; JUNQUEIRA, S. F.; MASCARENHAS, R. J. Caracterização físico-química e nutricional do fruto da palma (*Opuntia ficus indica* L. mill) cultivada no sertão do sub-médio São Francisco. **Holos**, v. 3, n. 27, p. 113-119, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. Comunicado de prensa del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer sobre el Cáncer evalúa el consumo de la carne roja y de la carne processada. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/cancer-red-meat/es/>.

Acesso em 20 de julho de 2019.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. **Alecrim (*Rosmarinus Officinalis* L.): Propriedades Antimicrobiana e Química do Óleo Essencial**. Boletim CEPPA, 19:193-210. 2008.

POZZO, D. M.; VIÉGAS, J.; SANTURIO, D. F.; ROSSATTO, L.; SOARES, H. I.; ALVES, H. A.; COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v. 23, p. 1-6, 2011.

PROBIST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012, 112f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) –Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

RAHMAN, A.; KANG, S. inhibition of foodborne pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of *Erigeron ramosus* (walt.) b.s.p. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 176–189, 2009.

RAZAFIMAMONJISON, G. et al. Bud, leaf and stem essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from Madagascar, Indonesia and Zanzibar. **International Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 224-233, jun. 2014.

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

ROTA, M. C.; HERRERA, A.; MARTÍNEZ, R. M.; SOTOMAYOR, J. A.; JORDÁN, M. J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v.19, p.681-686, 2008.

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

SANTOS, D. C.; LISBOA, J. F.; FEITOSA, R. M.; SANTOS, Y. M. G.; ROCHA, A. P. T. **Processamento e caracterização física e físico-química de blends de polpa de caju e beterraba**. Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia – CONTECC. Fortaleza – CE. 2015.

SANTOS, F. A.; SALLES, J. R. J.; CHAGAS FILHO, E.; RABELO, R. N. Análise qualitativa das polpas congeladas de frutas produzidas pela SUFRUTS, MA. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 119, p.14-22, 2004.

SANTURIO, F. D. **Uso de óleos essenciais de especiarias para controle de coliformes em linguiça toscana**. 2015, 62f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia em Alimentos) –Programa de Pós-Graduação Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. Estabilidade de corantes e pigmentos de origem vegetal. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 3, n. 02, p. 6-24, 2013.

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

SHARIFIFAR F.; MOSHAFI H.; MANSOURI S. H.; KHODASHENAS M.; KHOSHNOODI M. 2007. *In vitro* evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic Zataria multiflora Boiss. **Food Control** 18: 800-805.

SILVA, J. P. L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella* Enteritidis. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.30, p.136-141, 2013.

SILVA, L. R.; ALVES, R. E. Caracterização físico-química de frutos de “mandacaru”. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias Ambiental**, v. 7, n. 2, p. 199-205, 2009.

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

STINTZING, F. C.; CARLE, R. Betalains – emerging prospects for food scientists. **Trends in Food Science and Technology**, n. 12, p. 514-525. 2007.

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*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, p.1561-1568, 2002.

VASCONCELLOS, F. Após baixa, consumo de carne suína sobe 26% no Brasil, 2015. Disponível em: <[http://blogs.oglobo.globo.com/na-base-dos-](http://blogs.oglobo.globo.com/na-base-dos)

dados/post/apos-baixaconsumo-de-carne-suina-sobe-26-no-brasil.html>.

Acesso em julho de 2019.

VIEIRA, F. P. R. **Efeitos *in vitro* e caracterização química dos óleos essenciais de *cinnamomum verum*, *syzygium aromaticum*, *origanum vulgare*, *thymus vulgaris* e seus componentes majoritários sobre *fasciola hepatica*.** 2017. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

VITTI, M. C. D. **Aspectos fisiológicos, bioquímicos e microbiológicos em beterrabas minimamente processadas** – Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de plantas – Piracicaba, SP, 2003b.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVARES, J. A. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, n.3, p.526-531, 2008.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

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

WICHIENTHOT, S.; JATUPORNPIPAT, M.; RASTALL. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 850-857, 2010.

8 Considerações finais

O constituinte majoritário do óleo essencial de tomilho foi o carvacrol que, neste estudo, foi o responsável pela atividade antimicrobiana do óleo.

O óleo essencial apresentou um efeito inibitório e bactericida frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

O suco integral de beterraba mostrou elevado conteúdo de sólidos solúveis. O pH e a umidade foram próximos aos descritos na literatura para produtos similares. Para o suco de beterraba em pó, observou-se um baixo conteúdo de umidade e elevado conteúdo de açúcares totais. O pH, açúcares redutores e não redutores foram próximos aos descritos na literatura. A avaliação de parâmetros de cor dos produtos, tanto do suco integral de beterraba quanto do suco de beterraba em pó, mostraram tendência à cor vermelha escura, característica das betacianinas, entretanto, com tonalidade neutra.

