

# Modelação da Sobrevivência do *Staphylococcus aureus* em Bifes Revestidos com Extrato de Urucum (*Bixa orellana* L.) em Óleo de Coco \*

Karinne Novaes, Sara Coelho-Fernandes, Gisela Rodrigues, Vasco A. P. Cadavez  
Ursula Gonzales-Barron

Centro de Investigação de Montanha, Laboratório Associado SusTec

Os extratos obtidos a partir das sementes de *Bixa orellana* L. (urucum) são amplamente utilizados na indústria alimentar como um corante natural, embora vários trabalhos têm reportado que também possuem atividade antimicrobiana. O presente estudo teve por objetivo avaliar a cinética do *Staphylococcus aureus*, durante o período de refrigeração, em bifes de carne bovina revestidos com extrato de sementes de urucum ao 0%, 10%, 20% e 30% em óleo de coco, embalados em atmosfera normal e a vácuo. A caracterização da cinética de sobrevivência do *S. aureus* nos bifes revestidos foi realizada mediante o ajuste do modelo Weibull ( $\sigma$ ,  $\beta$ ) a cada uma das curvas experimentais obtidas após inoculação superficial do patogénico nos bifes ( $\sim 5,2 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ ). Em termos gerais, quanto maior foi a concentração de urucum extraído, maior foi seu poder bactericida. Exceto para o extrato de urucum a 30%, todas as curvas do *S. aureus* inoculado nos bifes mantidos em atmosfera normal apresentaram uma fase inicial de resistência à inativação, pelo que os parâmetros de forma  $\beta$  quantificaram a convexidade da curva de inativação com valores maiores a 1,0. Comprovou-se uma maior inativação quando os bifes foram embalados a vácuo, mediante o decréscimo imediato do *S. aureus* em todas as curvas de sobrevivência, agora côncavas ( $\beta < 1,0$ ). Uma transformação dos parâmetros Weibull  $\sigma$  e  $\beta$  permitiu estimar o tempo necessário para atingir a primeira redução decimal do *S. aureus* em bifes revestidos com óleo de urucum extraído ao 0%, 10%, 20% e 30%, o qual foi  $\infty$ , 14,4 dias (IC 95%: 8,1-20,8 dias), 8,3 dias (IC 95%: 6,6-10,1 dias) e 2,5 dias (IC 95%: 0,24-4,8 dias), respectivamente, quando embalados em atmosfera normal; e significativamente e gradativamente menores quando embalados a vácuo: 10,6 dias (IC 95%: 0,80-22 dias), 7,2 dias (IC 95%: 0,11-14,3 dias), 2,9 dias (IC 95%: 2,2-3,7 dias) e 0,43 dias (IC 95%: 0,05-0,81 dias), respetivamente. Este trabalho de investigação permitiu concluir que o extrato de sementes de urucum em óleo de coco apresenta-se como um antimicrobiano promissor que pode ser aplicado como cobertura de carnes de bovino frescas para o controle do *S. aureus*.

**Keywords:** Achiote; Estudos de desafio; Inativação; Microbiologia preditiva; Modelo Weibull.

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com o relatório científico da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA, 2021), no ano 2020, o número de surtos na UE causados por toxinas bacterianas foi 527, representando o 17% de todos os surtos. Estes surtos foram reportados por 12 Estados Membros (Bélgica, Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Hungria, Itália, Países Baixos, Portugal, Espanha e Suécia) e ocasionaram um total de 4517 casos, 182 hospitalizações e 6 mortes. Destes surtos, 43 tiveram origem nas enterotoxinas estafilocócicas, e do total de surtos devido a toxinas bacterianas, seis fo-

\*Corresponding author: [ubarron@ipb.pt](mailto:ubarron@ipb.pt)

ram causados pelo consumo de carne de bovino e derivados (EFSA, 2021). A contaminação destes produtos por *S. aureus* pode vir diretamente dos animais infectados ou pode ser o resultado de higiene deficiente durante o processo de produção, no retalho e no armazenamento dos produtos, uma vez que o ser humano também pode ser portador deste microrganismo (Ozdemir & Keyvan, 2016). De fato, o *S. aureus* enterotoxigénico pode ser encontrado em diversos locais do corpo, como as narinas e a garganta, tanto do ser humano como dos animais (Borch et al., 1996). Esta bactéria também pode colonizar a pele, as membranas mucosas e pode estar transitoriamente no trato intestinal (Hansson, 2001). Durante o processamento de carne e derivados, *S. aureus* presente nas mãos dos manipuladores, sobre as superfícies de trabalho e nos equipamentos, pode levar à contaminação cruzada entre as carcaças e o ambiente, pelo que é necessário limpar e sanitizar os ambientes de abate e de processamento (de Lima et al., 2004). Um trabalho de investigação realizado na Turquia (Ozdemir & Keyvan, 2016) estimou que 14,6% da carne fresca de bovino vendida nos supermercados está contaminada com *S. aureus*, e desta fração 77% é *S. aureus* enterotoxigénicos. Estudos microbiológicos similares realizados nos EUA (Hanson et al., 2011), Colômbia (López-Gutiérrez et al., 2017) e China (Wu et al., 2018) revelaram prevalências de *S. aureus* em carne fresca de bovino de 6,9%, 46% e 50,4%, respectivamente.

Devido à crescente preocupação dos consumidores sobre o uso de antimicrobianos sintéticos em alimentos, tem surgido uma extensa investigação científica na utilização de antimicrobianos naturais, extraídos das plantas e óleos essenciais, como biopreservantes alternativos para assegurar a inocuidade dos produtos e estender o seu tempo de prateleira. Os efeitos antimicrobianos destes extratos devem-se principalmente à presença de compostos bioativos, incluindo fenólicos, terpenos, álcoois alifáticos, aldeídos, ácidos e isoflavonoides. Estes compostos bioativos encontram-se comumente nas folhas (rosmaninho, sálvia, orégão, tomilho, manjeriço), bolbos (alhos e cebolas), frutas (cardamomo e pimenta), flores (cravinho) e sementes (cominho, erva-doce, noz-moscada) das plantas (Aziz & Karboune, 2015).

Uma planta originária da América do Sul, utilizada pelos nativos pelas múltiplas propriedades benéficas atribuídas, e trazida para Europa no século XVII, é a *Bixa orellana* L. (urucum ou achiote). O pigmento extraído das sementes de urucum tem importância económica mundial por se tratar de um dos corantes naturais mais utilizados nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica. Nos alimentos, o corante de urucum é utilizado em gelados e produtos lácteos como queijos, margarinas e manteigas. Os três produtores principais de urucum são o Peru, o Brasil e o México, países que em conjunto produzem o 60% da produção mundial total (Jansen, 2005). Contudo, além da sua capacidade corante, vários estudos têm revelado que os extratos de sementes de urucum também possuem atividade antimicrobiana *in vitro* contra uma série de bactérias patogénicas incluindo o *S. aureus* (Prathima et al., 2016; Quintero-Quiroz et al., 2019; Raga et al., 2011; Rojas et al., 2006; Selvi et al., 2011). No entanto, até à data não foi testada a capacidade antimicrobiana dos extratos de sementes de urucum aplicados *in situ*. Considerando que o pó das sementes de urucum tem um uso difundido na culinária de vários países sul-americanos, como potenciador de sabor e como corante, o presente trabalho visou explorar uma aplicação potencial do extrato oleoso de sementes de urucum como revestimento de bifes como melhorador da cor e do sabor, mas também como inibidor do crescimento microbiano.

Deste modo, os objetivos deste estudo foram: (i) avaliar mediante ensaios de desafio o efeito do extrato oleoso de sementes de urucum na inibição do *S. aureus* inoculado na superfície de bifes de carne bovina embaladas em atmosfera normal e a vácuo durante 14 dias de refrigeração a 5°C; e (ii) caracterizar, mediante modelos primários e secundários de microbiologia preditiva, a cinética de sobrevivência deste patogénico em bifes revestidos com extrato oleoso de sementes de urucum para os dois tipos de embalagem.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo, utilizaram-se sementes de urucum (humidade: 11,5%) originárias do Peru que foram moídas com um moedor de café elétrico (Modelo SilverCrest Kitchen Tools 150 W, Lidl, Alemanha). O óleo de coco virgem de modalidade de produção orgânica (marca VitaDor) e bifes de carne bovina do tipo novilho foram adquiridos num mercado local da cidade. *Staphylococcus* subsp. aureus utilizado nos ensaios de inoculação foi a cepa ATCC<sup>TM</sup> 6538.

### 2.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE SEMENTES DE URUCUM EM ÓLEO DE COCO

A extração da bixina presente nas sementes de urucum foi realizada usando óleo vegetal, ajustando o peso das sementes à concentração desejada para a realização do experiência. A extração foi efectuada com 10, 20% e 30% p/p de sementes de urucum em óleo de coco. Inicialmente, pesaram-se 10, 20 e 30 g de sementes moídas e adicionaram-se sequencialmente em 100 gramas de óleo de coco estado líquido. Em seguida, os copos contendo o óleo de coco e a semente de urucum foram agitados numa estufa (SI500, Stuart, Reino Unido) com agitação a 37°C durante 15 horas. Após este período, o óleo foi transferido para tubos de ensaio de 50 ml, os quais foram centrifugados (5804R, Eppendorf, Alemanha) à temperatura de 25 °C a 5800 rpm durante 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado para outro tubo para obter uma amostra clarificada. Durante o decorrer da experiência, os extratos foram refrigerados e protegidos da luz.

