



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

**APLICAÇÃO DE PELÍCULA A BASE DE FÉCULA DE MANDIOCA
COM ADIÇÃO DE CARVACROL EM ABÓBORA MINIMAMENTE
PROCESSADA.**

ADRIELE RODRIGUES DOS SANTOS

MARINGÁ

2014

ADRIELE RODRIGUES DOS SANTOS

**APLICAÇÃO DE PELÍCULA A BASE DE FÉCULA DE MANDIOCA
COM ADIÇÃO DE CARVACROL EM ABÓBORA MINIMAMENTE
PROCESSADA.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

**MARINGÁ
2014**

ORIENTADORA
JANE MARTHA GRATON MIKCHA

BIOGRAFIA

Adrielle Rodrigues dos Santos nasceu em 1986, na cidade de Campo Mourão – PR. Graduiu-se em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Campo Mourão, no ano de 2008 e, especializou-se em Vigilância Sanitária de Alimentos pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná em 2009. Trabalhou em Laticínios durante quatro anos e, como professora contratada pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Campo Mourão, durante dois anos. Tem experiência nas áreas de microbiologia de alimentos, controle de qualidade na indústria de alimentos e tecnologia de leites e derivados.

Dedico

À minha família, em especial meus pais, Hildo e Cilêila, pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por estar sempre ao meu lado e conduzir meus passos.

À Universidade Estadual de Maringá, e ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À professora Dra. Jane Martha Graton Mikcha pela orientação, pela oportunidade e por compartilhar sua experiência.

À professora e amiga Dra. Maria Josiane Sereia por sempre acreditar na minha capacidade e me incentivar no meu aperfeiçoamento profissional.

Aos amigos e companheiros de laboratório Viviane Amaral, Alex Fiori, Natalia Yassunaka, Monica Lourenço e Patrícia Silva, pela amizade e por me ajudarem não só nas análises, como também por me escutarem e apoiarem nos momentos de angústia e desânimo.

Às amigas que construí nestes anos, que tornaram cada instante muito especial, Juliana Matias, Denise Pastore Lima, Lívia Benossi, Marcos Vieira.

Às técnicas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos Aparecida Donizete Bidóia e Eliana Guilhermeti que sempre me auxiliaram quando precisei, pelos ensinamentos e pela amizade.

Às minhas tias Guilhermina, Maria Aparecida e Célia pelo apoio na realização desse mestrado.

À minha irmã Gislêine pelo auxílio científico e ao meu cunhado Raphael por sempre me divertir nos momentos de crise.

À minha saudosa Avó Elza por sempre ter acreditado e apoiado minha jornada.

Um agradecimento especial aos meus pais Hildo e Cilêila pelo amor e carinho, pelo exemplo de vida, pelo esforço para que eu chegasse até aqui, pelos conselhos e pelo apoio a cada momento e de todas as formas possíveis.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“Hoje eu quero a rua cheia de sorrisos francos
De rostos serenos, de palavras soltas
Eu quero a rua toda parecendo louca
Com gente gritando e se abraçando ao sol
Hoje eu quero ver a bola da criança livre
Quero ver os sonhos todos nas janelas
Quero ver vocês andando por aí
Hoje eu vou pedir desculpas pelo que eu não disse
Eu até desculpo o que você falou...
Hoje eu quero que os boêmios gritem bem mais alto
Eu quero um carnaval no engarrafamento
E que dez mil estrelas vão riscando o céu...
Hoje eu vou fazer barulho pela madrugada
Rasgar a noite escura como um lampião...
Hoje eu quero que os poetas dancem pela rua
Pra escrever a música sem pretensão
Eu quero que as buzinas toquem flauta-doce
E que triunfe a força da imaginação.”

Oswaldo Montenegro – Sem Mandamentos.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está apresentada na forma de um artigo científico, redigido de acordo com normas de publicação do periódico Food Control (ISSN 0956-7135).

Adrielle R. Santos, Viviane C. S. Amaral, Alex Fiori, Natália Yassunaka, Patrícia R. Santos, Alessandra B. Ribeiro, Jane M. G. Mikcha. Aplicação de película a base de fécula de mandioca com adição de carvacrol em abóbora minimamente processada.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION. Nowadays there is an increase in the consumption of minimally processed vegetables (MPV) due to be a product that keeps the freshness of the vegetables in nature combined with the convenience and good nutritional quality. However the increase in consumption along with the minimal processing techniques of MPV, led to an increase occurrence of pathogenic bacteria such as *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Aeromonas hydrophila*, besides the indicators of quality and hygiene processing, such as coliforms, molds and yeasts. Due to this microbial contamination the use of essential oils (EO) of plants and its constituents have been an alternative because they have a broad antimicrobial effect and are defined as GRAS (Generally Recognized as Safe) by the Food and Drug Administration (FDA). The carvacrol, component of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils, has been shown to be active against a broad spectrum of microorganisms. A promising trend in the use of EO and its constituents in foods is their incorporation into edible films and coatings, controlling pathogens and extending the shelf life of perishable products such as MPV.

AIMS. The objective of this study was investigate the antimicrobial effect of the carvacrol incorporated into edible film applied in minimally processed pumpkin (MPP), as well as its interference on physical and chemical characteristics.

MATERIAL AND METHODS. To evaluate the *in vitro* antimicrobial activity, the micro broth dilution method was used according to the protocol established by the document M100-S22/2012, Clinical and Laboratory Standards Institute was used. The bacterial isolates tested were: *E. coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *A. hydrophila* ATCC 7966 and *S. aureus* ATCC 25923. The edible films were prepared using a suspension at 3 % of cassava starch. The incorporation of carvacrol was taken at concentrations of 312 and 625 mg / mL. Ripe pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch). were minimally processed according to good manufacturing practices. After the minimum processing, pumpkins were immersed in the coating solution of cassava starch and in the coating solution added antimicrobial substance. Two controls (C1 and C2) and two treatments (T1 and T2) were used, which consisted of pumpkin minimally processed (C1); pumpkin coated with cassava starch film without the addition of carvacrol (C2); pumpkin coated with film added to carvacrol at 312 mg / mL (T1) and pumpkin coated with film added to carvacrol at 625 mg / mL (T2). The control and treatment groups were evaluated for survival of bacteria experimentally inoculated and bacteria that naturally occur in MPV, besides the physical-chemical analyzes, for seven days of storage under refrigeration. All microbiological and physico-chemical analyzes were performed according to the official method. Analyses were made in duplicate with two replicates, and the results were expressed as mean and standard deviation. The average results were submitted to analysis of variance (ANOVA) with 5% level of significance, and means were compared by Tukey test.

RESULTS AND DISCUSSION. The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of carvacrol for *S. Typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* ATCC 25922, *A. hydrophila* ATCC 7966 and *S. aureus* ATCC 25923, was 312 mg / mL. The application of the carvacrol at 625 mg / mL (T2) in minimally processed pumpkin completely inhibited the bacterial growth at all times evaluated. When carvacrol was used at 312 mg / mL (T1), the counts of *E. coli* and *S. Typhimurium* were reduced almost 5 log CFU / g at the seventh day. The counts of *A. hydrophila* were reduced about 8 log CFU / g and *S. aureus* approximately 2 log CFU / g at the same period. The evaluation of bacteria naturally present in MPV, Coliforms at 35 °C and 45 °C, presented values <3 MPN / g in both treatments, in all days of shelf life. The treatments with the addition of 312 mg / mL and 625 mg / mL of carvacrol presented a significant reduction ($p < 0.05$) in psychrotrophic count, compared to controls C1 and C2. The counts of yeasts and molds also showed a significant reduction ($p < 0.05$) during all days of storage, when compared to treatments with the addition of carvacrol and controls. In the last day, that group of microorganisms was not detected in both treatments. Regarding to physico-chemical parameters, treatments (T1 and T2) and controls (C1 and C2) presented an increase in the values of total tritrate acidity during storage, having significant difference ($p < 0.05$) among treatments T1 and T2 in relation to controls C1 and C2. For pH values there was a significant difference ($p < 0.05$) among T1 and T2 to C1 control at the first and last day of storage. In general there was no significant difference ($p < 0.05$) for the content of Soluble Solids between treatments and controls, showing values ranging from 4.9 to 5.2 °Brix, in the last day of shelf life. In the weight loss test there was a significant difference between treatments and controls. Treatments with carvacrol presented a significant reduction in weight loss (until to 3.73% on the last day of storage, between T2 and C1).