Ainda, o óleo essencial estudado apresentou efeito inibitório contra *Staphylococcus coagulase positiva* e coliformes termotolerantes testado *in situ* em embutido cárneo, em todas as concentrações, enquanto que para bactérias aeróbias mesófilas, na concentração de 0,95% apresentou um controle microbiológico e na concentração de 0,0095% foi efetivo com adição da metade do conservante por maior tempo de armazenamento, verificando-se assim o potencial do óleo essencial ser uma alternativa viável como conservante natural, pois promoveu o controle microbiológico. Ainda, o suco de beterraba em pó também é uma alternativa para atuar como um corante natural, suprimindo as características sensoriais em embutido cárneo.

O embutido cárneo adicionado de óleo essencial de tomilho e de suco de beterraba em pó apresentou boa aceitação sensorial.

9 Referências bibliográficas

ABNT. NBR 12994: Métodos de análise sensorial dos alimentos e bebidas. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**. Rio de Janeiro, 1993.

AKONO, P. N. et al. Chemical composition and Insecticidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus grandis*, *Citrus medica* and *Citrus sinensis* leaves from Cameroon on *Anopheles gambiae* Giles, 1902. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 4, n. 6, p. 17-23, nov. 2016.

AL ABBASY, D. W.; PATHARE, N.; AL-SABAHI, J. N.; KHAN, S. A. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil isolated from Omani basil (*Ocimum basilicum* Linn.) **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n.8, p. 645-649, 2015.

ALEXANDRE, H. V.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M.; OLIVEIRA, E. N. A. Armazenamento de pitanga em pó. **Comunicata Scientiae**, v. 5, n. 1, p. 83-91, 2014.

ALMEIDA, M. M. de.; SILVA, F. L. H.; CONRADO, L. S.; FREIRE, R. M. M., VALENÇA, A. R. Caracterização física-química de frutos do mandacaru. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 11, n. 1, p. 15-20, 2009.

AL-SHUNEIGAT, J. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of wild *Thymus vulgaris* grown in South Jordan. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 9, n. 5, p. 78-82, 2014.

ALVES, R. **Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais obtidos de folhas de manjerição, pimenta de macaco e tomilho sobre patógenos em alimentos**. 2010, 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI. Antioxidant Activity of Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 10835–10847, 2013.

ANDRADE, M. A. **Óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet: Composição química, caracterização das estruturas secretoras e avaliação do potencial biológico**. 2013. 227f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2013.

ANSESIO, C. M.; GROSSO, N. R.; JULIANI, H. R. Quality characters, chemical composition and biological activities of oregano (*Origanum* spp.). Essential oils from Central and Southern Argentina. **Industrial Crops and Products**, v.63, p. 203-213, 2015.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 16th ed. Washington, 1995.

ARAUJO, M. M.; LONGO, L. P. Teste de ação antimicrobiana *in vitro* de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Institute Biológico**, v. 83, p. 1-7. 2016.

ASCENÇÃO, V. L.; MOUCHREK FILHO, V. E. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Caderno de Pesquisa**, v. 20, n. especial, 2013.

BAHIA, E. V. A.; MORAIS, L. R. V.; SILVA, M. P.; LIMA, O. B. V.; SANTOS, S. F. Estudo das características físico-químicas do fruto do Mandacaru (*Cereus jamacaru* P.DC.) cultivado no sertão Pernambucano. In: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, 2010, Maceió. **Anais...** Maceió: 2010. CD Rom.

BAJPAI, V. K.; KWANG-HYUN BAEK, S. C. K. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**. Volume 45. Issue 2. March 2012. p. 722-734. 2012.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 1-10, Oct. 2000.

BALDIN, J. C.; MICHELIN, E. C.; POLIZER, Y. J.; RODRIGUES, I.; GODOY, S. H. S.; FREGONESI, R. P.; PIRES, M. A.; CARVALHO, L. T.; FERNANDES, A. M.; TRINDADE, M. A. Microencapsulated jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract added to fresh sausage as natural dye with antioxidant and antimicrobial activity. **Meat Science**, v. 118, p. 15-21, 2016.

BAPTISTA, P.; VENÂNCIO, A. Os perigos para Segurança Alimentar no Processamento de Alimentos. Estado Português, 2003. Disponível em: http://www.esac.pt/noronha/manuais/manual_4_perigos.pdf. Acesso em: 10/07/2019

BARBUTI, S.; PAROLARI, G. Validation of manufacturing process to control pathogenic bacteria in typical dry fermented products. **Meat Science**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 323-329, Nov. 2002.

BARROS, B. C. V. **Avaliação da qualidade sanitária do pescado Salgado seco comercializado nas feiras livres de Belém-PA**. 45p. Trabalho de Conclusão de Programa de Especialização em Veterinária de Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal – HIPOA. 2009. Universidade Castelo Branco. Belém. 2009.