### 2.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

O stock de *S. aureus*, congelado em 30% glicerol a -80 °C, foi activado em caldo soja triptona (TSB 610053, Liofilchem, Itália) numa estufa com agitação (SI500, Stuart, Reino Unido) durante 15 horas a 35 °C em duas subculturas sequenciais. No dia da inoculação dos bifes, mediu-se a absorvância a 600 nm da suspensão microbiana, a qual devia estar entre 0,80 e 0,85. Diluiu-se 1 ml de suspensão em 9 ml de solução fisiológica, e inocularam-se 60 µl desta suspensão em cada bife de 40 cm<sup>2</sup> de área, com a finalidade de obter uma contaminação superficial inicial de 5,2 log UFC/cm<sup>2</sup> nos bifes. Este procedimento foi seguido em todos os ensaio de desafio realizados.

### 2.3 ENSAIOS DE DESAFIO

Os ensaios de desafio foram realizados segundo um desenho experimental factorial completo de duas variáveis: (i) nível de antimicrobiano, compreendendo 5 tratamentos (controle [somente o inóculo], 0, 10, 20 e 30% de extrato oleoso de urucum); e (ii) tipo de embalagem, que compreendeu 2 níveis, atmosfera normal e vácuo. Isto produziu um total de 10 condições ambientais diferentes para os ensaios de desafio os quais foram realizados em duplicado. A preparação dos bifes de bovino e a aplicação dos revestimentos foi realizado da mesma forma, para os bifes embalados em atmosfera normal e a vácuo, bem como para os bifes que revestidos com 0, 10, 20 e 30% de extrato oleoso de urucum.

Primeiramente, os bifes de carne bovina foram cortados em formato circular com a ajuda de um cortador de 6,50 cm de diâmetro (40,70 cm<sup>2</sup> de área). Para cada condição experimental, cortaram-se 18 amostras de bifes para as determinações em 6 pontos no tempo (desde dia 0 até dia 14) e 3 bifes analisados por ponto (triplicado). Uma vez cortados, os bifes foram acomodados com uma pinça estéril em bandejas de aço inox estéreis cobertos por papel secante. Posteriormente, as amostras que seriam armazenadas em atmosfera normal foram colocadas em pequenas formas de metal, previamente esterilizadas. De seguida, os bifes foram inoculados com 60 µl de suspensão de

*S. aureus*, a qual foi espalhada sobre o bife com um espalhador. Após a inoculação, os bifos secaram à temperatura ambiente durante 60 minutos.

#### 2.4 APLICAÇÃO DO REVESTIMENTO DE EXTRATO DE URUCUM

Para o tratamento controlo, não se aplicou nenhum revestimento, portanto os 18 bifos inoculados foram embalados em atmosfera normal ou a vácuo. Nos outros tratamentos - aqueles com revestimento de extrato oleoso de urucum - cada bife foi revestido com 1 ml de extrato oleoso de urucum (0, 10, 20 ou 30%), e espalhado em toda sua superfície com auxílio de um espalhador. O tratamento de 0% extrato oleoso de urucum foi denominado como “Óleo de coco”, uma vez que o bife foi revestido somente com o óleo de coco. As formas de metal contendo os bifos que foram submetidos a atmosfera normal foram recobertos com um filme de modo a causar uma barreira contra o ambiente externo.

No caso dos tratamentos submetidos a embalagem a vácuo, os bifos inoculados e/ou revestidos foram colocados num saco de stomacher (Gofradas, Orved<sup>®</sup>, Spain, com permeabilidade  $84 \pm 4.20$  cc/m<sup>2</sup>/24 h/atm para O<sub>2</sub>,  $361 \pm 18.05$  cc/m<sup>2</sup>/24 h/atm para CO<sub>2</sub>,  $22 \pm 1.10$  cc/m<sup>2</sup>/24 h/atm para N<sub>2</sub>, e  $9.0 \pm 0.45$  cc/m<sup>2</sup>/24 h/atm para H<sub>2</sub>O) com ajuda de uma pinça estéril, o qual foi selado a vácuo (Silvercrest SFS 110B2, Germany). Os bifos foram armazenados a  $5 \pm 0.5$  °C até à realização da análise.

#### 2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

A concentração de *S. aureus* nos bifos foi determinada nos dias 0 (dia da condução do ensaio de inoculação), 2, 5, 8, 11 e 14, analisando três bifos por tempo e por condição experimental. Na modelação matemática, utilizaram-se as médias em log CFU/cm<sup>2</sup> dessas três determinações (três bifos). Para análise do *S. aureus*, prepararam-se tubos de água tamponada peptonada (BPW 611014, Liofilchem, Itália), e placas de agar Baird-Parker (BP 610004, Liofilchem, Itália) suplementado com 5% emulsão gema de ovo telurito (YET 80121, Liofilchem, Itália).

Nos tratamentos armazenados em condições atmosféricas, os bifos foram retirados das formas de metal e depositados em bolsas de stomacher contendo 50 ml BPW. Já os bifos acondicionados a vácuo só foi necessária a abertura dos sacos, seguida da adição de 50 ml de BPW. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas num stomacher (BagMixer<sup>®</sup> \$400) durante 90 s. Alíquotas de 100 µl foram espalhadas em duplicata nas placas de BP a partir de pelo menos duas diluições adequadas. Por último, as placas foram colocadas na estufa incubadora (SLW 400, Pol-Eko Aparatura, Polónia) a 37°C durante 48 h. Depois deste tempo, as colónias típicas de *S. aureus* foram observadas num contador digital (Digital S<sup>®</sup>, J.P. Selecta S.A., Espanha) e contadas nas placas que continham entre 20 e 150 colónias. Estes valores foram convertidos a log CFU/cm<sup>2</sup>.

#### 2.6 MODELO PRIMÁRIO

O modelo primário de Weibull foi utilizado para descrever cada uma das 10 curvas experimentais de sobrevivência microbiana produzidas pelas 10 condições ambientais. O modelo de Weibull (Equação 1) define-se como:

$$\ln(N_t) = \ln(N_0) - \left(\frac{t}{\sigma}\right)^\beta \quad (1)$$

onde  $N_t$  é a concentração microbiana em CFU/cm<sup>2</sup> no tempo  $t$  (dias);  $N_0$  é a concentração microbiana inicial, após inoculação, em CFU/cm<sup>2</sup>;  $\sigma$  é o parâmetro de escala ou declive, enquanto

$\beta$  é o parâmetro de forma. Uma curva de sobrevivência côncava é caracterizada por um  $\beta < 1$  e uma curva de sobrevivência convexa por um  $\beta > 1$ . Se  $\beta = 1$ , o modelo de Weibull reduz-se a um modelo linear (Van Boekel, 2002).

O modelo de Weibull pode ser reparameterizado definindo como variável dependente o rácio de sobrevivência do patogénico (Equação 2) ao longo do tempo,  $S_t$ ,

$$S_t = \frac{N_t}{N_0} \quad (2)$$

Portanto, a Equação 1 transforma-se em:

$$S_t = - \left( \frac{t}{\sigma} \right)^\beta \quad (3)$$

O modelo de Weibull de dois parâmetros (Equação 3) foi ajustado a cada uma das curvas experimentais de sobrevivência produzidas pelos diferentes tratamentos. Uma vez que os parâmetros,  $\sigma$  e  $\beta$ , foram estimados para cada uma das curvas experimentais, calculou-se o tempo necessário para atingir uma redução decimal ( $t_{1log}$ ), isto é:  $1 \log_{10} CFU/cm^2$  (ou  $2.3 \ln CFU/cm^2$ ). Para tal, resolveu-se a Equação 3 para determinar  $t_{1log}$  para cada uma das condições ambientais.

$$t_{1log} = 2.3^{1/\beta} \times \sigma \quad (4)$$

## 2.7 MODELO SECUNDÁRIO

Os parâmetros cinéticos estimados para função Weibull, o declive ( $\sigma$ ) e o tempo para atingir a primeira redução decimal ( $t_{1log}$ ), foram utilizados para desenvolver dois modelos secundários. Os modelos secundários visaram prever o  $\sigma$  (Equação 5) e o  $t_{1log}$  (Equação 6) para as condições ambientais em estudo, ou seja: a percentagem de urucum presente no óleo de coco e o tipo de atmosfera utilizado na embalagem. Após a análise dos resultados, observou-se uma relação linear inversa entre o  $\sigma$ , o  $t_{1log}$  e a percentagem de urucum presente no óleo de coco, pelo que foram ajustados os seguintes modelos lineares secundários:

$$\sigma = \beta_0 - \beta_1 \times \%Extracto \quad (5)$$

$$t_{1log} = \gamma_0 - \gamma_1 \times \%Extracto \quad (6)$$

onde  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma_0$  e  $\gamma_1$  são constantes,  $\%Extracto$  é a percentagem de urucum presente no óleo de coco (0, 10, 20 e 30%). As Equações 5 (declive da função Weibull,  $\sigma$ ) e 6 (tempo para atingir a primeira redução decimal,  $t_{1log}$ ) foram ajustadas separadamente aos dados provenientes dos bifés embalados em atmosfera normal e a vácuo, pelo que foram ajustadas quatro modelos de regressão linear.