CONCLUSIONS. The results presented in this study showed the efficacy of carvacrol in inhibiting pathogenic bacteria in vitro, in the MIC and MBC assays, as well as in the application on MPP, reducing the count of both pathogenic and spoilage microorganisms without influencing the physico-chemical parameters, reinforcing the idea that the incorporation of compounds with antimicrobial action in edible films for application in MPP is an alternative to improve the microbiological safety and quality of these products.

Key words: Minimally Processed Vegetables; Antimicrobial activity; Phytochemicals; Microbiological Quality.

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO. Atualmente há um aumento no consumo de vegetais minimamente processados (VMP) por ser um produto que mantém o frescor dos vegetais *in natura* aliados à conveniência, e boa qualidade nutricional. Entretanto o aumento do consumo juntamente com as técnicas de processamento mínimo dos VMP, fez com que aumentasse ocorrência de bactérias patogênicas como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Aeromonas hydrophila*, além de microrganismos indicadores de qualidade e higiene de processamento, como coliformes e bolores e leveduras. Devido o uso de óleos essenciais (OE) de plantas e seus constituintes apresentam uma alternativa, pois possuem um amplo efeito antimicrobiano e são definidos como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) pela Food and Drug Administration (FDA). O carvacrol, componente dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*, tem mostrado ser ativo contra um amplo espectro de microrganismos. Uma tendência promissora no uso de OE e seus constituintes em alimentos é sua incorporação em coberturas comestíveis, auxiliando no controle de patógenos e estendendo a vida de prateleira de produtos perecíveis, como os VMP.

OBJETIVOS. Investigar o efeito da aplicação de cobertura comestível à base de fécula de mandioca e carvacrol na sobrevivência de microrganismos patogênicos, da microflora autóctone, bem como no pH, acidez titulável total, sólidos solúveis e perda de massa de abóbora minimamente processada (AMP).

MATERIAL E METODOS. Para avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* foi utilizado o método de micro diluição em caldo de acordo com o protocolo estabelecido pelo documento M100-S22/2012, Clinical and Laboratory Standards Institute. Os isolados bacterianos testados foram: *E. coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *A. hydrophila* ATCC 7966 e *S. aureus* ATCC 25923. Para a cobertura comestível foi preparada uma solução a 3% de fécula de mandioca. A incorporação do carvacrol foi feita nas concentrações de 312 e 625 µg / mL. As abóboras maduras (*Cucurbita moschata* Duch.) foram minimamente processadas seguindo as boas práticas de fabricação. Após o processamento mínimo as abóboras foram imersas na solução de revestimento de fécula de mandioca e na solução de fécula adicionada da substância antimicrobiana. Foram feitos dois controles (C1 e C2) e dois tratamentos (T1 e T2), que consistiram em: abóbora minimamente processada (C1); abóbora revestida com cobertura comestível de fécula de mandioca sem a adição do carvacrol (C2); abóbora revestida com cobertura comestível adicionada do carvacrol na concentração de 312 µg / mL (T1) e; abóbora revestida com cobertura comestível adicionada do carvacrol na concentração de 625 µg / mL (T2). Os grupos controle e tratamento foram armazenados em refrigerador (4 °C ±2) por sete dias. Avaliou-se a sobrevivência de bactérias experimentalmente inoculadas e da microflora autóctone, além das análises de pH, acidez titulável total, sólidos solúveis e perda de massa, nos dias 0, 3 e 7 do armazenamento. Todas as análises microbiológicas e físico-químicas foram feitas conforme metodologia oficial. As análises foram feitas em duplicata com

duas repetições, e os resultados expressos como média e desvio padrão. Os resultados médios foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de 5% de significância, e as médias comparadas pelo Teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do carvacrol para *S. Typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* ATCC 25922, *A. hydrophila* ATCC 7966 e *S. aureus* ATCC 25923, foi 312 µg / mL. A aplicação de carvacrol na abóbora minimamente processada na concentração de 625 µg / mL (T2) inibiu completamente o desenvolvimento bacteriano em todos os tempos avaliados. Com relação ao T1 (312 µg / mL), as contagens de *E. coli* e *S. Typhimurium* foram reduzidas em até 5 log UFC / g no sétimo dia. Para *A. hydrophila* houve uma redução de aproximadamente 8 log UFC / g e de aproximadamente 2 log de UFC / g para *S. aureus* no mesmo período. Para o grupo Coliformes a 35 °C e 45 °C, nos tratamentos T1 e T2, foi observado valores < 3 NMP / g, em todos os dias da vida de prateleira. Os tratamentos com adição de 312 µg / mL e 625 µg / mL de carvacrol, respectivamente, proporcionaram redução significativa ($p < 0,05$) na contagem de psicotróficos, em relação aos controles C1 e C2. A contagem de bolores e leveduras também apresentou redução significativa ($p < 0,05$), em todos os dias do armazenamento, entre os tratamentos com adição de carvacrol e os controles, sendo que, no último dia, este grupo de microrganismos não foi detectado em nenhum dos dois tratamentos. Com relação aos parâmetros físico-químicos, foi observado aumento nos valores de Acidez Titulável Total durante o armazenamento, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos T1 e T2 com relação aos controles C1 e C2. Para os valores de pH houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos T1 e T2 e o controle C1 no primeiro e sétimo dia do armazenamento. De maneira geral não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o conteúdo de Sólidos Solúveis entre os tratamentos e os controles, apresentando valores entre 4,9 – 5,2 °Brix, no último dia da vida de prateleira. Para a perda de os tratamentos com carvacrol apresentaram redução significativa de até 3,73% no ultimo dia de armazenamento, entre T2 e C1.

CONCLUSÕES. Os resultados apresentados neste estudo mostraram a eficácia do carvacrol na inibição de bactérias patogênicas *in vitro*, bem como na aplicação em AMP, reduzindo também a contagem da microflora autóctone, os parâmetros físico-químicos também foram influenciados pelo carvacrol, reforçando a ideia que a incorporação de compostos com ação antimicrobiana em películas comestíveis para aplicação em AMP é uma alternativa para melhorar a segurança microbiológica e qualidade desses produtos.

Palavras chaves: Vegetais minimamente processados; Atividade antimicrobiana; Fitocompostos; Qualidade microbiológica.

Aplicação de cobertura comestível à base de fécula de mandioca e carvacrol em abóbora minimamente processada

Adrielle R. Santos^a, Viviane C. S. Amaral^b, Natália Yassunaka^a, Alex Fiori^b, Patrícia R. Santos^b, Alessandra B. Ribeiro^a, Jane M. G. Mikcha^{c*}.

^aCentro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

^bCentro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

^cDepartamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

*Autor correspondente: Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, Maringá, PR, Brasil. Tel./Fax: +55 44 3011-4959.