BEHBAHANI, M. H.; et al. Volatile oil composition and antimicrobial activity of two *Thymus* species. **Pharmacognosy Journal**, v.5, p. 77-79, 2013.

BEIRÃO, H. et al. Processamento e industrialização de moluscos. In: Seminário e Workshop Tecnologias para Aproveitamento Integral Do Pescado, 1., 2000. Campinas. **Anais...** Campinas: Centro de Tecnologia de Carnes, ITAL, 2000. p. 38-84. 2000.

BENCHAAAR, C.; CALSAMIGLIA, S.; CHAVES, A. V.; FRASER, G. R.; COLOMBATTO, D.; MCALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Anim. Feed Sci. Technol.** 145, 209-228. 2008.

BLOUKAS, J. G.; ARVANITOYANNIS, I. S.; SIOPI, A. A. Effect of natural s and nitrites on colour attributes of frankfurters. **Meat Science**, v. 52, p. 257-265, 1999.

BORGES, C. D. et al. Conservação de morangos com revestimentos à base de goma xantana e óleo essencial de sálvia. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 29, n. 5, p. 1071-1083, Sept./Oct. 2013.

BOTRE, D. A.; SOARES, N. F.; ESPIRITA, P. J. P.; SOUSA, S.; RENHE, I. R. T. Avaliação de filme com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Revista Ceres**, v. 57, p. 283-291, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa n. 4, de 31 de março de 2000**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. Diário Oficial da União, Brasília 05/04/2000, Seção 1, p. 6-10, 2000.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

BUSATO, N. V. et al. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1574-1582, 2014.

CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2288-2294, 2003.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems -A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CAMARGO FILHO, W. P.; MAZZEI, A. R. O Mercado de beterraba em São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 56-58, 2002.

CARAVIC-STANKO, K.; ORLIC, S.; POLITEO, O.; STRIKIC, F.; KOLAK, I.; MILOS, M.; SATOVIC, Z. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**, v. 119, p. 196-201, 2010.

CARMO, E. S.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L. S. The potential of *oreganum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 362-367, 2008.

CARTAXO, J. L. S. **Riscos associados aos níveis de nitritos em alimentos : uma revisão**. 2015. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

CARVALHO, H. H. C.; CRUZ, F. T.; WUEST, J. M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 7, n. 3, p. 25-32, 2005.

CASTELLANI, D. C.; DOMENICO, C. I.; RONCOLETTA, L. M. A.; SILVA, A. C.; TOZAKI, R. M.; OLIVEIRA, D. H. Coeficientes técnicos de produção de pripioca (*Cyperus articulatus* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, especial, p. 606-611, 2011.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. Pesquisa de *Listeria spp.*, coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria

de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Cienc. Tecnol. Aliment.** v. 21, p. 281-287, 2001.

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oils Research**. s.l. n.12, p. 630-649, 2000.

CHEVALLIER, I. et al. Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. **Food Control**, [S.l.], v. 17, n. 6, p. 446-453, June 2006.

CHORIANOPOULOS, N. et al. Essential oils of *satureja*, *origanum*, and *thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 8261-8267, 2004.

CLEMENTE, I. et al. Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 26–33, 2016.

CLSI, 2015a. M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI (Clinical Lab. Stand. Institute) 35.

CLSI, 2015b. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI (Clinical Lab. Stand. Institute) 35.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes Alimentícios. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 203-220, jul.-dez. 2002.

COSTA, J. M. C.; MEDEIROS, M. F. D.; MATA, A. L. M. L. Isotermas de adsorção de pós de beterraba (*Beta vulgaris* L.), abóbora (*Cucurbita moschata*) e cenoura (*Daucus carota*) obtidos pelo processo de secagem em leito de jorro: estudo comparativo. **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n.1, 2003.

COWAN, M. M. Plant product as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 12, no. 4, p. 564-582. 1999.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R. The Mode of antimicrobial action of essential oil of

Melaleuca alternifolia tea tree oil. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 88, n. 1, p. 170–175, 2000.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**. 2002, vol.22, n.3, pp. 263-271. 2002.

DAL POZZO, M.; VIÉGAS, J.; SANTURIO, D. F.; ROSSATTO, L.; SOARES, I. H.; ALVES, S. H.; DA COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.41, n.4, p.667-672, 2011.

DANNENBERG, G. DA S. et al. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 314–318, 2017.

DANTAS, M. I. S; MINIM, V. P. R.; DELIZA, R.; PUSCHMANN, R. The effect of packaging on the perception of minimally processed products. **Journal of International Food and Agribusiness Marketing**, v. 16, n. 2, p. 71-83, 2004.

DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. Food antimicrobials – an introduction. **Antimicrobial in Food**. CRC Press, p. 1-9, 2005.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: Possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, vol. 14, p. 273–285, 2004.