A análise dos dados foi realizada utilizando o software R (R Core Team, 2022), a função `nls()` foi usada para ajustar o modelo primário; a função `lm()` foi usada para ajustar os modelos secundários; a package `investr` foi utilizada para determinar o intervalo de confiança e de previsão a 95%; a função `plot()` para utilizada para construir os gráficos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 ESTUDO DE SOBREVIVÊNCIA DO *S. AUREUS* EMBALADOS EM ATMOSFERA NORMAL

Na Figura 1 apresentamos os dados experimentais e as curvas ajustadas pelo modelo Weibull para os tratamentos em atmosfera normal. Em primeiro lugar, pode-se afirmar que o modelo Weibull foi capaz de descrever todas as curvas de inativação, o qual pode ser examinado pelo fato das observações se encontrarem em todos os casos dentro do intervalo de confiança ao 95%. Em segundo lugar, comparando o tratamento controlo com os tratamentos de revestimento de extrato oleoso de urucum (0, 10, 20 e 30%), deduz-se que a sobrevivência do *S. aureus* em carne embalada em atmosfera normal foi afetada em diferente medida pelos tratamentos aplicados. O efeito dos tratamentos na cinética de sobrevivência do *S. aureus* pode ser avalizado pelos parâmetros do modelo Weibull,  $\sigma$  e  $\beta$ , que se apresentam na Tabela 1 para cada um dos tratamentos.

Tabela 1: Parâmetros do modelo de Weibull que descreve o logaritmo natural da redução ( $\ln(N_0/N_t)$ ) nas contagens de *S. aureus* em bifes com tratamento controlo, revestidos com óleo de coco e com extrato oleoso de urucum, embalados em atmosfera normal e armazenados a 5 ° C. O erro padrão residual (S) é apresentado para cada modelo.

Revestimento	Parâmetro	Média	Erro Padrão	Pr(> t )	S
Controlo	Declive ( $\sigma$ )	20,68	7,429	0,108	0,1134
	Forma ( $\beta$ )	2,788	2,891	0,437	
Extrato urucum 0% óleo de coco	Declive ( $\sigma$ )	15,66	0,244	<0,001	0,0471
	Forma ( $\beta$ )	7,393	2,073	0,038	
Extrato urucum 10% óleo de coco	Declive ( $\sigma$ )	8,101	1,026	0,004	0,2251
	Forma ( $\beta$ )	1,113	0,275	0,027	
Extrato urucum 20% óleo de coco	Declive ( $\sigma$ )	5,491	0,446	<0,001	0,2890
	Forma ( $\beta$ )	1,979	0,191	<0,001	
Extrato urucum 30% óleo de coco	Declive ( $\sigma$ )	0,865	0,263	0,030	0,4876
	Forma ( $\beta$ )	0,775	0,094	0,001	

A curva experimental para o controle (Figura 1) demonstra que *S. aureus*, se bem não foi capaz de se multiplicar sob refrigeração, foi capaz de sobreviver nos bifes refrigerados embalados em atmosfera normal. De acordo com Fellows (2018) e Tortora et al. (2016), o efeito da temperatura baixa sobre os microrganismos depende de dois fatores: 1) das características própria do microrganismo e 2) da intensidade com que uma temperatura é aplicada. No intervalo de 0 e 7°C, a taxa metabólica da maior parte das bactérias é muito reduzida, pelo que não conseguem reproduzir-se ou sintetizar toxinas, portanto a refrigeração tem um efeito bacteriostático, como se no tratamento de controlo deste trabalho. Hoffmann (2001) explica que este fator extrínseco compromete a fase lag, a velocidade de multiplicação, e a composição química e enzimática das células, de facto as reacções metabólicas são catalisadas por enzimas, cuja actividade catalítica depende da temperatura (de Souza et al., 2013).

Cabe destacar que no tratamento controlo, o parâmetro de forma ( $\beta$ ) não foi diferente de zero ( $p = 0,437$ ; Tabela 1), o qual reduz o modelo de Weibull a um modelo linear para descrever a sobrevivência do *S. aureus*, tal como se pode observar na Figura 1. Já para os outros tratamentos, o parâmetro  $\beta$  foi diferente de zero ( $p < 0,05$ ; Tabela 1), pelo que se observa a curvatura na curva sobrevivência bacteriana (Figura 1).

A curva de sobrevivência do *S. aureus* do bifés revestidos com óleo de coco apresentou uma queda muito ligeira, podendo ser dito que a sua ação antimicrobiana nos bifés durante refrigeração em atmosfera normal foi mínima. Em contrapartida, alguns autores têm demonstrado o efeito antimicrobiano *in vitro* do óleo de coco. Widianingrum et al. (2019) fizeram ensaios utilizando o óleo de coco virgem, em diferentes concentrações, como agente antimicrobiano e obtiveram resultados positivos. O teste *in vitro* confirmou o efeito inibitório do óleo de coco virgem do crescimento de *S. aureus* quando aplicado numa concentração de 200  $\mu\text{l}$  (igual a 0,102% de ácido láurico). Estes autores argumentaram que esta inibição é devida à composição similar deste ácido com um dos constituintes da parede celular de peptidoglicano das células bacterianas, assim o ácido láurico consegue cobrir toda a superfície da parede celular, penetrar e destruir a célula. Por outro lado, Hovorková et al. (2018) avaliaram a atividade antibacteriana *in vitro* de óleos vegetais que contém ácidos gordos de cadeia média contra bactérias Gram positivas, incluindo cinco bactérias de origem alimentar e seis linhagens intestinais domésticas. A metodologia seguida pelos autores referente à preparação dos óleos vegetais foi a sua pesagem e diluição na mesma quantidade de dimetilsulfóxido (DMSO), acompanhado da adição de um emulsificante. Num dos ensaios, determinaram o MIC do óleo de coco contra *S. aureus* e o valor obtido foi de 4,5 mg/ml, sendo atestado um efeito bacteriostático deste óleo contra o patogénico em questão. Effiong et al. (2018) avaliaram o padrão de suscetibilidade antimicrobiana do extrato de óleo de coco sobre bactérias e fungos selecionados, utilizando a prova *in vitro* do diâmetro de inibição. Os resultados obtidos revelaram que o *S. aureus* manifestou maior suscetibilidade ao óleo de coco (zona média de inibição de 14,55 mm) do que a *Pseudomonas aeruginosa* que obteve uma zona de inibição média de 7,7 mm.

Abbas et al. (2017) apontaram que o óleo de coco não possui elevada ação antimicrobiana, mas sim o ácido láurico, derivado do óleo de coco, contra isolados clínicos de *S. aureus*, *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Escherichia coli*. Estes autores determinaram uma zona de inibição do *S. aureus* de 10,50 mm, tendo concluído que, em geral, o efeito antibacteriano do ácido láurico foi maior sobre as bactérias Gram positivas que sobre as Gram negativas. Similarmente, Nagase et al. (2017) revelaram que o óleo de coco tem propriedades antimicrobianas somente contra algumas estirpes de bactérias pertencentes ao género *Streptococcus*, mas não possuem efeito contra *S. aureus* ou algumas bactérias Gram negativas, enquanto o ácido láurico possui efeito inibitório somente contra *S. aureus* e todo o género *Streptococcus*. Outros autores têm investigado o efeito inibidor *in vitro* do óleo de coco em sinergias com outros compostos. Tangwatcharin e Khopaibool (2012) pesquisaram as atividades *in vitro* do óleo de coco virgem, do ácido láurico e da monolaurina em combinação com ácido láctico contra *S. aureus*. O óleo de coco virgem não inibiu o crescimento do patógeno, já o ácido láurico apresentou um MIC 1,6% v/v e MBC 3,2% v/v, seguido pela monolaurina e pelo ácido láctico que apresentaram o mesmo valor para MIC 0,1% v/v, e MBC de 0,1% v/v e de 0,4% v/v, respectivamente. O óleo de coco virgem também é efetivo contra *S. aureus* quando combinado com o extrato de semente de *Swietenia mahagoni*, conhecida por mogno (zona de diâmetro de inibição  $8.49 \pm 0.3$  mm; Idris et al. (2019)), ou quando combinado com o carvacrol, maior componente de vários óleos essenciais (MIC 1 mg/ml; Boik et al. (2018)).