Endereço de e-mail: jmgmikcha@uem.br

Resumo

Este estudo avaliou o efeito da aplicação de cobertura comestível de fécula de mandioca e carvacrol em abóbora minimamente processada (AMP). Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do carvacrol frente a cepas ATCC de *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus*. Foram feitos dois controles (C1 e C2) e dois tratamentos (T1 e T2), que consistiram em: abóbora minimamente processada (C1); abóbora revestida com a película de fécula de mandioca sem a adição do carvacrol (C2); abóbora revestida com a película adicionada do carvacrol na concentração de 312 µg / mL (T1) e; abóbora revestida com a película adicionada do carvacrol na concentração de 625 µg / mL (T2). Os grupos controle e tratamento foram avaliados quanto à sobrevivência de bactérias experimentalmente inoculadas e de bactérias que ocorrem naturalmente em VMP, além das análises de acidez titulável total, pH, perda de massa e sólidos solúveis, durante sete dias de armazenamento sob refrigeração. A CIM e CBM do carvacrol foi de 312 µg / mL. O carvacrol a 312 µg / mL reduziu significativamente ($p < 0,05$) as bactérias experimentalmente inoculadas em AMP, e na concentração de 625 µg / mL, inibiu completamente todos os isolados. Para a microflora autóctone, a concentração de 312 µg / mL mostrou uma redução significativa, sendo ainda mais eficaz na concentração de 625 µg / mL. As análises físico-químicas

mostraram que a adição de carvacrol influenciou a acidez titulável, pH, sólidos solúveis e perda de peso. A aplicação de cobertura comestível de fécula de mandioca comestível com carvacrol pode constituir uma interessante abordagem para melhorar a segurança microbiológica e qualidade da abóbora minimamente processadas.

Highlights

- O carvacrol foi utilizado para inibir a microbiota em AMP.
- O carvacrol mostrou-se eficiente na redução de bactérias patogênicas em AMP.
- O carvacrol reduziu as contagens das bactérias autóctones.
- O composto influenciou os parâmetros físico-químicos analisados.

Palavras-chave: Vegetais minimamente processados; Atividade antimicrobiana; Fitocompostos; Qualidade microbiológica.

1. Introdução

Atualmente os consumidores estão mudando seus hábitos alimentares pensando principalmente na prevenção de doenças e bem estar físico. Neste sentido os vegetais minimamente processados (VMP) se destacam devido às suas características de conveniência, frescor e boa qualidade nutricional, ganhando a aceitação dos consumidores (Sousa et al., 2012; Zhou et al., 2004).

O aumento do consumo juntamente com as técnicas de processamento mínimo dos VMP, fez com que aumentasse também sua associação a surtos de doenças transmitidas por alimentos (Little & Gillespie, 2008; Sant'ana, Landgraf, Destro & Franco, 2011). Estudos têm determinado a ocorrência de bactérias patogênicas como *Salmonella* spp. (Giusti et al., 2010; Gorski et al., 2011; Sant'ana, Landgraf, Destro & Franco, 2011), *Escherichia coli* (Bohaychuk et al., 2009; Rúgeles, Bai, Martínez, Vanegas & Gómez-Duarte, 2010) e *Staphylococcus aureus* (Seo, Jang & Moon, 2010) em diferentes tipos de VMP. Estes alimentos também podem abrigar microrganismos psicrotróficos como *Aeromonas hydrophila* e *Listeria monocytogenes* (Cordano & Jacquet, 2009; Maistro, Miya, Sant'ana & Pereira, 2012; Sousa et al., 2012), além de microrganismos indicadores de qualidade e higiene de processamento, como coliformes e bolores e leveduras (Maistro, Miya, Sant'ana & Pereira, 2012).

Devido a esta contaminação microbiana o uso de óleos essenciais de plantas e seus constituintes apresentam uma alternativa, pois possuem um amplo efeito antimicrobiano, não apresentam toxicidade para o ser humano e proporcionam uma melhor qualidade sensorial (Molinos et al., 2009). Além disso, estes agentes são definidos como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) pela FDA (Food and Drug Administration) (Guarda, Rubilar, Miltz, & Galotto, 2011), aumentando assim, o interesse na aplicação desses compostos em VMP (Sousa et al., 2012).

O carvacrol, componente dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*, mostrou-se ativo contra vários microrganismos, entre eles, *Escherichia coli* (Baskaran et al, 2013; Guarda, Rubilar, Miltz & Galotto, 2011; Rivas et al, 2010), *Salmonella* spp. (Inamuco et al, 2012; Luz et al., 2012; Yun, Fan & Li, 2013), *Staphylococcus aureus* (Luz et al., 2013; Guarda, Rubilar, Miltz & Galotto, 2011; Oliveira, Stamforda, Neto & Souza, 2010) e *Aeromonas hydrophila* (Sousa et al., 2012; Ye et al., 2013).

Uma tendência promissora no uso de óleos essenciais e seus constituintes em alimentos é sua incorporação em coberturas comestíveis e revestimentos comestíveis, auxiliando no controle de patógenos e estendendo a vida de prateleira de produtos perecíveis, como os VMP (Iturriaga, Olabarrieta & Marañón, 2012; Jang, Shin, & Song, 2011).

Neste estudo foi investigado o efeito antimicrobiano do carvacrol incorporado em cobertura comestível aplicada em abóbora minimamente processada, bem como sua interferência nos parâmetros de acidez titulável total, pH, perda de massa e sólidos solúveis.

2. Materiais e Métodos

2.1 Isolados bacterianos e agentes antimicrobianos.

O estudo foi conduzido com isolados de *E. coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *A. hydrophila* ATCC 7966 e *S. aureus* ATCC 25923, estocados em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) com 20% de glicerol a -20 °C, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá.

O carvacrol (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, EUA) foi inicialmente diluído em etanol absoluto numa concentração de 50.000 µg / mL e subsequentemente diluído em caldo Mueller Hinton (MHB) (CLSI, 2012).

2.2 Determinação *in vitro* da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do carvacrol.

Para avaliar a atividade antimicrobiana foi utilizado o método de micro diluição em caldo de acordo com o protocolo estabelecido pelo documento M100-S22/2012, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

E. coli ATCC 25922 foi cultivada em Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Difco ®) a 35 °C por 24 horas, *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *A. hydrophila* ATCC 7966 em Agar Hektoen Entérico (Difco ®) a 35 °C por 24 horas e 28 °C por 24 horas, respectivamente, e *S. aureus* ATCC 25923 em Agar Sal Manitol (Difco ®) a 35 °C por 48 horas. O inóculo foi preparado transferindo-se quatro a seis colônias de cada microrganismo para tubos contendo 2 mL de caldo MHB e incubando-se a 35 °C por 4 a 6 horas. A suspensão obtida foi padronizada em solução salina 0,85% usando a escala de McFarland no intervalo de 0,5, que corresponde a 5×10^8 UFC/ mL. A suspensão foi diluída 1:20, para então inocular 10 µL em cada orifício da microplaca de 96 poços.

Para a determinação da CIM, foram feitas diluições seriadas (1:2) do carvacrol em 100 µL de caldo MHB, com uma concentração inicial de 5000 µg / mL e final de 19 µg / mL.

As microplacas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas. Após a incubação, a densidade óptica a 620 nm foi determinada pelo leitor de Elisa (ASYS perito Plus). Foram feitos três controles, um contendo MHB e os isolados bacterianos, o segundo contendo MHB, etanol absoluto e os isolados bacterianos e um terceiro controle contendo MHB e carvacrol na concentração de 5000 µg / mL.

Ampicilina (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, EUA) foi utilizada como droga de referência com concentrações entre 0,5 a 128 mg / mL contra *E. coli* ATCC 25922.

Para a determinação da CBM, uma alíquota de 10 µl de cada poço, onde não foi observado crescimento no ensaio de CIM, foi transferida para os mesmos meios de cultura usados para o cultivo dos isolados bacterianos e incubados em estufa

bacteriológica pelo tempo e temperatura específicos de cada microrganismo. Cada teste foi realizado em triplicata com três repetições.

2.3 Preparação da cobertura comestível e incorporação do carvacrol

O preparo da cobertura comestível à base de fécula de mandioca nativa seguiu metodologia descrita por Souza et al. (2009). A fécula foi pesada e diluída em água destilada na concentração de 3:97 (m/v) e homogeneizada até completa dissolução. A solução foi aquecida em microondas à temperatura ± 70 °C, até ocorrer a gelatinização observada pela perda da birrefringência do meio. Depois de arrefecer a temperatura ambiente, o carvacrol foi adicionado nas concentrações de 312 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (CIM) e 625 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (2CIM).