DIMITRIJEVIĆ, S. I.; MIHAJLOVSKI, K. R.; ANTONOVIĆ, D. G.; MILANOVIC-STEVANOVIC, M. R.; MIJIN, D.Ž. Um estudo dos efeitos aneristeriais sinérgicos de uma dose subletal de ácido láctico e óleos essenciais de *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. e *Origanum vulgare* L. **Food Chemistry**, v.104, p.774-782. 2007.

DJENANE, D. et al. Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. **Food Science and Technology International**, v.17, n. 6, p. 505–515, 2011.

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.

DRUNKLER, D. A. **Estudo da estabilidade de betalaínas em diferentes solventes e em extrato de beterraba (*Beta vulgaris* L.) adicionado de ciclodextrinas (alfa, β -e γ) e ácidos orgânicos (tânico e gálico).** 2001. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

DRUNKLER, D. A.; FALCÃO, L. D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Influência dos ácidos tânico e gálico na estabilidade de betacianinas do extrato bruto de beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.). **Alim Nutr.** 15 (1): 35-41. 2004.

DRUNKLER, D. A.; FETT, R.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Betalaínas extraídas da beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.). Bol. **SBCTA.** 37 (1): 14-21. 2003.

EBRAHIMABADI, A. H. et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, v. 119, p. 452-458, 2010.

EL-NEKEETY, A. A.; MOHAMED, S. R.; HATHOUT, A. S.; HASSAN, N. S.; ALY, S. E.; ABDEL-WAHAB, M. A. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. **Toxicon**, v. 57, n. 7-8, p. 984-991, 2011.

ERNANDES, G. O. M. F.; CRUZ, G. H. C. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente. B. **CEPPA**, v. 25, p. 193-206, 2007.

ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCÍA, D.; ANDPAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control.** vol. 22, p. 896–902, 2011.

European Food Safety Authority (EFSA) – Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004. **EFSA J.**, n. 310, 10; 23-95. 2006.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: princípios e prática.** 2ª Edição. Porto Alegre. Artmed, 2006.

FERREIRA, L. P. C. **Microencapsulação de extrato de beterraba pelo processo de gelificação iônica** [Dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, Universidade Federal de Sergipe; 2018.

FERREIRA, N. A. **Aproveitamento de resíduos do processamento mínimo de beterraba: elaboração de produtos tecnológicos, avaliação sensorial, físico-química e de compostos funcionais.** Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília: 2010. Orientador: Dr. Celso Luiz Moretti. 2010.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: agroecologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**, 2a edição revista e ampliada. Viçosa, Minas Gerais, Editora UFV, 2003, 412p. il., ISBN: 8-7269-065-4.

FRANCO, B. D. G. M. et al. Viabilidade de *Escherichia coli* patogênica em linguiça frescal suína. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 3, p. 319-325, 2010.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2008.

FRATIANNI, F. et al. Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 8, p. 528-535, 2010.

GAIO, I. et al. Antibacterial activity of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) in Italian-type sausage. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 10, n. 4, p. 323-329, 2015.

GANDÍA-HERRERO, F.; GARCÍA-CARMONA, F.; ESCRIBANO, J. A novel method using high-performance liquid chromatography with fluorescence for the determination of betaxanthins. **Journal of chromatography A**, v. 1078, p. 83-89. 2005.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: Princípios e aplicações.** São Paulo: Nobel, 511 p. 2008.

GHABRAIE, M.; VU, K. D.; TATA, L.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. **LWT - Food Science Technology** v. 66, p. 332–339, 2016.

GIATRAKOU, V.; NTZIMANI, A.; SAVVAIDIS, I. N. Effect of chitosan and thyme oil on a ready to cook chicken product. **Food Microbiology**, v. 27, p. 132-136, 2010.

GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; GÓMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, 116(4), 982–989. 2009.

GREATHEAD, H. Plants and plant extracts for improving animal productivity. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 2, p. 279-290, 2003.

GULARTE, M. A. **Manual de análise sensorial de alimentos**. Pelotas: Edigraf UFPel, 2009.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology** , v. 124, p. 91–97, 2008.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 142-150, 2009.

HAJIMEHDIPOOR, H.; SHEKARCHI. M.; KHANAVI, M.; ADIB, N.; AMRI, M. A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. *Pharmacognosy Maganize*, 6:154-158. 2010.

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

HELANDER, I. M. et al. Action of Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. J. **Agric. Food Chem.**, Vol. 46, No. 9, 1998.

HERBACH K. M.; STINTZING F. C.; CARLE R. (2006) Betalain stability and degradation - Structural and chromatic aspects. **J Food Sci** 71:R41–R50. 2006.