A justificação para utilizar o óleo de coco como um antimicrobiano natural é que o ácido láurico (metabolito secundário) consegue desintegrar os lípidos que constituem a membrana das bactérias (DebMandal & Mandal, 2011), e a monolaurina, um monoéster do ácido láurico, consegue aumentar

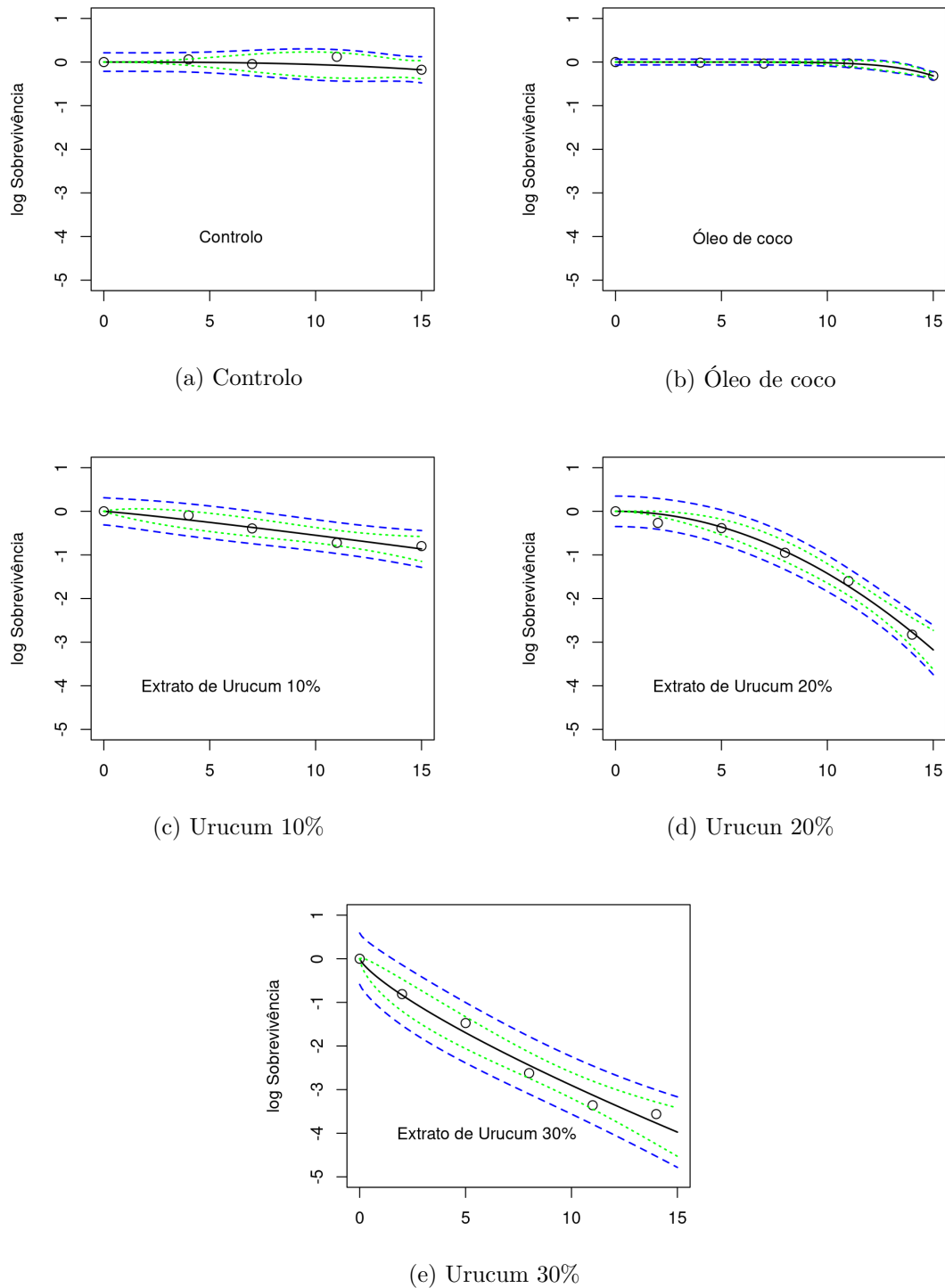


Figura 1: Curvas da sobrevivência ( $\ln(N_t/N_0)$ ) do *S. aureus* em bifes sem revestimento (controlo), revestidos com óleo de coco e revestidos com extrato oleoso de urucum com 10, 20 e 30%, embalados em atmosfera normal e armazenados a 5 °C. Para cada tratamento, mostra-se a curva ajustada pelo modelo de Weibull com os intervalos de confiança (verde) e de previsão (azul) a 95%. Eixo xx: Dias

o permeabilidade da membrana celular do *S. aureus*, provocando a lise celular (Tangwatcharin & Khopaibool, 2012; Warth, 1989). Devido às grandes diferenças nos resultados encontrados pelos investigadores anteriormente citados sobre as propriedades antimicrobianas do óleo de coco virgem, a sua efetividade contra *S. aureus* é questionável. É necessário realizar mais trabalho de investigação sobre este tema, para validar a capacidade do óleo de coco para inibir bactérias Gram negativas e Gram positivas, quer *in vitro* quer nos produtos alimentares. Neste trabalho *in situ*, o óleo de coco virgem não apresentou efeito inibidor relevante contra o *S. aureus* inoculado nos bifés, pelo menos em atmosfera normal e à concentração aplicada (1,0 ml de óleo de coco em 40 cm<sup>2</sup> de superfície de bife). Usar uma maior concentração de óleo de coco nos bifés resultou tecnicamente inviável.

A percentagem de urucum extraído em óleo de coco (10, 20 e 30%) afetou ( $P < 0,05$ ) a cinética de sobrevivência do *S. aureus* nos bifés, como se pode observar na Figura 1. Os extratos oleosos de urucum aceleraram a inativação microbiana em diferente medida, como se pode inferir dos parâmetros da Tabela 1. Curiosamente, verificou-se que o erro padrão residual dos modelos aumentou com o aumento do urucum extraído ( $s = 0,2251$  para 10%,  $s = 0,2890$  para 20%, e  $s = 0,4876$  para 30%). Isto pode ser um resultado da maior aleatoriedade com que as células bacterianas respondem (morrem) à medida que se incrementa o stress exercido sobre elas (concentração de urucum extraído). Os tratamentos apresentaram diferenças no que diz respeito à concavidade das curvas de sobrevivência do *S. aureus*: enquanto os extratos a 10% e 20% produziram curvas convexas, o extrato a 30% produziu uma curva côncava. Esta convexidade é representada pelos valores de  $\beta$  acima de 1,0 ( $\beta=1,113$  para 10% urucum, e  $\beta=1,979$  para 20% urucum). A Tabela 1 indica que a inativação ocorreu de maneira lenta, mas que, todavia, em determinado momento as células microbianas perderam toda resistência contra o extrato oleoso. Ao contrário, o extrato de urucum a 30% produziu um valor de  $\beta$  menor que 1,0 ( $\beta=0,775$ ), o que implica que *S. aureus* começou a ser inativado rapidamente embora em algum momento possa ter ganhado resistência.

A capacidade antimicrobiana dos extratos de sementes de urucum tem sido investigada por múltiplos autores. Vários estudos demonstraram que os extratos hidroalcoólicos de urucum possuem um amplo espectro de ação antimicrobiana, sendo capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas. No entanto, cada autor tem reportado um valor diferente de MIC e de diâmetro de inibição, estas variações podem resultar dos protocolos de quantificação utilizados, das diferentes concentrações do princípio ativo nos componentes da planta e dos seus respectivos extratos decorrentes das condições ambientais, como a região onde a planta é cultivada (clima, altitude e localização geográfica), o período de colheita, e porção da planta utilizada. Por exemplo, para extratos hidroalcoólicos de sementes de urucum, os MIC reportados contra *S. aureus* foram: 0,032 mg/ml (Ciro et al., 2014), 0,16 mg/ml (Galindo-Cuspinera et al., 2011) e 8,0 mg/ml (Arruda, 2016). Arruda (2016), Chisté et al. (2011), Coelho et al. (2003) e Tamil et al. (2011) atribuem a capacidade antimicrobiana dos extratos de urucum à sua composição fitoquímica, a qual inclui compostos bioativos derivados do seu metabolismo secundário, nomeadamente compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos, taninos) e carotenóides (beta caroteno, licopeno, luteína e bixina).

Cabe destacar que na literatura não foram encontrados trabalhos sobre o uso de óleo vegetal como solvente de extração de sementes de *Bixa orellana*, nem sobre as capacidades deste extrato contra microrganismos que compõem a flora normal humana ou até mesmo contra os responsáveis pela deterioração dos alimentos. Segundo Costa e Chaves (2005), a extração das sementes de urucum empregando óleo vegetal é feita somente na preparação comercial do corante colorau que contém entre 0,20 a 0,25% de bixina. Por outro lado, os únicos estudos onde se testaram extratos ou pó de urucum como antimicrobiano natural em matrizes alimentares são os de Van Cuong e Chin (2016), Yolmeh et al. (2014) e Zarringhalami et al. (2009). Zarringhalami et al. (2009) avaliaram a efetividade do urucum em salsichas inoculadas com 10<sup>2</sup> esporos de *Clostridium perfringens* por

100 g de amostra. As amostras foram refrigeradas a  $4 \pm 1$  °C durante 30 dias. A partir do 7º dia foi observado a não esporulação do *C. perfringens*. Van Cuong e Chin (2016) analisaram a atividade do pó de sementes de urucum em rissóis de carne de porco durante o armazenamento refrigerado. Foram adicionadas três diferentes concentrações de pó de sementes na preparação das amostras, sendo elas 0,1, 0,25 e 0,5%. Como resultado não foram observadas diferenças na contagem total de microrganismos entre as amostras controlo e os tratamentos, entretanto com adição do pó de urucum observou-se uma redução da contagem microbiana de *Enterobacteriaceae* a partir da aplicação superior a 0,25%. Yolmeh et al. (2014) examinaram o efeito de diferentes concentrações de extrato de urucum (0, 0,1, 0,2 e 0,4%) no crescimento da *E. coli* em maionese durante armazenamento refrigerado (4 °C) e à temperatura ambiente (25 °C). Como conclusão do trabalho, observou-se uma maior redução de *E. coli* na temperatura de 25 °C quando comparada com a de 4 °C, sendo a partir do 12º dia e do 15º dia de armazenamento, respectivamente, a inibição do crescimento da *E. coli*. Devido à indisponibilidade de estudos de desafio para quantificar a capacidade antimicrobiana do óleo de coco virgem e do extrato oleoso de urucum aplicados a matrizes alimentares, especificamente em carne fresca, foi uma motivação extra para a realização deste trabalho.