2.4 Preparação da abóbora minimamente processada

As abóboras maduras (*Cucurbita moschata* Duch.) apresentando o mesmo grau de maturação e ausência de danos mecânicos foram adquiridas em mercados locais e processadas seguindo a metodologia descrita por Sasaki et al. (2006) e as Boas Práticas de Fabricação (BPF).

Após serem selecionados, os frutos foram lavados com bucha e detergente neutro em água corrente e, em seguida, imersos em água fria contendo 200 ppm de cloro (solução comercial de cloro ativo 2%) por 10 minutos. O processamento ocorreu manualmente visando obter cubos com aproximadamente 3 cm de arestas, livres de casca, sementes e parte esponjosa. O produto, depois de sanitizado com solução de cloro a 200 ppm por 10 minutos, foi enxaguado em solução de cloro a 2 ppm e escorrido por cerca de 2 minutos e branqueado.

2.5 Revestimento da abóbora minimamente processada com cobertura comestível

Para aplicação de fécula de mandioca os pedaços de AMP foram imersos na solução de revestimento por um minuto. Depois deste tempo os frutos permaneceram sobre bandejas, em ambiente asséptico, para escorrer o excesso da cobertura. Cada tratamento experimental sofreu apenas um ciclo de revestimento. Para embalar o produto utilizou-se bandeja de poliestireno expandido com 3 mm de espessura e

dimensões de 4, 15 e 21 cm (altura, largura e comprimento), recoberta com filme de policloreto de vinila (PVC) esticável com espessura de 0,02 mm, com peso médio de 300 g de produto. As bandejas foram armazenadas em refrigerador à temperatura de 4 °C (± 2) por sete dias.

O fluxograma dos controles e tratamentos, bem como a estocagem e realização das análises esta descrito na Figura 1.

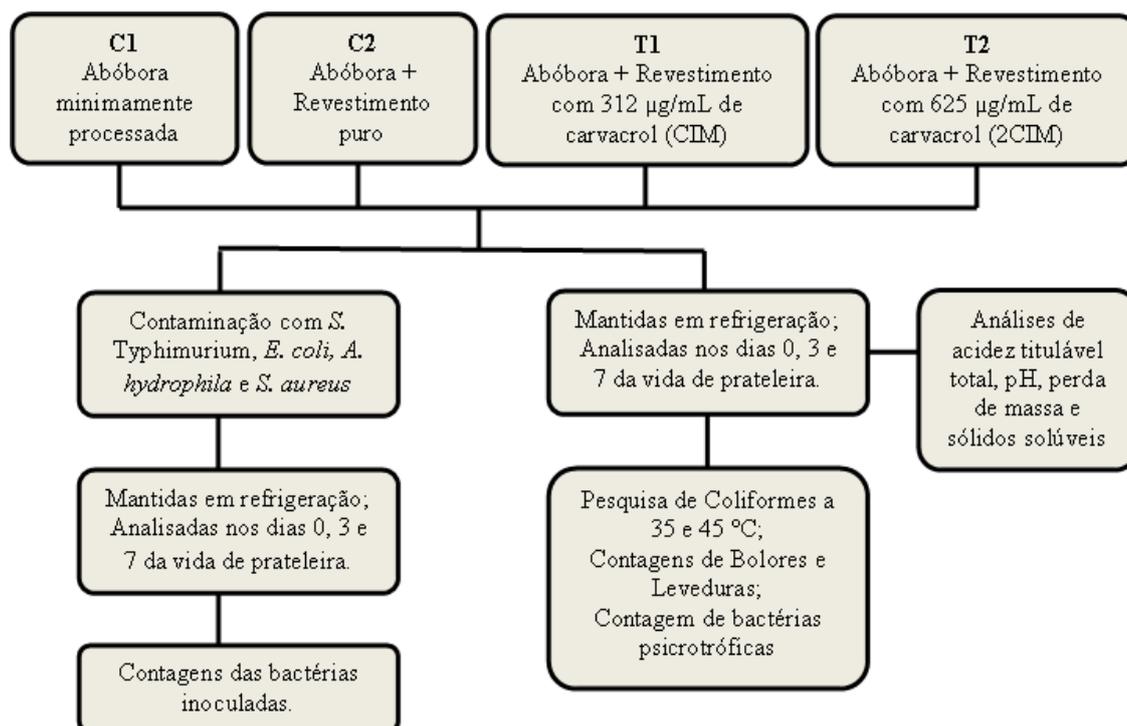


Figura 1 - Fluxograma dos controles e tratamentos, estocagem e realização das análises.

Foram feitos dois controles (C1 e C2) e dois tratamentos (T1 e T2). O primeiro controle (C1) consistiu na abóbora minimamente processada. O segundo controle (C2) foi feito com a abóbora revestida com a cobertura comestível de fécula de mandioca sem a adição do carvacrol; o primeiro tratamento (T1) foi feito com abóbora revestida com a cobertura comestível adicionada do carvacrol na concentração de 312 µg / mL (CIM); e o segundo tratamento (T2) foi feito com a abóbora revestida com a cobertura comestível adicionada do carvacrol na concentração de 625 µg / mL (2CIM).

Os grupos experimentais foram avaliados quanto à sobrevivência de bactérias experimentalmente inoculadas e de microrganismos autóctones de VMP, além das análises de acidez titulável total, pH, perda de massa e sólidos solúveis.

Para avaliar a sobrevivência de bactérias experimentalmente inoculadas os grupos experimentais foram contaminados com *E. coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *A. hydrophila* ATCC 7966 e *S. aureus* ATCC 25923.

A suspensão bacteriana para contaminação experimental da abóbora foi preparada conforme descrito no item 2.2. Os pedaços de abóbora foram imersos em cada uma das quatro suspensões bacterianas por cerca de 10 minutos.

A abóbora minimamente processada, sem contaminação e sem a adição da cobertura comestível foi submetida às análises obrigatórias pela RDC 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2001) além das contagens das bactérias inoculadas no tempo zero para garantir que não haveria nenhuma contaminação prévia da amostra.

2.6 Efeito do carvacrol na sobrevivência de bactérias experimentalmente inoculadas em abóbora minimamente processada revestida com cobertura comestível a base de fécula de mandioca

As contagens das bactérias inoculadas realizaram-se a partir de 25 g da AMP diluída em 225 mL de água peptonada tamponada (1g / L). As diluições decimais subsequentes foram realizadas em tubos contendo 9 mL do mesmo diluente até a diluição 10^{-7} . Para cada diluição, 0,1 mL foram semeados em superfície em Agar Hektoen para *Salmonella* spp. e *A. hydrophila*, Agar EMB para *E. coli* e Agar Baird Parker para *S. aureus* a incubação deu-se em estufa bacteriológica no tempo e temperatura específicos para cada bactéria. Os resultados foram expressos em log de UFC / g (Sant'Ana, Barbosa, Destro, Landgraf & Franco, 2012; Downes & Ito, 2001).

2.7 Efeito do carvacrol na sobrevivência da microbiota autóctone de vegetais minimamente processados.

As amostras foram submetidas à determinação de Coliformes a 35 e 45 °C, enumeração de bolores e leveduras e bactérias psicotróficas, seguindo a metodologia descrita por Downes & Ito (2001).

Para a pesquisa de coliformes a 35 °C e 45 °C empregou-se a técnica de Número Mais Provável (NMP), utilizando três séries de três tubos de caldo Lauril Sulfato

Triptose incubados a 35 °C por 48 horas. Os tubos que apresentaram produção de gás foram semeados em caldo lactosado bile verde brilhante, e incubados a 35 °C por 48 horas, e em caldo EC, incubados a 45 °C por 48 horas. Os resultados foram expressos em NMP / g.