HERNANDES, N. K.; CONEGLIAN, R. C. C.; GODOY, R. L. O.; VITAL, H. C.; FREIRE JUNIOR, M. Testes Sensoriais de Aceitação da Beterraba Vermelha (*Beta vulgaris ssp. Vulgaris* L.), cv. *Early Wonder*, minimamente processada e irradiada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27 (supl.), p. 64-68, ago. 2007.

HUDAIB, M.; SPERONI, E.; PIETRA, A. M. D.; CAVRINI, V. CG/EM evaluation of thyme (*Thymus Vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.29, p. 691–700, 2002.

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

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IV ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 1020p. 2008.

INSTITUTO FNP. Agrianual 2007: anuário da agricultura brasileira, São Paulo, 516 p. 2007.

IVANOVIC, J. et al. *In vitro* control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. **Food Control**, v. 25, p. 110-116, 2012.

JAY, J. M.; TONDO, E. C. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

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

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

KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Betalains: a new class of dietary cationized antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5178-5185. 2001.

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

KARRE, L.; LOPEZ, K.; GETTY, K. J. K. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Sci.** 94, 220-227. 2013.

KERROLA, K.; GALAMBOSI, B.; KALLIO, H. Volatile components and odor intensity of four phenotypes of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 776-781, 1994.

KIM, S-J., CHO, R.; HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extract and their applications to meat product preservation. **Food Control**, v. 29, p. 112-120, 2013.

KINSMAN et al. Muscle Foods, Meat, Poultry and Seafood Technology, New York: Chapman & Hall, 1994.

KLUGE, R. A.; COSTA, C. A.; VITTI, M. C. D.; ONGARELLI, M. G.; JACOMINO, A. P.; MORETTI, C. L. Armazenamento refrigerado de beterraba minimamente processada em diferentes tipos de corte. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p.263-270, 2006.

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

KREUTZ, D. H., WEIZENMANN, M., MACIEL, M. J., SOUZA, C. F. V. Avaliação das concentrações de nitrito e nitrato em hortaliças produzidas em cultivos convencional e orgânico na região do Vale do Taquari. UNOPAR **Cient Ciênc Biol Saúde.**; 14(2):105-10. 2012.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **J. Appl. Microbiol.**, v.91, p.453-462, 2001.

LEMAY, M. et al. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 217 – 226, 2002.

LIMA, A. R. C.; SANTOS, F. S.; SILVA, R. M.; FIGUEIREDO, R. M. F. Elaboração e caracterização físico-química de suco misto de caju com beterraba. **REVISTA BRASILEIRA DE AGROTECNOLOGIA (BRASIL)** ISSN: 2317-3114. v. 7, n. 2. Páginas 92 – 96. 2017.

LIMA, W. P. **Efeito dos óleos essenciais de thymus vulgaris e cinnamomun zeylanicum e seus componentes majoritários sobre o fungo fusarium oxysporum f.sp. lycopersici** 2018. 59p. Dissertação (Mestrado em

Agroquímica) - Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde - CCENS, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2018.

LISBOA, C. G. C.; FIGUEIRÊDO R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Armazenamento de figo-da-índia em pó. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 2, p.216–221, 2012.

LISI, A.; TEDONE, L.; MONTESANO, V.; SARLI, G.; NEGRO, D. Chemical characterisation of *Thymus* populations belonging from southern Italy. **Food Chemistry**, 125:1284-1286. 2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINCO, J.M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1126 p.

MANCINI, E. et al. Studies on Chemical Composition Antimicrobial and Antioxidant Activities of Five *Thymus vulgaris* L. Essential Oils. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12016-12028, 2015.

MARQUES, S. et al. Avaliação higiênico-sanitária de linguiças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1120-1123, nov./dez. 2006.

MARTUCCI, J. F.; GENDE, L. B.; RUSECKAITE, R. A. Orégano and lavender essential oils as antioxidante and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. **Industrial Crops and Products**,v. 71, p. 205-213, 2015.

MASTRO, G. De et al. Essential oil diversity of *Origanum vulgare* L. populations from Southern Italy. **Food Chemistry**, v. 235, p. 1-6, mai. 2017.

MATTOS, S. H.; INNECCO, R.; MARCO, C. A.; ARAÚJO, A. V. Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007. p. 61-63.(série BNB - ciência e tecnologia 2).

MELO FILHO, A. B.; BISCONTINI, T. M. B.; ANDRADE, S. A. C. Níveis de nitrito e nitrato em salsichas comercializadas na região metropolitana do Recife. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 390–392, 2004.

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

MILLEZI, A. F.; CAIXETA, D. S.; ROSSONI, D. F.; CARDOSO, M. G.; PICCOLI, R. H. P. Propriedades antimicrobianas *in vitro* de óleos essenciais de plantas *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* e *Laurus nobilis* contra cinco importantes patógenos veiculados por alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** vol.32 nº.1 Campinas Mar. 2012.