### 3.2 SOBREVIVÊNCIA DO *S. AUREUS* EM BIFES EMBALADOS A VÁCUO

As curvas experimentais de sobrevivência do *S. aureus* nos bifés embalados a vácuo podem ser visualizadas na Figura 2, para o controlo e para os tratamentos com revestimento. Podemos observar que, mais uma vez, o modelo Weibull foi capaz de descrever satisfatoriamente a inativação do *S. aureus*; embora, em comparação com os tratamentos armazenados em atmosfera normal, nos tratamentos a vácuo o erro padrão residual dos modelos foi superior (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros do modelo de Weibull que descreve o logaritmo natural da redução ( $\ln(N_0/N_t)$ ) nas contagens de *S. aureus* no controlo e nos tratamentos com óleo de coco e com extrato oleoso de urucum, embalados a vácuo e armazenados a 5 °C. O erro padrão residual (S) é apresentado para cada modelo.

Revestimento	Parâmetro	Média	Erro Padrão	Pr(> t )	S
Controlo	Declive ( $\sigma$ )	3,081	1,039	0,016	0,4027
	Forma ( $\beta$ )	0,611	0,174	0,006	
Extrato urucum 0% óleo de coco	Declive ( $\sigma$ )	3,226	1,624	0,078	0,7071
	Forma ( $\beta$ )	0,700	0,303	0,046	
Extrato urucum 10% óleo de coco	Declive ( $\sigma$ )	2,894	1,270	0,107	0,5636
	Forma ( $\beta$ )	0,913	0,327	0,068	
Extrato urucum 20% óleo de coco	Declive ( $\sigma$ )	1,320	0,099	<0,001	0,2890
	Forma ( $\beta$ )	1,051	0,041	<0,001	
Extrato urucum 30% óleo de coco	Declive ( $\sigma$ )	0,015	0,008	0,118	0,4876
	Forma ( $\beta$ )	0,248	0,020	<0,001	

Uma diferença importante observada entre as curvas de sobrevivência microbiana produzidas sob atmosfera normal (Figura 1) e sob vácuo (Figura 2) foi a presença e a ausência de “ombro”, respectivamente, no início do armazenamento. Em atmosfera normal, o *S. aureus* apresentou uma fase inicial de resistência à inativação ou de inativação demorada - conhecida como ombro - em todos os tratamentos, exceto o de revestimento a 30%. Em contrapartida, sob condições de vácuo, as curvas experimentais do *S. aureus* não apresentaram a fase de ombro, pelo que o decréscimo de *S. aureus* foi quase imediato. Matematicamente, são as curvas de sobrevivência côncavas as que não apresentam ombro, por conseguinte os valores do parâmetro de forma ( $\beta$ ) foram menores que 1,0 para todos os tratamentos a vácuo, exceto o de 20% extrato de urucum (Tabela 2). A ausência de ombro nas curvas dos tratamentos a vácuo evidencia que esta embalagem atua como mais um mecanismo inibidor do *S. aureus* na carne fresca, de forma que a baixa temperatura somada à falta de oxigênio produz uma inativação imediata após o armazenamento.

No tratamento controlo, os bifes armazenados em atmosfera normal o *S. aureus* não foi inativado, mas nos bifes armazenados a vácuo, embora lentamente, o *S. aureus* sofreu inativação, o que sugere que o armazenamento a vácuo têm um efeito sinérgico na inativação deste patógeno. O mesmo foi observado nos bifes revestidos com óleo de coco (0% urucum), nos quais a inativação do *S. aureus* nos bifes embalados a vácuo (Figura 2) foi superior à dos bifes embalados a atmosfera normal (Figura 1). Neste caso, pode ter ocorrido sinergia entre as temperaturas de refrigeração, a ausência de oxigênio e os componentes antimicrobianos presentes no óleo de coco virgem.

O efeito do vácuo na inativação do *S. aureus* observa-se pelo menores valores de ambos parâmetros ( $\sigma$ ,  $\beta$ ) do modelo de Weibull (Tabela 2), quando comparados com os parâmetros obtidos para os tratamentos em atmosfera normal (Tabela 1); isto evidencia que quando *S. aureus* se encontra em condições de ausência de oxigênio, a população é mais rapidamente inativada, confirmando assim a capacidade desta embalagem para inibir ou retardar crescimento microbiano, o qual pode ser explorado, em combinação com outros fatores intrínsecos estressantes, para intensificar a inativação. Ao embalar a carne a vácuo, a atmosfera gasosa em torno da sua superfície é alterada e a pequena quantidade de oxigênio presente no interior da embalagem é consumida pela atividade metabólica da carne e das bactérias ao longo do armazenamento. Desta forma, um micro sistema anaeróbico é criado dentro da embalagem e com o auxílio do efeito inibitório do  $CO_2$  que é liberado na respiração ocorre o retardamento da multiplicação das bactérias responsáveis pela deterioração da carne (Melo et al., 2011). Este sistema beneficia a predominância de bactérias anaeróbicas facultativas deteriorantes, sobretudo as lácticas, Enterobacteriaceae e psicrotróficas, que possuem a capacidade para se multiplicarem a baixas temperaturas (Chaves, 2010).

É de ressaltar que o tratamento dos bifes recobertos com extrato oleoso de urucum a 30% causou uma inativação imediata do *S. aureus*, o que se deduz pela acentuada concavidade da sua curva de sobrevivência (Figura 2). No entanto, a partir do quinto dia de armazenamento, a inativação foi muito lenta e assintótica, sugerindo que *S. aureus* poderá ter adquirido alguma resistência contra o antimicrobiano apesar da alta concentração utilizada. De fato, este foi o único tratamento onde se observou este tipo de comportamento cinético. É, portanto, necessário realizar novos ensaios de carne embalada a vácuo em que se utilize o extrato oleoso de urucum com concentração igual ou superior a 30%, para corroborar se o *S. aureus* adquire resistência.

Os parâmetros do modelo de Weibull ( $\sigma$  e  $\beta$ ) não são de interpretação intuitiva; por esta razão os parâmetros ajustados  $\sigma$  e  $\beta$  foram utilizados para estimar outro parâmetro mais intuitivo, pela relação direta com o nível de letalidade dos tratamentos, o tempo necessário para atingir a primeira redução decimal do *S. aureus* (redução em  $1 \log CFU/cm^2$ ). A Tabela 3 mostra os tempos de letalidade dos tratamentos em atmosfera normal e a vácuo, com os intervalos de confiança de 95% para as estimativas.