Para a enumeração de bactérias psicrófilas utilizou-se a técnica de semeadura em profundidade em Plate Count Agar (PCA) incubado a 6 °C por 7 dias. Para a contagem de bolores e leveduras, foi utilizada a técnica de semeadura em superfície em Agar Dicloran Glicerol (DG18) e as placas incubadas a 25 °C por 5 dias. Os resultados foram expressos em log de UFC / g.

2.8 Análises Físico-Químicas

Aos 0, 3 e 7 dias da vida de prateleira as amostras de AMP foram analisadas quanto a perda de massa, teores de sólidos solúveis, acidez titulável total e pH, seguindo a metodologia recomendada pela AOAC (1992).

A perda de massa foi obtida pela pesagem da abóbora minimamente processada em balança analítica, considerando a massa inicial de cada amostra, com os resultados expressos em percentagem.

O teor de sólidos solúveis (SS) foi realizado através de leitura refratométrica, do suco proveniente da trituração da amostra, em graus Brix (°Brix).

A acidez titulável total (ATT) foi determinada em três amostras da titulação de 10 gramas de polpa homogeneizada e diluída para 100 mL de água destilada, com solução padronizada de hidróxido de sódio a 0,1 N, tendo como indicador do ponto de viragem a fenolftaleína, com os resultados expressos em porcentagem.

O potencial hidrogeniônico (pH) foi determinado na polpa triturada da abóbora utilizando-se um potenciômetro digital.

2.9 Análise Estatística

As análises foram realizadas em duplicata com duas repetições, e os resultados expressos como média e desvio padrão. Os resultados médios foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de 5% de significância, e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, através do programa estatístico Graphpad Prism 5.01.

3. Resultados e Discussão

3.1 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

A CIM e a CBM foi de 312 µg / mL para *S. Typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* ATCC 25922, *A. hydrophila* ATCC 7966 e *S. aureus* ATCC 25923.

Os resultados obtidos concordam com os dados apresentados por outros autores que verificaram a eficiência do carvacrol, em diferentes concentrações, na inibição do crescimento de *S. Typhimurium*, *E. coli*, *A. hydrophila* e *S. aureus* (Guarda, Rubilar, Miltz & Galotto, 2011; Luz et al., 2012; Luz et al., 2013; Oliveira, Stamforda, Neto, & Souza, 2010; Rivas et al., 2010; Sousa et al., 2012; Ye et al., 2013; Yun, Fan & Li, 2013).

Burt (2004) e Hyldgaard, Mygind & Meye (2012) relatam que a ação antimicrobiana do carvacrol se deve à sua interação com a membrana celular das bactérias causando aumento da fluidez com conseqüente aumento da permeabilidade permitindo o extravazamento de íons e de ATP.

3.2 Efeito da aplicação de cobertura comestível a base de fécula de mandioca com adição de carvacrol na sobrevivência de bactérias inoculadas em abóbora minimamente processada.

O efeito da cobertura comestível adicionada de carvacrol aplicada em abóbora minimamente processada previamente contaminada com *E. coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *A. hydrophila* ATCC 7966 e *S. aureus* ATCC 25923 nos diferentes tempos de vida de prateleira está demonstrado na Tabela 1.

De maneira geral os controles C1 e C2 apresentaram uma elevada multiplicação durante os sete dias de armazenamento, mesmo sob refrigeração. *E. coli* e *S. Typhimurium* atingiram valores de aproximadamente 7 log UFC / g no sétimo dia. Este resultado é preocupante, pois estes valores são maiores que a dose infectante para *E. coli*, que pode variar de $10 - 10^{12}$, dependendo do grupo patogênico (Feng, 2012) e para *Salmonella* spp., cuja dose infectante pode ser de uma célula, dependendo das diferenças entre os sorotipos, bem como da idade e estado imune do hospedeiro (Hammack, 2012). Segundo Lampel (2012) não existe uma concordância sobre a dose infectante para *A. hydrophila*, entretanto tem sido relatados surtos com contagens de

cerca de 10^7 UFC / g de alimento, contagem evidenciada no C1 e C2 já no terceiro dia de armazenamento. As contagens de *S. aureus* aumentaram aproximadamente 1 log UFC / g durante o período de armazenamento, e alcançaram valores inferiores ao necessário para a produção de toxinas, que é de 10^6 UFC / g (Hait, 2012).

Os resultados obtidos para os quatro isolados bacterianos testados mostram que os tratamentos T1 e T2 apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), em relação aos controles C1 e C2, em todos os dias da vida de prateleira. A aplicação de carvacrol na abóbora minimamente processada na concentração de 625 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (T2) inibiu completamente o desenvolvimento bacteriano em todos os tempos avaliados. Com relação ao T1 (312 $\mu\text{g} / \text{mL}$), as contagens de *E. coli* e *S. Typhimurium* foram reduzidas em até 5 log UFC / g no sétimo dia. Para *A. hydrophila* houve uma redução de aproximadamente 8 log UFC / g e de aproximadamente 2 log de UFC / g para *S. aureus* no mesmo período. Estes resultados mostram a eficiência do carvacrol já na CIM (312 $\mu\text{g} / \text{mL}$) até mesmo quando as contagens bacterianas dos controles foram elevadas.

Baskaran et al. (2013) aplicando diferentes concentrações de carvacrol na água de lavagem de maçãs, verificaram um crescimento de *E. coli* O157:H7 menor do que 1 log de UFC / maçã. Murial-Galet et al. (2012) também observaram redução na contagem de *S. enterica* ATCC 13076 em saladas embaladas tratadas com carvacrol. Souza et al. (2012) encontraram contagens < 2 log de UFC / g em vegetais frescos previamente inoculados com *A. hydrophila*, relatando que o carvacrol apresentou melhor resultado entre as substâncias testadas.

Ao serem avaliadas as diferentes concentrações de carvacrol, as contagens de *S. aureus* e *S. Typhimurium* apresentaram diferença significativa entre os tratamentos T1 e T2 no terceiro e sétimo a vida de prateleira e, *E. coli* em todos os dias do armazenamento. Estes resultados evidenciam o que vários autores já observaram, que quanto maior a concentração de carvacrol maior o efeito antimicrobiano no alimento (Baskaran et al., 2013, Kuorwel, Cran, Sonneveld, Miltz, Staphen, & Bigger, 2011, Murial-Galet et al., 2012).

Para *A. hydrophila* não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos T1 e T2. Azeredo et al. (2011) também reportaram que não foi necessária uma concentração maior do que a CIM de óleo essencial de orégano e alecrim para inibir *A. hydrophila* em vegetais frescos (alface, beterraba e rúcula). Durante o período de armazenamento *A. hydrophila* foi a bactéria que apresentou maiores contagens, o que pode ser explicado pela sua característica psicrotrófila, no entanto também foi a que

apresentou maior redução nas contagens após o tratamento com o carvacrol. Segundo Burt (2004), *A. hydrophila* é considerada como uma das bactérias mais sensíveis aos óleos essenciais.

A alta redução das contagens bacterianas observadas no presente trabalho também pode ter relação com a forma de aplicação do carvacrol no alimento, uma vez que a incorporação de compostos antimicrobianos em coberturas comestíveis provoca uma liberação gradual a partir da matriz polimérica para a superfície do alimento. Dessa forma, a concentração inibitória mínima (CIM) necessária para a inibição do crescimento microbiano pode ser mantida durante um tempo mais longo, ao contrário, quando a incorporação é feita diretamente no alimento, esta pode ser menos eficaz, pois a migração é mais rápida e em grandes quantidades (Hyldgaard, Mygind & Meyer, 2012; Sangsuwan, Rattanapanone, Auras, Harte, 2009). Por outro lado Burt (2004) acredita que em vegetais a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é beneficiada pela diminuição da temperatura de estocagem, bem como pela diminuição do pH, além de os vegetais terem um baixo teor de gordura.

As análises microbiológicas realizadas na abóbora minimamente processada sem contaminação e sem cobertura comestível, para confirmação da inocuidade da amostra, demonstraram ausência de *Salmonella* spp. em 25 g, contagens < 2 log UFC / g para Estafilococos coagulase positiva, *Aeromonas* spp. e *E. coli* e, < 3 NMP/g de Coliformes a 35 e 45 °C.