MOREAU, R. L. M., SIQUEIRA, M. E. P. B. Toxicologia Analítica. Rio de Janeiro: Guanabarra Koogan; 2008.

MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G.; VALLE, C.; ROURA, I. E. Parâmetros inibitórios de óleos essenciais para reduzir um patógeno veiculado por alimentos. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, p.565-570, 2005.

MOROT-BIZOT, S. C.; LEROY, S.; TALON, R. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. **Int. J. Food Microbiol.** [online], v. 108, n. 2, p. 210, Apr. 2006.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Antimicrobial activity of the essentials oils: a multifactor approach of the methods. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 1, p.108-113, 2007.

NEMATİ, Z. et al. Chemical composition and antioxidant activity of Shirazi *Thymus vulgaris* essential oil. **Advanced Herbal Medicine**, v. 3, n. 2, p. 26-32, 2017.

NIKOLIĆ, M. et al. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 183-190, jan. 2014.

OLIVEIRA, D. F.; COELHO, A. R.; BURGARDT, V. C. F.; HASHIMOTO, E. H.; LUNKES, A. M.; MARCHI, J. F.; TONIAL, I. B. Alternativas para um produto cárneo mais saudável: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 3, p. 163-174, 2013.

OLIVEIRA, E. A.; JUNQUEIRA, S. F.; MASCARENHAS, R. J. Caracterização físico-química e nutricional do fruto da palma (*Opuntia ficus indica* L. mill) cultivada no sertão do sub-médio São Francisco. **Holos**, v. 3, n. 27, p. 113-119, 2011.

OLIVEIRA, J. M., ARAÚJO, W. M. C., BORGIO, L. A. Quantificação de nitrato e nitrito em linguiça do tipo frescal. **Ciênc Tecnol Aliment.**; 25(4):736-42. 2005.

OLIVEIRA, L. M.; NEPOMUCENO, C. F.; FREITAS, N. P.; PEREIRA, D. M. S.; SILVA, G. C.; LUCCHESI, A. M. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. Ex Benth. e *Hyptis platanifolia* Mart ex Benth. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 1, p. 73-78, 2011.

OLIVO, R. Alterações oxidativas em produtos cárneos. In OLIVO, R. **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. Criciúma, SC: Ed. Do Autor. Cap. 44, p. 533-542. 2006.

ORDOÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos**. Vol. 2 - Alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed. 279 p. 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. Comunicado de prensa del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer sobre el Cáncer evalúa el consumo de la carne roja y de la carne processada. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/cancer-red-meat/es/>. Acesso em 20 de julho de 2019.

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

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

OZCAN, M.; CHALCHAT, J. C. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 30:68-73. 2004.

PEREIRA M. C.; VILELA, G. R.; COSTAS, L. M. A. S.; COSTAS, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciências Agrotecnicas**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PESAVENTO, G.; CALONICO, C.; BILIA, A. R.; CALESINI, F.; ADDONA, R.; MENCARELLI, L.; CARMAGNINI, L.; MARTINO, D. M. C.; NOSTRO, L. A. Antibacterial activity of oregano, rosmarinus and thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beet meat balls. **Food Control**, v. 54, p. 188-199, 2015.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. **Alecrim (*Rosmarinus Officinalis* L.): Propriedades Antimicrobiana e Química do Óleo Essencial**. Boletim CEPPA, 19:193-210. 2008.

POZZO, D. M.; VIÉGAS, J.; SANTURIO, D. F.; ROSSATTO, L.; SOARES, H. I.; ALVES, H. A.; COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v. 23, p. 1-6, 2011.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T.; **CORANTES ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS**. Disponível em <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/865/744>> Ano, 2003. Acesso em: 28 de jul. 2019.

PROBIST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012, 112f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

RAHMAN, A.; KANG, S. Inhibition of foodborne pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of *Erigeron ramosus* (walt.) b.s.p. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 176–189, 2009.

RAVICHANDRAN, K. et al. Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. **Food Research International**. 50, 670–675, 2013.

RAZAFIMAMONJISON, G. et al. Bud, leaf and stem essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from Madagascar, Indonesia and Zanzibar. **International Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 224-233, jun. 2014.

REGUA-MANGIA, A. H., BEZERRA, R. M. P.; ESPARIS, C. M.; TEIXEIRA, L. M. *Escherichia coli* enterotoxigena (EAEC): Filotipagem e resistência a antimicrobianos em um enteropatógeno emergente. **Revista Patologia Tropical**, v. 38, n.1, 2009.

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

ROTA, M. C.; HERRERA, A.; MARTÍNEZ, R. M.; SOTOMAYOR, J. A.; JORDÁN, M. J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v.19, p.681-686, 2008.

ROY, K. et al. The use of a natural colorant based on betalain in the manufacture of sweet products in India. **International Journal of Food Science and Technology**, 39, 1087–1091. 2004.