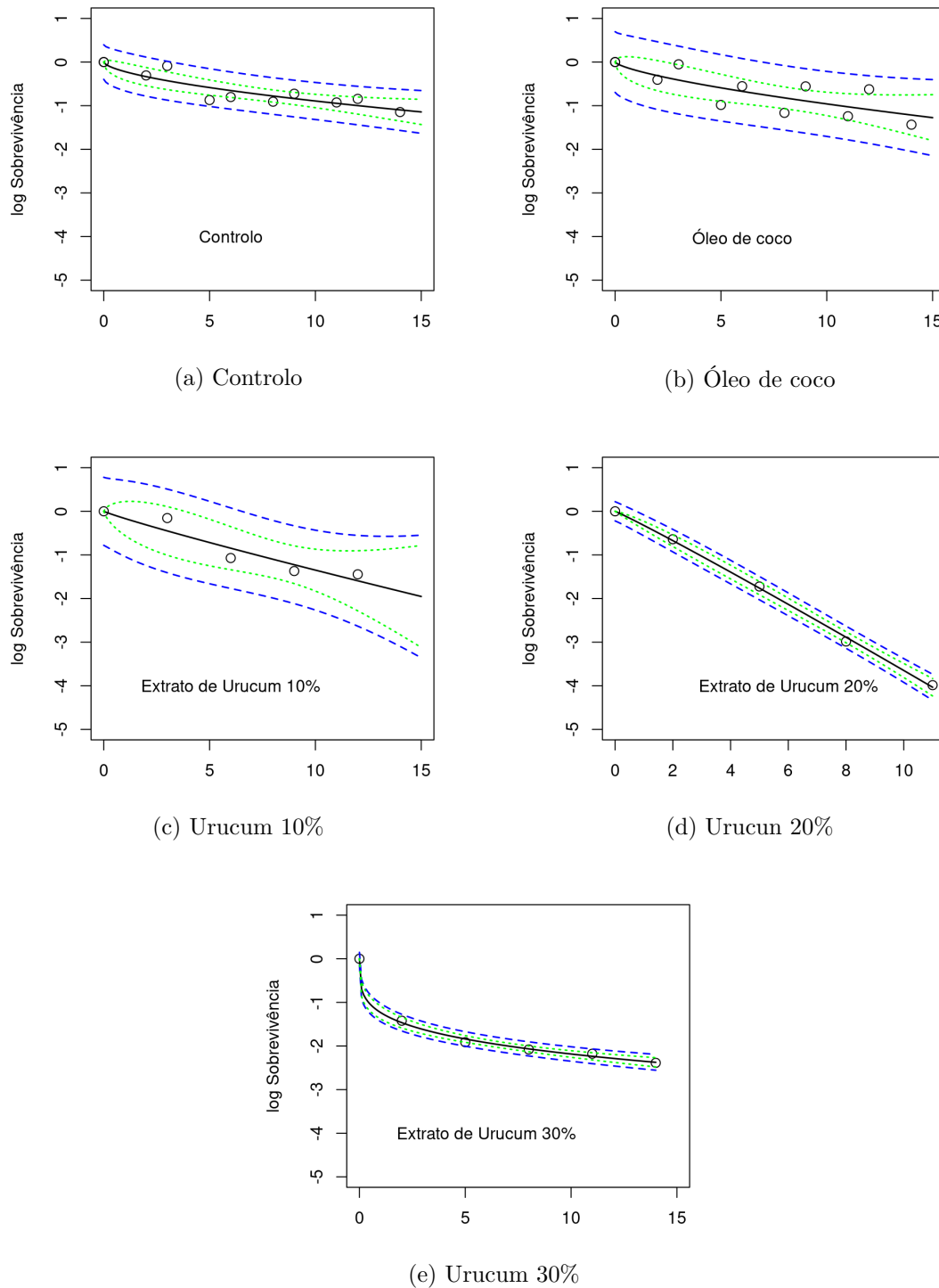


Figura 2: Curvas de sobrevivência ( $\ln(N_t/N_0)$ ) do *S. aureus* em bifés sem revestimento (controlo), revestidos com óleo de coco e revestidos com extrato oleoso de urucum com 10, 20 e 30%, embalados a vácuo e armazenados a 5 °C. Em cada tratamento, mostra-se a curva ajustada pelo modelo de Weibull com os intervalos de confiança (verde) e de previsão (azul) ao 95%. Eixo xx: Dias

Para os bifes refrigerados pertencentes ao grupo controlo e os revestidos com óleo de coco, embalados em atmosfera normal, não foi possível determinar os dias necessários para que ocorresse a primeira redução decimal do *S. aureus*, uma vez a que a inativação observada nestes dois tratamentos foi insuficiente (Figura 1). Estes resultados apontam que para os bifes controlo em atmosfera normal, o fator temperatura baixa não foi suficiente para obter a redução microbiana, nem para os bifes revestidos com óleo de coco, o óleo não teve qualquer função antimicrobiana contra *S. aureus*. Já para os bifes revestidos com óleo de coco e extrato de urucum, os resultados são diferentes, e foi possível calcular a letalidade.

Tabela 3: Tempo (dias) necessário para atingir uma redução de *S. aureus* em  $1 \log CFU/cm^2$  em bifes não revestidos e revestidos com óleo de urucum (0, 10, 20 ou 30%), embalados em atmosfera normal ou a vácuo e armazenados a 5 °C.

Tratamento	Atmosfera		Vácuo	
	Tempo	IC 95%	Tempo	IC 95%
Controle	NE	NE	12,04	[3,320 - 20,77]
Óleo de coco	NE	NE	10,60	[0,795 - 22,01]
Extrato urucum 10%	14,42	[8,080 - 20,81]	7,208	[0,113 - 14,30]
Extrato urucum 20%	8,364	[6,585 - 10,14]	2,917	[2,174 - 3,659]
Extrato urucum 30%	2,531	[0,243 - 4,819]	0,430	[0,047 - 0,813]

NE: Valor não estimável

Ao revestir os bifes, contaminados com *S. aureus*, com o extrato oleoso observou-se que o aumento da percentagem de urucum extraído conduziu a uma diminuição do tempo necessário para reduzir *S. aureus* em  $1 \log CFU/cm^2$ , demonstrando assim a capacidade antimicrobiana dos extratos oleosos contra este patogénico. Para os bifes do tratamento de extrato de urucum a 30%, a primeira redução decimal foi alcançada em 2,531 dias; para os bifes do tratamento com extrato a 20%, o tempo necessário foi de 8,364 dias; e para os bifes que do tratamento com extrato a 10%, o tempo necessário foi bastante alto, 14,42 dias.

Para os bifes embalados a vácuo, foi possível estimar o tempo de letalidade em todos os tratamentos aplicados. No tratamento controlo embalado a vácuo, a primeira redução decimal estimou-se em cerca de 12,04 dias de armazenamento refrigerado, enquanto este tempo é ligeiramente menor, 10,60 dias, para os bifes revestidos com óleo de coco. Mais uma vez, nos bifes revestidos de extrato de urucum e embalados a vácuo, o tempo para a redução decimal ocorreu de forma gradativa: quanto maior a percentagem de extrato aplicada maior a redução obtida no *S. aureus*. Para o tratamento com extrato a 30%, o tempo necessário foi de 0,430 dias (~10 horas); para o tratamento com extrato a 20%, o tempo necessário foi de 2,917 dias; e para o tratamento com extrato a 10%, o tempo necessário foi de 7,208 dias.

Comparando a letalidade dos extratos de urucum nas duas atmosferas, observou-se que o uso de vácuo reduziu para metade o tempo necessário para atingir a primeira redução decimal, nos bifes cobertos com extrato a 10% (de 14,42 dias para 7,208 dias); para o tratamento com extrato a 20%, o vácuo reduziu o tempo da redução decimal para um terço do valor em atmosfera (de 8,364 para 2,917 dias); e para o tratamento com extrato a 30%, o vácuo reduziu o tempo de redução decimal para um sexto do valor em atmosfera (de 2,531 para 0,430 dias). O forma de preparação dos bifes, a aplicação dos tratamentos, a temperatura e os dias de armazenamento foram iguais para todos

os bifés, sendo a única diferença o sistema de acondicionamento utilizado. A embalagem a vácuo, por si só, já consegue retardar o crescimento do patogénico presente na carne, e a aplicação de revestimentos com capacidade antimicrobiana aumenta o efeito de inibição.

Tabela 4: Modelos secundários para o declive do modelo de Weibull ( $\sigma$ ) e para o tempo para atingir a primeira redução decimal ( $t_{1log}$ ) na concentração de *S. aureus* [ $logCFU/cm^2$ ] em bifés revestidos com óleo de coco com extrato de urucum. Cada equação apresenta o erro residual da regressão (se) e o coeficiente de determinação ajustado ( $R_{adj}^2$ ).

Parâmetro	Equação	se	$R_{adj}^2$
Declive ( $\sigma$ )			
Atmosfera	$\sigma = 14,578 - 0,4699(Extracto\%)$	1,513	0,409
Vácuo	$\sigma = 3,545 - 0,1120(Extracto\%)$	0,940	0,920
Redução ( $1log(t_{1log})[dia]$ )			
Atmosfera	$t_{1log} = 20,333 - 0,595(Extracto\%)$	0,041	0,543
Vácuo	$t_{1log} = 10,504 - 0,384(Extracto\%)$	0,999	0,986

### 3.3 MODELAÇÃO SECUNDÁRIA DA CINÉTICA DO *S. AUREUS*

Para avaliação da cinética de inativação do *S. aureus* nos bifés, exercida pelo revestimento de extrato oleoso de urucum, ajustaram-se modelos secundários aos parâmetros do modelo de Weibull. Observou-se que a percentagem de urucum teve um efeito linear no parâmetro de declive ( $\sigma$ ) em ambos tipos de embalagem, atmosfera normal e vácuo (Figura 3).

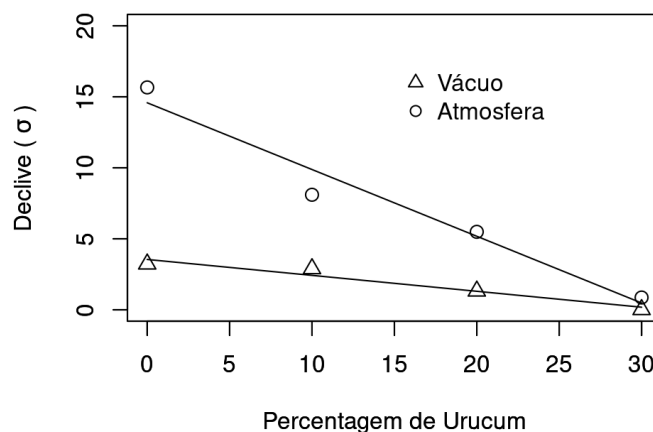


Figura 3: Parâmetro de declive ( $\sigma$ ) do modelo de Weibull que descreve a sobrevivência do *S. aureus* em bifés revestidos embalados a vácuo ou em atmosfera normal, em função da percentagem de urucum extraído em óleo de coco.

Depreende-se da Figura 3 que à medida que o nível de urucum aumenta, a diferença no declive ( $\sigma$ ) entre os tratamentos de atmosfera normal e de vácuo diminui de forma progressiva. Isto acontece porque a maiores doses de urucum, os extratos provavelmente têm uma ação inibidora do *S. aureus* inferior à da ação do vácuo. Devido a esta clara dependência linear do declive em relação à percentagem de urucum extraído, foi ajustado um modelo de regressão linear simples a cada um dos tipos de embalagem.

Os resultados desta regressão apresentam-se na Tabela 4. Já para o parâmetro de forma ( $\beta$ ), não se observou qualquer relação com a percentagem de urucum presente no óleo de coco. Esta ausência de correlação foi observada tanto nos tratamentos de atmosfera como nos tratamentos a vácuo, e pode ser apreciada na Figura 4. No entanto, este resultado já tem sido observado em outros trabalhos que investigaram a sobrevivência de diferentes bactérias noutros produtos alimentares, onde o  $\beta$  apresenta pouca ou nenhuma relação com as condições ambientais ou propriedades intrínsecas dos alimentos.