3.3 Efeito da aplicação de cobertura comestível a base de fécula de mandioca com adição de carvacrol no desenvolvimento de bactérias naturalmente presentes em abóbora minimamente processada.

O efeito da cobertura comestível adicionada de carvacrol aplicada em abóbora minimamente processada no desenvolvimento de Coliformes a 35 °C e 45 °C, bactérias psicotróficas e bolores e leveduras nos diferentes tempos de vida de prateleira está demonstrado na Tabela 2.

Os resultados para Coliformes a 35 °C e 45 °C, nos tratamentos T1 e T2, foram < 3 NMP / g, em todos os dias da vida de prateleira. Já os controles C1 e C2, apresentaram valores de até 1100 NMP / g, para coliformes a 35 °C, no sétimo dia da vida de prateleira. Esses valores podem ser devido à multiplicação de bactérias deste grupo inicialmente presentes na AMP ou à contaminação durante o armazenamento

visto que o tipo de embalagem utilizada pode permitir que isso ocorra. Os resultados evidenciam a eficiência do carvacrol frente aos coliformes. No Brasil a pesquisa de coliformes a 35 °C em VMP não é exigida pela legislação (BRASIL, 2001), porém esta se faz relevante uma vez que este grupo de bactérias são indicadores das condições higiênicas do processo, evidenciando práticas de higienização e sanitização aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos (Hislop & Phan, 2007). Emiroğlu, Yemiş, Coşkun & Candoğan (2010) observaram uma redução na contagem de coliformes de 1,6 log UFC / g, em coberturas comestíveis de soja adicionados de óleos essenciais de *Oreganum heracleoticum* L.

Os tratamentos T1 e T2, com adição de 312 µg / mL e 625 µg / mL de carvacrol, respectivamente, apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) na contagem de bactérias psicotróficas, em relação aos controles C1 e C2, nos dias 3 e 7 do armazenamento. Foi evidenciada uma diminuição de até 1,9 log de UFC / g entre o T2 e C1 no sétimo dia da vida de prateleira. Entretanto, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos T1 e T2. Sousa et al. (2012) também observaram uma significativa diminuição da contagem de bactérias psicotróficas em vegetais folhosos minimamente processados expostos a uma solução de carvacrol a 600 µg / mL, Azeredo et al. (2011), trabalhando com óleo essencial de *O. vulgare*, também observaram redução da contagem de bactérias psicotróficas em VMP, confirmando os resultados encontrados neste trabalho. É importante ressaltar que a contagem de bactérias psicotróficas alcançou valores de 7 log UFC / g no sétimo dia do armazenamento, para o C1, comprometendo a vida de prateleira do produto, mesmo sendo mantido em refrigeração.

A contagem de bolores e leveduras também apresentou redução significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos com adição de carvacrol (T1 e T2) e os controles. No terceiro dia da vida de prateleira o T2 apresentou valores < 2 log UFC / g e T1 0,8495 log UFC / g, enquanto no sétimo dia os tratamentos T1 e T2 apresentaram valores < 2 log UFC / g. Neste mesmo período C1 apresentou contagens de 3,466 e 4,835 log UFC / g, mostrando a eficiência do carvacrol na redução de bolores e leveduras. Muriel-Galet et al. (2012) e Azeredo et al. (2011), utilizando óleo essencial de *O. vulgare* em vegetais e hortaliças minimamente processadas observaram redução significativa de bolores e leveduras (até 6 log de UFC / g) em relação ao controle. Assim como Sousa et al. (2012) utilizando carvacrol, notaram queda de 2,9 log de UFC / g. Bolores e leveduras são importantes deteriorantes de VMP, diminuindo a vida de prateleira e causando

prejuízos econômicos, neste caso a aplicação de cobertura comestível incorporada de carvacrol se torna uma opção viável.

3.4 Efeito da aplicação de cobertura comestível a base de fécula de mandioca com adição de carvacrol nos parâmetros físicos e químicos em abóbora minimamente processada.

O efeito da cobertura comestível adicionada de carvacrol aplicada em abóbora minimamente processada sobre os parâmetros de ATT, SS, pH e perda de massa, nos diferentes tempos de vida de prateleira está demonstrado na Tabela 3.

Os tratamentos (T1 e T2) e os controles (C1 e C2) apresentaram um aumento nos valores de ATT, no terceiro dia da vida de prateleira, seguido de queda, no sétimo dia, essa oscilação no teor de acidez titulável total pode estar relacionada aos processos bioquímicos do metabolismo respiratório, que tanto sintetiza quanto consome ácido como esqueleto de carbono (Chitarra & Chitarra, 2005).

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos T1 e T2 com relação aos controles C1 e C2 para ATT, no terceiro e sétimo dia do armazenamento. Esta redução é relevante, pois, uma elevada acidez em VMP, influencia nas características sensoriais do produto, diminuindo sua vida de prateleira. Queiroz et al. (2010) também observaram diferença significativa para ATT entre minimilhos minimamente processados, revestidos com fécula de mandioca e o controle sem revestimento, porém os controles apresentaram valores entre 0,8 a 1,0 %, enquanto os tratamentos apresentaram valores maiores, em torno de 1,2%, diferente dos resultados do presente trabalho.

Para os valores de pH houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos T1 e T2 e o controle C1 no primeiro e sétimo dia do armazenamento, também foi possível observar que o controle C2 diferiu do C1, no mesmo período. Resultados semelhantes foram relatados por Oliveira & Cereda (2003), que observaram valores de pH menores para o controle do que para os frutos revestidos com cobertura comestível de fécula de mandioca. Observou-se também que tanto para os controles quanto para os tratamentos os valores de pH apresentaram uma elevação no terceiro dia da vida de prateleira, com uma ligeira queda no sétimo dia. Esses valores alternantes do pH têm sido observados em vegetais produtos minimamente processados (Lucera, Costa, Mastromatteo, Conte & Nobile, 2010; Silva et al., 2009; Queiroz et al., 2010).

Acredita-se que esse comportamento seja uma consequência dos efeitos do metabolismo normal de CO₂ ou reação direta do tecido vegetal, eliminando o CO₂ do interior de seus tecidos para os vacúolos ou ambiente (Silva et al., 2009).

Os teores de SS tiveram ligeiro aumento no decorrer do período de armazenamento, tanto para os controles quanto para os tratamentos, apresentando valores entre 4,9 - 5,2 °Brix, no último dia da vida de prateleira. Sasaki (2006) verificaram que abóbora minimamente processadas apresentaram um leve acréscimo no teor de SS durante o tempo de armazenamento, encontrando valores de 5,3 °Brix. Segundo estes autores este acréscimo nos valores de SS se deve ao estresse causado pelo processamento mínimo. De maneira geral não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para este parâmetro entre os tratamentos e os controles, Souza et al. (2009), trabalhando com berinjela revestida com cobertura comestível a base de fécula de mandioca, também não observaram diferença significativa nos teores de SS entre o tratamento e o controle.

Para a perda de massa houve significativa diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos e os controles, bem como entre os controles C1 e C2, no terceiro e sétimo dia da vida de prateleira. Os tratamentos com carvacrol apresentaram significativa redução na perda de massa, até 3,73% e 3,78%, no último dia de armazenamento, entre T2 e C1 e T1 e C1, respectivamente. Queiroz, et al. (2010) verificaram que minimilhos minimamente processados revestidos com cobertura comestível de fécula de mandioca apresentaram uma perda de massa inferior ao controle sem revestimentos. Segundo Chitarra & Chitarra (2005), o uso de coberturas hidrofílicas, como o amido, tem limitações quanto às propriedades de barreira de vapor d'água. A presença do carvacrol na cobertura comestível, pela sua característica hidrofóbica (Burt, 2004), pode ter ajudado na diminuição da perda de água do vegetal. O controle da perda de massa em VMP apresenta elevada importância, uma vez que influencia diretamente na aparência do produto, fator este que influencia a decisão de compra desses produtos.