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

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, D. C.; LISBOA, J. F.; FEITOSA, R. M.; SANTOS, Y. M. G.; ROCHA, A. P. T. Processamento e caracterização física e físico-química de blends de polpa de caju e beterraba. Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia – CONTECC. Fortaleza – CE. 2015.

SANTOS, F. A.; SALLES, J. R. J.; CHAGAS FILHO, E.; RABELO, R. N. Análise qualitativa das polpas congeladas de frutas produzidas pela SUFRUTS, MA. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 119, p.14-22, 2004.

SANTURIO, F. D. **Uso de óleos essenciais de especiarias para controle de coliformes em linguiça toscana**. 2015, 62f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia em Alimentos) –Programa de Pós-Graduação Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. Estabilidade de corantes e pigmentos de origem vegetal. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 3, n. 02, p. 6-24, 2013.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.2, p.264-292, 2005.

SHAH, M. A; DON BOSCO, S. J.; MIR, S. A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. **Meat Science**, v. 9, p. 21-33, 2014.

SHAHIDI, F. **Natural Antioxidants - Chemistry, Health Effects and Applications**. Champaign, Illinois: AOCS Press, 1997.

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

SHARIFIFAR F.; MOSHAFI H.; MANSOURI S. H.; KHODASHENAS M.; KHOSHNOODI M. 2007. *In vitro* evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. **Food Control** 18: 800-805.

SHYLAJA, M. R.; PETER, K. V. The functional role of herbal spices. In: Handbook of herbs and spices. V.2. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 360 p., 2004.

SILVA JR., E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. 7. ed. São Paulo: Varela, 2014.

SILVA, J. P. L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.30, p.136-141, 2013.

SILVA, L. R.; ALVES, R. E. Caracterização físico-química de frutos de “mandacaru”. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias Ambiental**, v. 7, n. 2, p. 199-205, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 2007

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

STAMFORD, T. L. et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. **Ciênc. Tecnol. Aliment. [online]**. vol.26, n.1, pp. 41-45. 2006.

STINTZING, F. C.; CARLE, R. Betalains – emerging prospects for food scientists. **Trends in Food Science and Technology**, n. 12, p. 514-525. 2007.

SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.19, p. 63-68, 1959.

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

TEIXEIRA, V. L. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Revista Instituto Laticínio Cândido Tostes**, v. 64, p. 12-21, 2009.

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**, São Leopoldo: Editora Unisinos, 216p. 1998.

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*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, p.1561-1568, 2002.

UPNMOOR, I. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Guaíba: Agropecuária. 56p. 2003.

VALLILO, M. I.; LAMARDO, L. C. A.; GABER-LOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E.; MORENO, P. R. H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.4, p. 805-810, 2006.

VASCONCELLOS, F. Após baixa, consumo de carne suína sobe 26% no Brasil, 2015. Disponível em: <<http://blogs.oglobo.globo.com/na-base-dos-dados/post/apos-baixa-consumo-de-carne-suina-sobe-26-no-brasil.html>>. Acesso em julho de 2019.

VIEIRA, F. P. R. **Efeitos *in vitro* e caracterização química dos óleos essenciais de *cinnamomum verum*, *syzygium aromaticum*, *origanum vulgare*, *thymus vulgaris* e seus componentes majoritários sobre *fasciola hepatica***. 2017. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

VITTI, M. C. D. **Aspectos fisiológicos, bioquímicos e microbiológicos em beterrabas minimamente processadas** – Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de plantas – Piracicaba, SP, 2003b.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Chemical composition and antioxidant and anti-*Listeria* activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9063-9070, 2010a.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVARES, J. A. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, n.3, p.526-531, 2008.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

WALSH, S. E.; MAILLARD J.-Y.; RUSSELL, A. D.; CATRENICH, C. E.; CHARBONNEAU, D. L.; BARTOLO, R. G. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 94, p. 240-247, 2003.

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

WICHIENTHOT, S.; JATUPORNPIPAT, M.; RASTALL. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 850-857, 2010.

YANG, W. Z.; AMETAJ, B. N.; BENCHAAR, C.; HE, M. L.; BEAUCHEMIN, K. A. Cinnamaldehyde in feedlot cattle diets: Intake, growth performance, carcass characteristics, and blood metabolites. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 3, p. 1082-1092, 2010.

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

Anexos

Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente consentimento livre e esclarecido, eu, _____, declaro que fui convidado a participar da pesquisa e que fui esclarecido, de forma clara e detalhada, dos objetivos e os procedimentos, sobre a participação voluntária e com direito a desistência de participar e retirar meu consentimento, não havendo riscos, sendo os resultados para fins acadêmicos e que somente assinarei o termo após ter sido esclarecido e concordar com a pesquisa, através de encontro individual e livre de qualquer forma de constrangimento e coerção.

PROJETO: Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) e extrato de beterraba (*Beta vulgaris* variedade *Early Wonder*).