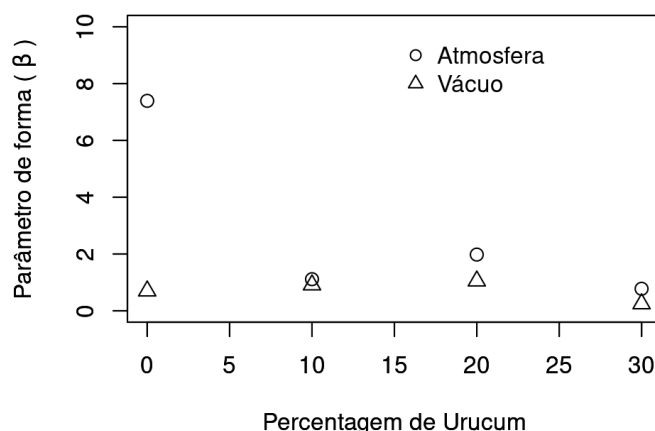


Figura 4: Parâmetro de forma ( $\beta$ ) do modelo de Weibull mostrando ausência de correlação com a percentagem de urucum extraído em óleo de coco para revestimento de bifes embalados a vácuo ou em atmosfera normal.

No que diz respeito ao tempo em dias para atingir a primeira redução decimal ( $t_{1log}$ ), este parâmetro de letalidade apresentou uma relação linear com a percentagem de urucum extraída em óleo de coco, em ambos tipos de embalagem, atmosfera normal e vácuo (Figura 5). Assim, como aconteceu com o parâmetro de declive ( $\sigma$ ), podemos observar que a diferença de  $t_{1log}$  entre atmosfera e vácuo diminuiu de forma progressiva com o aumento da percentagem de urucum. O fato das linhas de ajuste das Figuras 3 e 5 não serem paralelas evidencia que ocorre uma interação entre o tipo de embalagem e a percentagem de urucum extraído. Os modelos de regressão linear para os dois tipos de atmosfera apresentam-se na Tabela 4.

Como se pode apreciar nas Figuras 3 e 5, os modelos secundários apresentaram um bom ajuste, com coeficientes de determinação ajustados ( $R^2_{adj}$ ) variando entre 0,920 e 0,999; o qual denota que mais do 92% da variação no declive e na redução decimal é explicada pelos níveis de urucum extraídos em óleo.

Neste trabalho, a contaminação com *S. aureus* foi intencional; logo a escolha por fazer análises

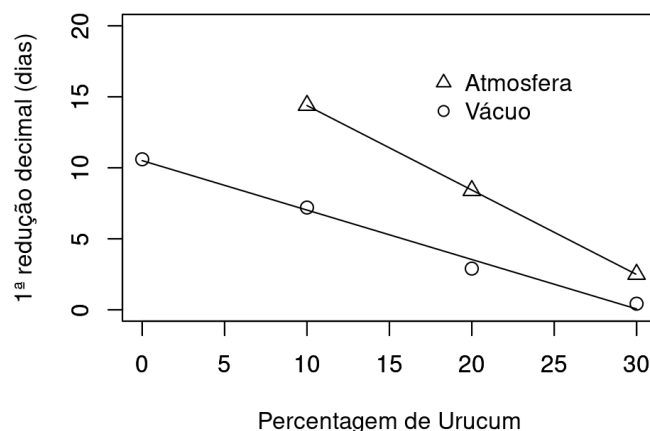


Figura 5: Tempo em dias ( $t_{1log}$ ) para atingir a primeira redução decimal de *S. aureus* em bifés embalados a vácuo ou em atmosfera normal, em função da porcentagem de urucum extraído em óleo de coco.

com este microrganismo e não com os que dadas as condições de refrigeração e vácuo conseguem desenvolver-se melhor (por exemplo a *Listeria monocytogenes*) está associada com a elevada prevalência em carnes *in natura*, pois no processo de abate e processamento não existe nenhuma etapa bactericida. Mais ainda, as carnes podem sofrer contaminação por *S. aureus* mediante contaminação cruzada procedente da pele, dos instrumentos e equipamentos, assim como dos manipuladores. Este trabalho mostra, pela primeira vez, o efeito antimicrobiano *in situ* do extrato oleoso de sementes de urucum em carne bovina, bem como a modelação da cinética microbiana do *S. aureus* em bifés revestidos com este extrato. Com base nos resultados obtidos, este trabalho propõe a utilização desta cobertura para se obter uma inibição ou proteção contra o patogénico, contribuindo também para intensificar a cor e o sabor do produto. Uma aplicação potencial e nova do extrato oleoso de urucum seria o revestimento de carnes de bovino pré-preparadas para churrasco.

## 4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o armazenamento dos bifés inoculados com *S. aureus* à temperatura de refrigeração não é suficiente para que ocorra a sua inibição, sendo necessário utilizar embalagem a vácuo para estes dois parâmetros atuarem sinergicamente para alcançar um efeito bactericida contra o patogénico. O modelo de Weibull utilizado para modelar a cinética de sobrevivência do *S. aureus* em bifés refrigerados, em atmosfera normal e a vácuo, indicou que o óleo de coco virgem funciona como agente antimicrobiano somente nos bifés revestidos e embalados a vácuo, uma vez que para os armazenados em atmosfera normal não foi observada a redução ao longo dos 14 dias da experiência.

O extrato de urucum obtido a partir da extração das sementes de urucum em óleo de coco apresentou resultados satisfatórios em relação ao seu efeito antimicrobiano contra este microrganismo patogénico. Ao comparar os dois tipos de acondicionamento, uma maior efetividade foi encontrada

quando os bifos revestidos com o extrato foram embalados a vácuo. A capacidade de inibição foi gradativa, ou seja, quanto maior a concentração do extrato maior foi seu poder bactericida. Nos bifos embalados em atmosfera normal, o *S. aureus* apresentou uma resistência inicial à inativação, a qual se manifestou como uma fase de “ombro” nas curvas cinéticas de sobrevivência - com exceção dos bifos revestidas com extrato de urucum a 30%. Em oposição, nos bifos refrigerados embalados a vácuo o *S. aureus* sofreu inativação quase imediata, o que se refletiu na concavidade das curvas de sobrevivência. Contudo, apesar do tratamento com 30% de urucum ter produzido uma inativação muito acentuada nos primeiros dias de armazenamento, após um determinado tempo, o extrato não foi capaz de o inibir; o que pode sugerir o desenvolvimento de certa adaptação deste patogénico ao agente antimicrobiano.

Face ao crescente interesse no desenvolvimento de antimicrobianos naturais eficazes, o extrato oleoso de *Bixina orellana* apresenta-se como um antimicrobiano promissor que pode ser aplicado como revestimento de carnes de bovino *in natura* para o controle do *S. aureus*; e até poderá também constituir uma alternativa natural e eficaz em produtos cárneos. Uma aplicação potencial e inovadora que se depreende deste estudo é a utilização do extrato oleoso de urucum como revestimento de carnes de bovino pré-preparadas para churrasco, conferindo à carne não só cor e sabor intensificados, mas também proteção contra o desenvolvimento do *S. aureus*.

## APOIOS

Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) e aos fundos nacionais FCT/MCTES (PIDDAC) pelo apoio financeiro ao CIMO (UIDB/00690/2020 e UIDP/00690/2020) e SusTEC (LA/P/0007/2021); ao Programa PRIMA e Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) pelo financiamento do projecto ArtiSaneFood (PRIMA/0001/2018).

Ursula Gonzales-Barron agradece à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal), through the Institutional Scientific Employment Program contract.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. A., ASSIKONG, E. B., AKEH, M., UPLA, P. & TULUMA, T. (2017). Antimicrobial activity of coconut oil and its derivative (lauric acid) on some selected clinical isolates. *International Journal of Medical Science and Clinical Inventions*, 4(8), 3173–3177. <https://doi.org/10.18535/ijmsci/v4i8.12>
- ARRUDA, M. O. (2016). *Atividade antimicrobiana e anti-inflamatória de produtos naturais sobre patógenos respiratórios* (tese de doutoramento). Universidade Federal do Maranhão.
- AZIZ, M. & KARBOUNE, S. (2015). Natural antimicrobial/antioxidant agens in meat and poultry products as well as fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(3), 486–511. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1194256>
- BORCH, E., NESBAKKEN, T. & CHRISTENSEN, H. (1996). Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 30((1-2)), 9–25. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00988-9](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00988-9)
- BOIK, M., HOVORKOVÁ, P. & KLOUEK, P. (2018). Antibacterial effect of carvacrol and coconut oil on selected pathogenic bacteria. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 49(1), 46–52. <https://doi.org/10.2478/sab-2018-0008>
- CHAVES, R. D. (2010). *Avaliação microbiológica e do potencial de estufamento por bacterias acido laticas e enterobacterias em cortes bovinos embalado a vácuo* (tese de mestrado). Universidade Estadual de Campinas.