4. Conclusão

Os resultados apresentados neste estudo mostraram a eficácia do carvacrol na inibição de bactérias patogênicas *in vitro*. Este composto adicionado na cobertura comestível à base de fécula de mandioca também mostrou eficácia em inibir tanto bactérias patogênicas como a microbiota autóctone de abóbora minimamente

processada. As avaliações físico-químicas mostraram que a adição de carvacrol na cobertura comestível influenciou nos parâmetros analisados e, no caso da perda de massa, atuou como barreira protetora. Estes resultados reforçam a ideia que a incorporação de compostos com ação antimicrobiana em coberturas comestíveis para aplicação em AMP constitui uma alternativa para melhorar a segurança microbiológica e aumentar a vida de prateleira desses produtos.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

6. Referencias

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*. (1992). *Official Methods of analysis of the agricultural chemists*. (11^a Ed). Washington. 1115p.

Azeredo, G. A., Stamford, T. L. M., Nunes, P. C., Gomes Neto, N. J., Oliveira, M. E. G., Souza, E. L. (2011). Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International*, 44, 1541–1548.

Baskaran, S. A., Upadhyay A., Kollanoor-Johny A., Upadhyaya I., Mooyottu S., Amalaradjou M. A. R., Schreiber D., Venkitanarayanan K. (2013). Efficacy of Plant-Derived Antimicrobials as Antimicrobial Wash Treatments for Reducing Enterohemorrhagic Escherichia Coli O157:H7 on Apples. *Journal of Food Science*, 78, 1399-1404.

Bohaychuk, V.M., Bradbury, R.W., Dimock, R., Fehr, M., Gensler, G.E., King, R.K., Rieve, R., Barrios, P.R. (2009). A microbiological survey of selected Alberta-grown fresh produce from farmers' markets in Alberta, Canada. *Journal of Food Protection* 72, 415–420.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 26 de fevereiro de 2014.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods— a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223– 253.

Chitarra, M. I. F., & Chitarra, A. B. (2005). Pós-Colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. (2^a Ed.). Lavras: UFLA.

Clinical Laboratory Standards Institute. (2012). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

Cordano, A. M., & Jacquet, C. (2009). *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: prevalence and strain characterization. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 176-179.

Downes, F. P., & Ito, K. (2001). Compendium of Methods For the Microbiological Examination of Foods. (4^a Ed.). Washington, DC: American Public Health Association.

Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K., Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and orégano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, 86, 283–288.

Feng, P. (2012). *Escherichia coli* (ETEC, EPEC, EHEC, EIEC). In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bad Bug Book: Foodborne, Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins (pp 68-81).

Giusti, M., Aurigemma, C., Marinelli, L., Tufi, D., De Medici, D., Di Pasquale, S., De Vito, C., Boccia, A. (2010). The evaluation of the microbial safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 996–1006.

Gorski, L., Parker, C.T., Liang, A., Cooley, M.B., Jay-Russell, M.T., Gordus, A.G., Atwill, E.R., Madrell, R.E. (2011). Prevalence, distribution, and diversity of *Salmonella enterica* in a major produce region of California. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 2734–2748.

Guarda, A., Rubilar, J. F., Miltz, J., Galotto, M. J. (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146, 144–150.

Hait, J. (2012). *Staphylococcus aureus*. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bad Bug Book: Foodborne, Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, 85-91.

Hammack, T. (2012). *Salmonella* species. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bad Bug Book: Foodborne, Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, 9-13.

Hislop N., Phan P. (2007). Microbiological guidelines for ready-to-eat foods: A Guide for Environmental Public Health Professionals. *Environmental Health Review*, 37-42.

Hyltdgaard, M., Myaind, T., Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-24.

Inamuco, J., Veenendaal, A. K. J., Burt, S. A., Post, J. A., Bokhoveña, J. L. M. T., Haagsmana, H. P., Veldhuizen, E. J. A. (2012). Sub-lethal levels of carvacrol reduce *Salmonella* Typhimurium motility and invasion of porcine epithelial cells. *Veterinary Microbiology*, 157, 200–207.

Iturriaga, L., Olabarrieta, I., Marañón, M. (2012). Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. *International Journal of Food Microbiology*, 158, 58–64.

- Jang, S., Shin, Y., Song, K. B. (2011). Effect of rapeseed protein–gelatin film containing grapefruit seed extract on ‘Maehyang’ strawberry quality. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 620–625.
- Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., Bigger, S. W. (2011). Antimicrobial Activity of Natural Agents Coated on Starch-Based Films against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*, 76, 531-537.
- Lampel, K. A. (2012). *Aeromonas* species. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bad Bug Book: Foodborne, Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins (pp. 54-56).
- Little, C.L., Gillespie, I.A. (2008). Prepared salads and public health. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1729-1743.
- Lucera, A., Costa, C., Mastromatteo, M., Conte, A., Nobile, M. A. (2010). Influence of different packaging systems on fresh-cut zucchini (*Cucurbita pepo*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 361–368.
- Luz, I. S., Gomes Neto, N. J., Tavares, A. G., Nunes, P. C., Magnani, M., Souza, E. L. (2012). Evidence for Lack of Acquisition of Tolerance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ATCC 14028 after Exposure to Subinhibitory Amounts of *Origanum vulgare* L. Essential Oil and Carvacrol. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 5021-5024.
- Luz, I. S., Gomes Neto, N. J., Tavares, A. G., Nunes, P. C., Magnani, M., Souza, E. L. (2013). Lack of induction of direct protection or cross-protection in *Staphylococcus aureus* by sublethal concentrations of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol in a meat-based médium. *Archive of Microbiology*, 195, 587–593.
- Maistro, L. C., Miya, N. T., Sant’Ana, A. S., Pereira, J. L. (2012). Microbiological quality and safety of minimally processed vegetables marketed in Campinas, SP e Brazil, as assessed by traditional and alternative methods. *Food Control*, 28, 258 e 264.
- Molinos, A. C., Abriouel, H., López, R. L., Omar, N. B., Valdivia, E., & Gálvez, A. (2009). Enhanced bactericidal activity of enterocin AS-48 in combination with essential oils, natural bioactive compounds and chemical preservatives against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat salad. *Food Chemistry and Toxicology*, 47, 2216–2223.
- Muriel-Galet, V., Cerisuelo, J. P., López-Carballo, G., Lara, M., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. (2012). Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 195–201.
- Oliveira, M. A., & Cereda, M. P. (2003). Pós-colheita de pêssegos (*prunus pérsica* l. bastisch) revestidos com filmes a base de amido como alternativa à cera comercial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, 28-33.
- Oliveira, C. E. V.; Stamforda, T. L. M.; Gomes Neto, N. J., Souza, E. L. (2010). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 312–316.
- Queiroz, V. A. V., Moraes, E. A., Queiroz, L. R., Tardin, F. D., Guedes, E. O., Pereira Filho, I. A., Lombardi, C. T. (2010). Use of edible coverage in post-harvest preservation of minimally processed baby corn. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, 910-916.

- Rivas, L., McDonnell, M. J., Burgess, C. M., O'Brien, M., Navarro-Villa, A., Fanning, S., Duffy, G. (2010). Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 70–78.
- Rúgeles, L.C., Bai, J., Martínez, A.J., Vanegas, M.C., Gómez-Duarte, O.G. (2010). Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 282–286.
- Sangsuwan, J., Rattanapanone, N., Auras, R. A., Harte, B. R., Rachtanapun, P. (2009). Factors Affecting Migration of Vanillin from Chitosan/Methyl Cellulose Films. *Journal of Food Science*, 74, 549-555.
- Sant'Ana, A. S., Landgraf, M., Destro, M. T., Franco, B. D. G. M. (2011). Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in São Paulo, Brazil, *Food Microbiology*, 28, 1235-1237.
- Sant'Ana, A. S., Barbosa, M. S., Destro, M. T., Landgraf, M., Franco, B. D. G. M. (2012). Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 52–58.
- Sasaki, F. F., Del Aguila, J. S., Gallo, C. R., Ortega, E. M. M., Jacomino, A. P., Kluge, R. A. (2006). Alterações fisiológicas, qualitativas e microbiológicas durante o armazenamento de abóbora minimamente processada em diferentes tipos de corte. *Horticultura Brasileira*, 24, 170-174.
- Seo, Y. H., Jang, J. H., Moon, K. D. (2010). Occurrence and Characterization of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* Isolated from Minimally Processed Vegetables and Sprouts in Korea. *Food Science Biotechnology*, 19, 313-319.
- Silva, A. V. C., Oliveira, D. S. N., Yagui, P., Carnelossi, M. A. G., Muniz, E. N., Narain, N. (2009). Temperature and packaging of minimally processed pumpkin (*Curcubita moschata*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 391-394.
- Sousa, J. P., Azerêdo, G. A. Torres, R. A., Vasconcelos, M. A. S., Conceição, M. L., Souza, E. L. (2012). Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 145–151.
- Souza, P. A., Aroucha, E. M. M., Souza, A. E. D., Costa, A. R. F. C., Ferreira, G. S., Bezerra Neto, F. (2009). Conservação pós-colheita de berinjela com revestimentos de fécula de mandioca ou filme de PVC. *Horticultura Brasileira*, 27, 235-239.
- Zhou, T., Harrison, A. D., McKellar, R., Young, J. C., Odumeru, J., Piyasena, P., Lu, X.; Mercer, D. G., Karr, S. (2004). Determination of acceptability and shelf life of ready-to-use lettuce by digital image analysis. *Food Research International*, 37, 875–881.
- Ye, H., Shen, S., Xu, J., Lib, S., Yuan, Y., Jones, G. S. (2013). Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. *Food Control*, 34, 619-623.
- Yun, J., Fan, X., Li, X. (2013). Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Quality Maintenance of Cherry Tomatoes Treated with Gaseous Essential Oils. *Journal of Food Science*, 78, 458-464.

Tabela 1 – Contagem (log UFC/g) de *E. coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *A. hydrophila* ATCC 7966 e *S. aureus* ATCC 25923 em abóbora minimamente processada revestida com cobertura comestível a base de fécula de mandioca adicionado de carvacrol.

Tratamento	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028			<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966			<i>S. aureus</i> ATCC 25923		
	Dia / Tempo			Dia / Tempo			Dia / Tempo			Dia / Tempo		
	0	3	7	0	3	7	0	3	7	0	3	7
C1	3,335 ^A	4,904 ^A	7,525 ^A	3,738 ^A	4,310 ^A	7,793 ^A	3,656 ^A	7,349 ^A	9,480 ^A	3,072 ^A	3,901 ^A	4,825 ^A
C2	3,299 ^A	4,920 ^A	7,901 ^B	3,429 ^B	4,444 ^A	7,710 ^A	3,575 ^A	7,260 ^A	9,186 ^A	3,330 ^B	3,515 ^A	4,871 ^A
T1	1 ^B	1,044 ^B	2,516 ^C	<2 ^C	0,849 ^B	2,373 ^B	0,678 ^B	0,425 ^B	0,425 ^B	<2 ^C	1,044 ^B	2,294 ^B
T2	<2 ^C	<2 ^C	<2 ^D	<2 ^C	<2 ^C	<2 ^C	<2 ^C	<2 ^B	<2 ^B	<2 ^C	<2 ^C	<2 ^C

Médias na mesma coluna com diferentes letras maiúsculas diferem significativamente (p<0,05) de acordo com teste de Tukey.

Limite de detecção do teste: <2 log UFC/g

C1 = Abóbora inoculada

C2 = Abóbora inoculada + Revestimento de fécula de mandioca

T1 = Abóbora inoculada + Revestimento com 1 CIM de carvacrol

T2 = Abóbora inoculada + Revestimento com 2 CIM de carvacrol

Tabela 2 – Contagem (log UFC/g) de bactérias psicrotróficas e bolores e leveduras e enumeração (NMP / g) de coliformes 35 °C 45 °C em abóbora minimamente processada revestida com cobertura comestível a base de fécula de mandioca adicionada de carvacrol.

Tratamento	Coliformes 35 °C			Coliformes 45 °C			Bactérias Psicrotróficos			Bolores e Leveduras		
	Tempo / Dias											
	0	3	7	0	3	7	0	3	7	0	3	7
C1	3,075 ^A	998,08 ^A	1100 ^A	<3 ^A	<3 ^A	<3 ^A	2,157 ^A	4,393 ^A	7,344 ^A	2,476 ^A	3,466 ^A	4,835 ^A
C2	<3 ^A	1100 ^A	1100 ^A	<3 ^A	<3 ^A	<3 ^A	1,979 ^{A,B}	4,227 ^B	6,957 ^B	2,024 ^{A,B}	2,882 ^A	2,581 ^B
T1	<3 ^A	<3 ^B	<3 ^B	<3 ^A	<3 ^A	<3 ^A	1,894 ^B	3,929 ^C	5,710 ^C	1,387 ^B	0,849 ^B	<2 ^C
T2	<3 ^A	<3 ^B	<3 ^B	<3 ^A	<3 ^A	<3 ^A	1,894 ^B	3,960 ^C	5,467 ^C	2,048 ^{A,B}	<2 ^C	<2 ^C

Médias na mesma coluna com diferentes letras maiúsculas diferem significativamente (p<0,05) de acordo com teste de Tukey.

Limite de detecção do teste (bactérias psicrotróficas e bolores e leveduras): <2 log UFC/g

Limite de detecção do teste (coliformes 35 °C e coliformes 45 °C): <3 NMP/g

C1 = Abóbora inoculada

C2 = Abóbora inoculada + Revestimento de fécula de mandioca

T1 = Abóbora inoculada + Revestimento com 1 CIM de carvacrol

T2 = Abóbora inoculada + Revestimento com 2 CIM de carvacrol.

Tabela 3 – Valores de Acidez Titulável Total (ATT), pH, Sólidos Solúveis (SS) e perda de massa em abóbora minimamente processada revestida com cobertura comestível a base de fécula de mandioca adicionada de carvacrol.

Tratamento	ATT (%)			pH			SS(%)			Perda de Massa (%)		
	Tempo / Dias											
	0	3	7	0	3	7	0	3	7	0	3	7
C1	0,196 ^A	0,466 ^A	0,195 ^A	6,510 ^A	6,506 ^A	6,169 ^A	4,450 ^A	5,088 ^A	5,263 ^A	0 ^A	2,650 ^A	4,080 ^A
C2	0,194 ^A	0,391 ^B	0,276 ^B	6,349 ^{B,C}	6,409 ^A	6,393 ^B	4,125 ^{A,B}	4,938 ^A	5,150 ^A	0 ^A	0,660 ^B	0,950 ^B
T1	0,096 ^A	0,285 ^C	0,294 ^C	6,303 ^B	6,434 ^A	6,401 ^B	3,925 ^B	4,725 ^{A,B}	5,188 ^A	0 ^A	0,200 ^C	0,300 ^C
T2	0,096 ^A	0,267 ^C	0,185 ^D	6,361 ^C	6,475 ^A	6,365 ^B	4,400 ^A	4,238 ^B	4,900 ^A	0 ^A	0,240 ^D	0,350 ^D

Médias na mesma coluna com diferentes letras maiúsculas diferem significativamente ($p < 0,05$) de acordo com teste de Tukey.

C1 = Abóbora inoculada

C2 = Abóbora inoculada + Revestimento de fécula de mandioca

T1 = Abóbora inoculada + Revestimento com 1 CIM de carvacrol

T2 = Abóbora inoculada + Revestimento com 2 CIM de carvacrol