OBJETIVOS: Avaliar o efeito da adição conjunta de óleo essencial de tomilho e de extrato de beterraba em embutido cárneo para redução parcial ou total de nitrato e nitrito de sódio e avaliar a aceitabilidade sob o ponto de vista sensorial dos produtos elaborados.

PROCEDIMENTOS: Fui informado(a) de que receberei amostras do produto embutido cárneo com adição de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba, para que eu avalie as características sensoriais do produto, incluindo a aplicação de ficha de intenção de compra com escala de 5 pontos, ficha hedônica com escala de 9 pontos e ficha de preferência do consumo.

RISCOS E POSSÍVEIS REAÇÕES: Fui informado(a) de que não existem riscos físicos no estudo, e caso eu sinta qualquer desconforto poderei desistir da participação na pesquisa em qualquer momento.

BENEFÍCIOS: O benefício de participar da pesquisa relaciona-se ao fato que os resultados serão incorporados ao conhecimento científico e posteriormente a situações de ensino-aprendizagem, além da elaboração de novos produtos. Os sais de cura adicionados intencionalmente em embutidos cárneos com o intuito de aumentar a vida útil dos mesmos são maléficos à saúde e a substituição destes por aditivos naturais é benéfica para a saúde dos consumidores.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA: A minha adesão à pesquisa ocorrerá de forma voluntária e nenhum tipo de penalidade será aplicada caso não seja do meu interesse participar. Salientamos ainda que não haverá custos na participação do estudo.

CONFIDENCIALIDADE: Estou ciente que a minha identidade permanecerá confidencial durante o estudo e que os dados coletados só serão utilizados para fins de pesquisa.

CONSENTIMENTO: Ciente das informações citadas anteriormente, eu concordo em participar da avaliação sensorial dos produtos elaborados no estudo.

ASSINATURA DO PARTICIPANTE DA PESQUISA:

DATA: ____ / ____ / 20____

ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL: _____

DATA: ____ / ____ / 20____

Assinado por:

Letícia Zarnott Lages

(Pesquisadora responsável)

Pesquisadores:

Letícia Zarnott Lages

(Contato – (53) 9 8437-0268 Email: leticiazarnott@hotmail.com)

Profª Drª Marcia Arocha Gularte

Profº. Drº. Eliezer Avila Gandra

Anexo B – Ficha de avaliação

FICHA DO TESTE DE PREFERÊNCIA COM ESCALA HEDÔNICA

Nome: _____ Data: ____/____/____

Gênero: () Masculino () Feminino

Faixa etária: () < de 15 a 21 () de 22 a 45 () de 46 a 65 () > de 66

INSTRUÇÕES: Você está recebendo duas amostras de embutido cárneo com adição de óleo de tomilho e extrato de beterraba. Avalie as amostras e circule o código da amostra que representa sua preferência.

Você está recebendo duas amostras de embutido cárneo com adição de óleo de tomilho e extrato de beterraba. Por favor avalie cada amostra e utilize a escala abaixo para indicar o quanto gostou ou desgostou de cada atributo do produto.

9 = gostei muitíssimo

8 = gostei muito

7 = gostei regularmente

6 = gostei ligeiramente

5 = indiferente

4 = desgostei ligeiramente

3 = desgostei regularmente

2 = desgostei muito

1 = desgostei muitíssimo

Amostra: _____

Amostra: _____

Aparência _____

Aparência _____

Cor _____

Cor _____

Odor _____

Odor _____

Textura _____

Textura _____

Sabor _____

Sabor _____

Impressão global _____

Impressão global _____

COMENTÁRIOS:

FICHA DE TESTE DE INTENÇÃO DE COMPRA

Por favor, avalie as amostras utilizando a escala abaixo para descrever qual seria sua intenção de compra em relação ao produto.

Amostra: _____

1. ☐ Certamente não compraria
2. ☐ Provavelmente não compraria
3. ☐ Talvez compraria
4. ☐ Provavelmente compraria
5. ☐ Certamente compraria

Amostra: _____

1. ☐ Certamente não compraria
2. ☐ Provavelmente não compraria
3. ☐ Talvez compraria
4. ☐ Provavelmente compraria
5. ☐ Certamente compraria

Comentários: _____

FICHA DE FREQUÊNCIA DO CONSUMO

Você consome embutido cárneo?

☐ sim ☐ não

Se sim, com que frequência você consome?

☐ todos os dias ☐ 3 a 4 x na semana
☐ 1 a 2 x na semana ☐ 1 a 2 x ao mês

Gostaria de consumir este embutido cárneo?

☐ sim ☐ não

Se sim, com que frequência você iria consumir este embutido cárneo?

☐ todos os dias ☐ 3 a 4 x na semana
☐ 1 a 2 x na semana ☐ consumiria raramente

Obrigada pela participação!