- CHISTÉ, R. C., BENASSI, M. T. & MERCADANTE, A. Z. (2011). Effect of solvent type on the extractability of bioactive compounds, antioxidant capacity and colour properties of natural annatto extracts. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(9), 1863–1870. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02693.x>
- CIRO, G. L., ZAPATA, J. E. & LÓPEZ, J. (2014). In vitro evaluation of Bixa orellana L. (Annatto) seeds as potential natural food preservative. *Journal of Medicinal Plant Research*, 8, 772–779. <https://doi.org/10.5897/jmpr2013.5341>
- COELHO, A. M. S. P., SILVA, G. A. d., VIEIRA, O. M. C. & CHAVASCO, J. K. (2003). Atividade antimicrobiana de Bixa orellana L. (Urucum). *Lecta-USF*, 21((1/2)), 47–54.
- COSTA, C. L. S. D. & CHAVES, M. H. (2005). Extração de pigmentos das sementes de Bixa orellana L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. *Química Nova*, 28(1), 149–152. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422005000100026>
- DE SOUZA, M. C., TEIXEIRA, L. J. Q., ROCHA, G. A. M. F. & FILHO, T. L. (2013). Emprego do frio na conservação de alimentos. *Enciclopédia Biosfera-Centro Científico Conhecer*, 9(16), 1027–1046.
- DEBMANDAL, M. & MANDAL, S. (2011). Coconut (Cocos nucifera L.: Arecaceae): In Health Promotion and Disease Prevention. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4, 241–247. [https://doi.org/10.1016/s1995-7645\(11\)60078-3](https://doi.org/10.1016/s1995-7645(11)60078-3)
- de LIMA, E. S. C., PINTO, P. S. A., dos SANTOS, J. L., VANETTI, M. C. D., BEVILACQUA, P. D., de ALMEIDA, L. P., PINTO, M. S. & DIAS, F. S. (2004). Isolamento de Salmonella spp. e Staphylococcus aureus no processo do abate suíno como subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 24(4), 185–190. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2004000400003>
- EFFIONG, E., GWANA, D. & OKARO, C. (2018). Antimicrobial susceptibility pattern of coconut oil extract on selected bacterial and fungi. *Inter Ped Dent Open Acc J*, 1(3). <https://doi.org/10.32474/ipdoaj.2018.01.000115>
- EFSA. (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(12), 6971. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
- FELLOWS, P. J. (2018). *Tecnologia do processamento de alimentos-princípios e prática* (N. J. A., Ed.). Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- GALINDO-CUSPINERA, V., WESTHOFF, D. C. & RANKIN, S. A. (2011). Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage microorganisms. *Journal of Food Protection*, 66(6), 1074–1078. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.6.1074>
- HANSON, B. M., DRESSLER, A. E., HARPER, A. L., SCHEIBEL, R. P., WARDYN, S. E., ROBERTS, L. K., KROEGER, J. S. & SMITH, T. C. (2011). Prevalence of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) on retail meat in Iowa. *Journal of Infection and Public Health*, 4(4), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2011.06.001>
- HANSSON, I. B. (2001). Microbiological meat quality in high- and low-capacity slaughterhouse in Sweden. *Journal of Food Protection*, 64(6), 820–825. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.6.820>
- HOFFMANN, F. L. (2001). Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. *Brasil Alimentos*, 9(1), 23–30.
- HOVORKOVÁ, P., LALOUKOVÁ, K. & SKIVANOVÁ, E. (2018). Determination of in vitro antibacterial activity of plant oils containing medium-chain fatty acids against gram-positive pathogenic and gut commensal bacteria. *Czech Journal of Animal Science*, 63(3), 119–125. <https://doi.org/10.17221/70/2017-cjas>

- IDRIS, I. S., KARIM, H. & PAGARRA, H. (2019). Antimicrobial and antioxidant activities from a combination of Swietenia mahagoni seed extract and virgin coconut oil (VCO). *Journal of Physics: Conference Series*. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1244/1/012045>
- JANSEN, P. C. M. (2005). *Bixa orellana* (P. C. M. JANSEN & D. CARDON, Eds.). PROTA Foundation. Acessado 5 Abril 2019.
- LÓPEZ-GUTIÉRREZ, L., BETTIN-MARTÍNEZ, A. & SUÁREZ-MAHECHA, H. (2017). Methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from meat raw in Cartagena, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 70(1), 8091–8098. <https://doi.org/10.15446/rfna.v70n1.61768>
- MELO, C. S. d., MESQUITA, A. J. d., REZENDE, C. S. M., SERAPHIN, J. C., OLIVEIRA, M. B. d. & BUENO, C. P. (2011). Dinâmica microbiana em contrafilés bovinos embalados a vácuo: sistemas de terminação e tempo de estocagem. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 70(4), 528–533.
- NAGASE, S., MATSUE, M., MORI, Y., HONDA-OGAWA, M., SUGITANI, K., SUMITOMO, T., NAKATA, K. M., SHIGETADA, O. & SHIGEFUMI. (2017). Comparison of the antimicrobial spectrum and mechanisms of organic virgin coconut oil and lauric acid against bacteria. *J Wellness Health Care*, 41(1), 87–95.
- OZDEMIR, H. & KEYVAN, E. (2016). Isolation and characterisation of Staphylococcus aureus strains isolated from beef, sheep and chicken meat. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.*, 63, 333–338. [https://doi.org/10.1501/vetfak\\_0000002749](https://doi.org/10.1501/vetfak_0000002749)
- PRATHIMA, D., SUJITHA, A. & USHA, R. (2016). Phytochemical screening and antimicrobial activity of Bixa orellana Linn. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(7), 1078–1082. <http://impactfactor.org/PDF/IJPPR/8/IJPPR,Vol8,Issue7,Article3.pdf>
- QUINTERO-QUIROZ, J., NARANJO DURAN, A. M., SILVA GARCIA, M., GOMEZ, C., LUZ, G. & ROJAS CAMARGO, J. J. (2019). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from annatto seeds, evaluation of their antimicrobial and antioxidant activity, and identification of main compounds by LC/ESI-MS analysis. *International Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1155/2019/3721828>
- R CORE TEAM. (2022). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- RAGA, D. D., ESPIRITU, R. A., SHEN, C.-C. & RAGASA, C. Y. (2011). A bioactive sesquiterpene from Bixa orellana. *Journal of Natural Medicine*, 65(1), 206–211. <https://doi.org/10.1007/s11418-010-0459-9>
- ROJAS, J. J., OCHOA, V. J., OCAMPO, S. A. & MUÑOZ, J. F. (2006). Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-2>
- SELVI, A., DINESH, M., SATYAN, R., CHANDRASEKARAN, B. & ROSE, C. (2011). Leaf and seed extracts of Bixa orellana L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(9), 116–120. [https://japsonline.com/admin/php/uploads/273\\_pdf.pdf](https://japsonline.com/admin/php/uploads/273_pdf.pdf)
- TAMIL, S. A., DINESH, M., SATYAN, R., CHANDRASEKARAN, C. & ROSE, B. (2011). Leaf and seed extracts of Bixa orellana L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(9), 116–120. [https://japsonline.com/admin/php/uploads/273\\_pdf.pdf](https://japsonline.com/admin/php/uploads/273_pdf.pdf)
- TANGWATCHARIN, P. & KHOPAIBOOL, P. (2012). Activity of virgin coconut oil, lauric acid or monolaurin in combination with lactic acid against Staphylococcus aureus. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health*, 43(4), 969–985.

- TORTORA, G. J., CASE, C. L. & FUNKE, B. R. (2016). *Microbiologia industrial e aplicada* (F. G. FONSECA, A. P. G. FRAZZON & J. FRAZZON, Eds.; 12<sup>1</sup>). Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- VAN BOEKEL, M. A. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, 74((1-2)), 139–159. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00742-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00742-5)
- VAN CUONG, T. & CHIN, K. m. (2016). Effects of annatto (*Bixa orellana* L.) seeds powder on physicochemical properties, antioxidant and antimicrobial activities of pork patties during refrigerated storage. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(4), 476.
- WARTH, A. D. (1989). Transport of benzoic and propanoic acids by *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology*, 135(5), 1383–1390. <https://doi.org/10.1099/00221287-135-5-1383>
- WIDIANINGRUM, D. C., NOVIANDI, C. T. & SALASIA, S. I. O. (2019). Antibacterial and immunomodulator activities of virgin coconut oil (VCO) against *Staphylococcus aureus*. *Heliyon*, 5(10), 2612. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02612>
- WU, S., HUANG, J., WU, Q., ZHANG, J., YANG, X., WU, H., ZENG, H., CHEN, M., DING, Y., WANG, J., LEI, T., ZHANG, S. & XUE, L. (2018). *Staphylococcus aureus* isolated from retail meat and meat products in China: Incidence, antibiotic resistance and genetic diversity. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2767. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02767>
- YOLMEH, M., NAJAFI, M. B. H., FARHOOSH, R. & SALEHI, F. (2014). Modeling of antibacterial activity of annatto dye on *Escherichia coli* in mayonnaise. *Food Bioscience*, 8, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2014.09.001>
- ZARRINGHALAMI, S., SAHARI, M. & HAMIDI-ESFEHANI, Z. (2009). Partial replacement of nitrite by annatto as a colour additive in sausage. *Meat Science*, 81(1), 281–284. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.08.003>

## FILIAÇÃO:

**Karinne Novaes, Sara Coelho-Fernandes, Gisela Rodrigues, Vasco A. P. Cadavez**

**Ursula Gonzales-Barron:**

- (1) Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal;
- (2) Laboratório para a Sustentabilidade e Tecnologia em Regiões de Montanha, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal