



**Modelação da Sobrevivência de *Staphylococcus aureus* em
Bifes Revestidos com Extrato Oleoso de Sementes de
Urucum (*Bixa orellana* L.)**

Karinne Novaes de Moraes

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do
Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito de Dupla Diplomação
com o Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca*

Orientada por:

Dr^a. Ursula Gonzales Barron

Dr. Vasco Cadavez

Dr. Fabiano Alves de Oliveira

Bragança

Mai 2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, Maria José Novaes e ao meu pai José Geraldo de Moraes (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo apoio, em especial, a minha mãe Maria José, prima Aline e Tia Salete pelo amor e a confiança que depositaram em mim durante todo esse meu ciclo acadêmico, que teve início na minha mudança para uma nova cidade e terminou comigo vivendo em outro país. Sem vocês, eu não seria capaz de enfrentar tudo isso.

Um agradecimento especial à Dr^a. Ursula Gonzales Barron e ao Dr. Vasco Cadavez, líderes da equipe de investigação Food Safety and Quality Analytics, por terem sido meus orientadores durante este trabalho. Obrigada pela disponibilidade, supervisão, paciência e por terem confiado em mim para a execução desta investigação. Agradeço também a equipe do laboratório de bacteriologia do CIMO, principalmente a Gisela Rodrigues por ter me ajudado e oferecido seu tempo, até nos fins de semana, para me auxiliar na realização das análises.

Agradeço a meus amigos por sempre demonstrarem o quanto sentem orgulho de mim e aos que tiveram comigo durante toda a jornada do curso dando força para não desistir e estudando incansavelmente para as provas, sobretudo a Lidiane que nesta reta final me ouviu e me motivou. Obrigada por todas as palavras de apoio e pela sua força.

Sou grata ao corpo docente do CEFET/RJ campus Valença do curso de Engenharia de Alimentos por todo ensinamento para que eu pudesse me tornar uma profissional qualificada e uma pessoa melhor. Agradeço ao professor Dr. Fabiano Alves de Oliveira que prontamente aceitou ser meu orientador do Brasil mostrando disponibilidade em me ajudar na realização dessa dissertação. Quero agradecer também ao professor Dr. Marcus Vinicius Pereira de Souza por ter sido meu primeiro orientador em um projeto de iniciação científica, despertando em mim essa paixão por investigação.

Por fim, gostaria de agradecer ao CIMO por ter disponibilizado todos equipamentos e materiais necessários para a realização dessa pesquisa e ao Instituto Politécnico de Bragança que em parceria com CEFET/RJ campus Valença criaram o programa de dupla diplomação entre as instituições, proporcionando para mim uma experiência única para minha vida pessoal e profissional.



RESUMO

Os extratos obtidos a partir das sementes de *Bixa orellana* L. (urucum) são amplamente utilizados na indústria alimentar como um corante natural. Além disso, a composição química destas sementes tem sido associada à capacidade de retardar a deterioração de alimentos propícios a contaminação microbiana. Assim, a presente tese teve por objetivo geral avaliar o efeito antimicrobiano dos extratos de urucum, em um alimento muito propício à contaminação microbiana, a carne fresca, sobre *Staphylococcus aureus*, o qual é um patógeno de alta relevância nesta matriz alimentar. Este objetivo foi alcançado pela realização de duas experiências que visaram: (1) realizar uma síntese meta-analítica da capacidade antimicrobiana *in vitro* dos diversos extratos de urucum sobre *S. aureus*; e (2) caracterizar, mediante modelos de microbiologia preditiva, a cinética de sobrevivência do *S. aureus*, durante o período de refrigeração, em bifes de carne bovina revestidos com extrato de sementes de urucum em óleo de coco, embalados em atmosfera normal e a vácuo.

Para a modelação meta-analítica do diâmetro de inibição e da concentração mínima inibitória (MIC), referente à capacidade antimicrobiana *in vitro* destes extratos sobre o patógeno em questão, foi realizada uma revisão sistemática seguida da extração de dados de 17 artigos com informações consideradas relevantes. Para os dados de diâmetro de inibição encontrados nos artigos, aplicaram-se três modelos meta-analíticos com moderadores, e para o MIC realizou-se uma meta-análise de subgrupos sem moderadores.

O Modelo 1 que testou os efeitos do solvente, da concentração do extrato e da parte da planta, demonstrou um efeito significativo da concentração do extrato ($p < 0,001$) no diâmetro de inibição, bem como permitiu evidenciar diferenças entre solventes ($p < 0,001$) na sua eficácia na extração de compostos antimicrobianos. Para uma concentração fixa de extrato de folhas de 1,0 mg/ml, a extração em éter de petróleo produz maior diâmetro de inibição (12,71 mm) enquanto a extração em álcali produz o menor diâmetro de inibição (8,954 mm). O Modelo 2 mostrou que para uma concentração de 1,0 mg/ml, o diâmetro de inibição provocado pelo extrato de folhas foi de 10,97 mm e pelo extrato de sementes foi de 8,725 mm. Desta forma, *S. aureus* possui maior

susceptibilidade aos extratos obtidos a partir de folhas. O Modelo 3 mostrou que os extratos metanólicos produziram halos de inibição 4,823 mm superiores ($p < 0,001$) aos dos extratos etanólicos, e demonstrou que para um mesmo incremento na concentração do extrato, o extrato metanólico produz um incremento superior (+0,734 mm) no diâmetro de inibição do que o extrato etanólico ($p = 0,004$). Os modelos meta-analíticos dos MIC evidenciaram que os extratos metanólicos e etanólicos de urucum têm maior efeito bacteriostático que os extratos obtidos com clorofórmio. O MIC global para os extratos de folhas (1,145 mg/ml; IC 95% 0,334 – 3,921 mg/ml) foi inferior ao MIC global para os extratos de sementes (1,383 mg/ml; IC 95% 0,179 – 10,70 mg/ml).

A caracterização da cinética de sobrevivência do *S. aureus* em bifes refrigerados revestidos com extrato de sementes de urucum em óleo de coco ao 0%, 10%, 20% e 30%, e armazenados sob atmosfera normal ou a vácuo, foi realizada mediante o ajuste do modelo Weibull(σ, β) a cada uma das curvas experimentais obtidas após inoculação superficial do patogênico nos bifes ($\sim 5.3 \log \text{CFU/cm}^2$). 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 β 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 Weibullianos σ e β 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 ∞ , 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), respectivamente. 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 *in natura* para o controle do *S. aureus*.

Palavras-chave: Antimicrobiano, achiote, óleo de coco, revestimento, meta-análise, Weibull.

ABSTRACT

Modelling the Survival of *Staphylococcus aureus* on Beef Steaks Coated with Annatto (*Bixa orellana* L.) Seed Oil Extract

The extracts obtained from the seeds of *Bixa orellana* L. (annatto) are widely used in industry as a natural food colorant. In addition, the chemical composition of these seeds has been associated with the ability to delay microbiological deterioration. Thus, the present thesis had the general objective of evaluating the antimicrobial effect of annatto extracts in a food commodity highly susceptible to microbial contamination – fresh bovine meat – against *Staphylococcus aureus*, which is a highly incident pathogen in this food matrix. This objective was achieved through two experiments aimed at: (1) performing a meta-analytical synthesis of the *in vitro* antimicrobial capacity of different annatto extracts against *S. aureus*; and (2) to characterise, using predictive microbiology models, the survival kinetics of *S. aureus* in refrigerated beef steaks coated with annatto seed oil extract, packed under normal atmosphere and vacuum condition.

For the meta-analytical modelling of the inhibition diameter and the minimum inhibitory concentration (MIC), referring to the *in vitro* antimicrobial capacity of annatto extracts against the pathogen in question, a systematic review was first undertaken followed by data extraction of 17 articles with relevant information. Three meta-analytical models with moderators were adjusted to the inhibition diameter data, and a subgroup meta-analysis model was adjusted to the MIC data.

Model I that tested the effects of the solvent, extract concentration and part of the plant demonstrated a significant effect of the extract concentration ($p < 0.001$) on the inhibition diameter, and allowed to find differences between solvents ($p < 0.001$) in their effectiveness to extract antimicrobial compounds. For a fixed concentration of leaf extract of 1.0 mg/ml, extraction in petroleum ether is expected to produce the largest diameter of inhibition (12.71 mm) while extraction in alkali the smallest diameter of inhibition (8.954 mm) against *S. aureus*.

Model II summarised that, for a concentration of 1.0 mg/ml, the inhibition diameter caused by the leaf extract is 10.97 mm and by the seed extract 8.725 mm, so that *S. aureus* is more susceptible to leaf extracts. Model III estimated that methanolic extracts produced, on average, inhibition halos 4.823 mm larger than ethanolic extracts ($p < 0.001$), and demonstrated that for the same increase in extract concentration, methanolic extracts produce a greater increase in the diameter of inhibition (in 0.734 mm) than ethanolic extracts ($p = 0.004$). The meta-analytical models of MIC showed that the methanolic and ethanolic extracts of annatto have a greater bacteriostatic effect than the extracts in chloroform. The overall MIC for leaf extracts (1.145 mg/ml; 95% CI 0.334 - 3.921 mg/ml) was numerically lower than the overall MIC for seed extracts (1.383 mg/ml; 95% CI 0.179 - 10.70 mg/ml).

The characterisation of the survival kinetics of *S. aureus* in refrigerated beef steaks coated with coconut oil extract of annatto seeds at 0%, 10%, 20% and 30%, and stored under normal atmosphere or under vacuum, was carried out by adjusting the Weibull (σ , β) model to each of the experimental curves that were obtained after surface inoculation of the pathogen on the steaks ($\sim 5.3 \log \text{CFU/cm}^2$). In general terms, the greater the concentration of annatto extracted, the greater its bactericidal effect. Except for the annatto extract at 30%, all *S. aureus* curves from steaks in normal atmosphere showed an initial phase of resistance to inactivation, so the β shape parameters quantified this convexity with values greater than 1.0. Greater effectiveness of the extract was verified when the steaks were vacuum-packed, by means of the immediate decrease of *S. aureus* in all survival curves, now of concave shape ($\beta < 1.0$). A transformation of the Weibullian parameters σ and β made it possible to estimate the time needed to reach the first decimal reduction of *S. aureus* on steaks coated with annatto oil extracted at 0%, 10%, 20% and 30%, which was ∞ , 14.4 days (95% CI: 8.1 - 20.8 days), 8.3 days (95% CI: 6.6 - 10.1 days) and 2.5 days (95% CI: 0.24 - 4.8 days), respectively, when packaged under normal atmosphere; and significantly and gradually lower when vacuum-packed: 10.6 days (95% CI: 0.80 - 22 days), 7.2 days (95% CI: 0.11 - 14.3 days), 2.9 days (95% CI: 2.2 - 3.7 days) and 0.43 days (95% CI: 0.05 - 0.81 days), respectively. This research work concluded that the extract of annatto seeds in coconut oil emerges as a promising antimicrobial that can be applied as a coating on fresh beef to control *S. aureus*.

Keywords: Antimicrobial, annatto, achiote, coconut oil, coating, meta-analysis, Weibull.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
Referências.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Deterioração da carne.....	18
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.3 Antimicrobianos naturais.....	21
2.3.1 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana.....	22
2.4 Plantas com potencial antimicrobiano.....	24
2.4.1 <i>Cocos nucifera</i> L.....	25
2.4.2 <i>Bixa orellana</i> L.....	26
2.5 Modelamento da cinética microbiana.....	38
2.5.1 Estudos de desafio ou inoculação.....	38
2.5.2 Microbiologia preditiva.....	40
2.5.3 Tipos de modelos microbiológicos preditivos.....	42
2.6 Referências.....	43
3 MODELAÇÃO META-ANALÍTICA DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS DE URUCUM CONTRA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	52
3.1 Introdução.....	52
3.2 Metodologia.....	53
3.2.1 Revisão sistemática.....	53

3.2.2	Extração de dados	54
3.2.3	Modelação meta-analítica	54
3.3	Resultados	58
3.3.1	Meta-análise do diâmetro de inibição produzido pelo extrato de urucum contra <i>S. aureus</i>	58
3.3.2	Meta-análise da concentração mínima inibitória (MIC) do extrato de urucum contra <i>S. aureus</i>	67
3.4	Conclusão.....	70
3.5	Referências.....	71
4	MODELAÇÃO DA CINÉTICA DO <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> EM BIFES REVESTIDOS COM EXTRATO OLEOSO DE URUCUM.....	74
4.1	Introdução	74
4.2	Materiais e Métodos.....	76
4.2.1	Materiais	76
4.2.2	Preparação dos extratos de sementes de urucum em óleo de coco	76
4.2.3	Preparação do inóculo.....	77
4.2.4	Construção da curva de calibração	78
4.2.5	Ensaio de desafio.....	80
4.2.6	Aplicação do revestimento de 0%, 10%, 20% e 30% de extrato de urucum em óleo de coco	81
4.2.7	Quantificação da concentração de <i>S. aureus</i>	82
4.2.8	Modelos de sobrevivência do <i>S. aureus</i>	84
4.3	Resultados e discussão	86
4.3.1	Sobrevivência de <i>S. aureus</i> em bifes revestidos com extrato de urucum em óleo de coco embalados em atmosfera normal	86
4.3.2	Sobrevivência de <i>S. aureus</i> em bifes revestidos com extrato de urucum em óleo de coco embalados a vácuo.....	93
4.3.3	Modelação secundária da cinética do <i>S. aureus</i> em bifes revestidos com extrato de urucum em óleo de coco	98
4.4	Conclusão.....	101

4.5	Referências.....	102
5	CONCLUSÃO GERAL.....	106
6	TRABALHOS FUTUROS	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Planta Bixa orellana L.	27
Figura 2.2. Fruto da Bixa orellana L. aberto com exposição das sementes	29
Figura 2.3. Estrutura química da bixina	30
Figura 2.4. Estrutura química da norbixina	31
Figura 2.5. Estrutura química do geranylgeraniol	32
Figura 3.1. Variabilidade dos diâmetros de inibição para <i>S. aureus</i> coletados da literatura, representados em função à concentração do extrato de urucum utilizado.....	59
Figura 3.2. Gráfico de dispersão dos diâmetros de inibição observados versus os previstos pelo Modelo 1 com linha de igualdade de 45°.....	62
Figura 3.3. Forest plot do diâmetro de inibição produzido pelo extrato de folhas de urucum no <i>S. aureus</i>	64
Figura 3.4. Forest plot do diâmetro de inibição produzido pelo extrato de sementes de urucum no <i>S. aureus</i>	65
Figura 3.5. Forest plot da concentração mínima inibitória (MIC) do extrato de urucum contra <i>S. aureus</i> , mostrando o valor meta-analisado de MIC.	67
Figura 3.6. Forest plot da concentração mínima inibitória (MIC) do extrato de folhas de urucum contra <i>S. aureus</i> , mostrando o valor meta-analisado de MIC.....	68
Figura 3.7. Forest plot da concentração mínima inibitória (MIC) do extrato de sementes de urucum contra <i>S. aureus</i> , mostrando o valor meta-analisado de MIC.....	69
Figura 4.1. Obtenção do extrato oleoso de urucum a 10%, 20% e 30% p/p.....	77
Figura 4.2. Preparação do inóculo de <i>S. aureus</i>	78
Figura 4.3. Curva de calibração que relaciona a concentração de <i>S. aureus</i> em log CFU/ml de caldo TSB com o logaritmo da absorbância média (600 nm).....	79
Figura 4.4. Condições experimentais de controle sem revestimento (acima esquerda), controle com 0% extrato oleoso de urucum (acima direita), e tratamentos de 10%, 20% ou 30% extrato oleoso de urucum (abaixo) embalados em atmosfera normal.....	82

Figura 4.5. Condições experimentais de controle sem revestimento (acima esquerda), controle com 0% extrato oleoso de urucum (acima direita), e tratamento de 10%, 20% ou 30% extrato oleoso de urucum (abaixo) embalados a vácuo	83
Figura 4.6. Amostra de bife após homogeneização	84
Figura 4.7. Curvas da sobrevivência ($\ln(N(t)/N_0)$) do <i>S. aureus</i> em bifés sem revestimento (controle), revestidos com óleo de coco e revestidos com extrato oleoso de urucum ao 10, 20 e 30%, embalados em atmosfera normal e estocados a 5°C.....	87
Figura 4.8. Curvas da sobrevivência ($\ln(N(t)/N_0)$) do <i>S. aureus</i> em bifés sem revestimento (controle), revestidos com óleo de coco e revestidos com extrato oleoso de urucum ao 10, 20 e 30%, embalados a vácuo e estocados a 5°C.....	94
Figura 4.9. Parâmetro de declive (σ) do modelo Weibull que descreve a sobrevivência do <i>S. aureus</i> em bifés revestidos embalados a vácuo ou em atmosfera normal, em função à percentagem de urucum extraído em óleo de coco.....	98
Figura 4.10. Parâmetro de forma (β) do modelo Weibull mostrando ausência de correlação com a percentagem de urucum extraído em óleo de coco para revestimento de bifés embalados a vácuo ou em atmosfera normal.....	99
Figura 4.11. Tempo em dias (t_{1log}) para atingir a primeira redução decimal de <i>S. aureus</i> em bifés embalados a vácuo ou em atmosfera normal, em função à percentagem de urucum extraído em óleo de coco	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Valores de concentração inibitória mínima (MIC em mg/ml) de diferentes extratos contra <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	25
Tabela 2.2. Classificação da <i>Bixa orellana</i> L.	27
Tabela 3.1. Distribuição dos dados para as medições de capacidade antimicrobiana – diâmetro de inibição e concentração mínima inibitória – por país de procedência, parte da planta e solvente de extração	56
Tabela 3.2. Modelo 1: Parâmetros do modelo linear misto que descreve o diâmetro de inibição (mm) produzido pelo extrato de urucum contra <i>S. aureus</i>	60
Tabela 3.3. Modelo 2: Parâmetros do modelo meta-analítico que descreve o diâmetro de inibição (mm) produzido pelo extrato de urucum contra <i>S. aureus</i>	62
Tabela 3.4. Modelo 3: Comparação da efetividade dos solventes etanol e metanol na extração de compostos antimicrobianos, avaliados pelo diâmetro de inibição.	66
Tabela 3.5. Parâmetros do modelo meta-analítico que descreve o logaritmo da concentração mínima inibitória (MIC em mg/ml) do extrato de urucum contra <i>S. aureus</i>	70
Tabela 4.1. Parâmetros do modelo de Weibull que descreve o logaritmo natural da redução ($\ln(N_0/N(t))$) nas contagens de <i>S. aureus</i> em bifés controle, e revestidos com óleo de coco e com extrato oleoso de urucum, embalados em atmosfera normal e estocados a 5°C.	88
Tabela 4.2. Parâmetros do modelo de Weibull que descreve o logaritmo natural da redução ($\ln(N_0/N(t))$) nas contagens de <i>S. aureus</i> em bifés controle, e revestidos com óleo de coco e com extrato oleoso de urucum, embalados a vácuo e estocados a 5°C.	95
Tabela 4.3. Tempo (dias) necessário para atingir uma redução de <i>S. aureus</i> em 1 log CFU/cm ² em bifés revestidos com óleo de urucum extraído ao 0, 10, 20 ou 30%, embalados em atmosfera normal ou a vácuo e estocados a 5°C.....	96
Tabela 4.4. Modelos secundários para o declive de Weibull (σ) e para o tempo para atingir a primeira redução decimal (t_{1log}) na concentração de <i>S. aureus</i> [log CFU/cm ²] em bifés revestidos em função à percentagem de urucum extraído em óleo de coco.	100

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Definição
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
a_w	Atividade de água
BP	Baird Parker Agar
MBC	Concentração Bactericida Mínima
CEE	Comunidade Econômica Europeia
MIC	Concentração Bactericida Mínima
CO ₂	Dióxido de Carbono
C ₂₅ H ₃₀ O ₄	Bixina
C ₂₄ H ₂₈ O ₄	Norbixina
JECFA	Comitê Misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
KOH	Hidróxido de Potássio
NaOH	Hidróxido de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
RASFF	Sistema Rápido de Alerta para Alimentação Humana e Animal
TSB	Tryptic soy broth
YET	Egg Yolk Tellurite Emulsion

Unidades

CFU/ml	Unidade Formadora de Colônia / mililitro
cm	centímetros
g	gramas (unidade de massa)
ml	mililitro
mm	milímetros
nm	nanômetro
P/V	peso / volume
ppm	parte por milhão

1 INTRODUÇÃO

Existem muitos estudos sobre a utilização de corantes na produção de medicamentos, cosméticos e, principalmente, os que são empregues na indústria de alimentos. Especificamente, o objetivo do seu uso na área alimentar é a reconstituição da cor do alimento que é perdida em algumas etapas do seu processamento, tornando o produto visualmente mais atrativo para o consumidor. Contudo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), que são responsáveis pela regulação do uso de corantes artificiais nos alimentos, salientam o fato, que de acordo com o tipo e a quantidade ingerida, os corantes podem causar elevados efeitos colaterais (de Góes Nakano, 1998).

Além disso, com o passar dos anos, a população vem aderindo a uma tendência de alimentação mais saudável e de alta qualidade, exigindo do mercado a produção de alimentos com ingredientes naturais. Com relação à substituição dos corantes sintéticos, uma das várias alternativas que está sendo utilizada pelas indústrias é o extrato de bixina proveniente da *Bixa orellana* L. (Olegario & dos Santos, 2014). A América Latina é a maior produtora desta planta, tendo o Brasil como um dos maiores produtores com 12 mil toneladas de grão por ano, sendo 60% da produção destinada para a produção do condimento colorau e os 40 % restantes para a indústria de corantes e/ou exportação (de Oliveira Silva et al., 2019).

Outro desafio da indústria alimentar é substituir o uso de agentes antimicrobianos sintéticos pelos naturais para minimizar e/ou retardar os processos de deterioração microbiana e, conseqüentemente, aumentar o tempo de prateleira dos alimentos. O uso de conservantes sintéticos torna-se cada vez mais restringido pela regulamentação internacional, e um dos motivos é que, dependendo da dose ingerida, estes antimicrobianos podem causar reações alérgicas e doenças (Cordeiro, 2013).

Durante muito tempo tem-se reconhecido empiricamente as propriedades antimicrobianas das plantas; entretanto, só atualmente estas características estão sendo confirmadas cientificamente. Existe uma diversidade de pesquisas que demonstram a atividade biológica de plantas medicinais, originárias de diferentes regiões do mundo, por consequência do seu uso tradicional.

Essas plantas e os seus extratos estão sendo avaliados de forma qualitativa e quantitativa para substituírem os aditivos sintéticos (Tajkarimi et al., 2010; Viuda-Martos et al., 2008).

Da *Bixa orellana* L., vulgarmente conhecida como urucum, tem sido estudados extratos das suas folhas (Irobi et al., 1996) e das sementes (Galindo-Cuspinera & Rankin, 2005; Galindo-Cuspinera et al., 2003), os quais confirmam que estas possuem um efeito inibitório do crescimento de microrganismos, tais como: a *Neisseria gonorrhoea*, o *Bacillus subtilis*, o *Streptococcus faecalis* e o *Staphylococcus aureus*.

Por outro lado, esta planta ganhou importância no cenário econômico mundial, pois apresenta características singulares que permitem a obtenção tanto de um extrato lipossolúvel (bixina) como de um hidrossolúvel (norbixina), além de ter uma produção de baixo custo (Scotter, 2009). A bixina é o carotenoide majoritário que recobre externamente a superfície das sementes de urucum e, embora existam diversas pesquisas sobre esta molécula em relação às suas características físico-químicas e à sua aplicação como corante alimentar, existem poucos trabalhos de investigações sobre a sua utilização como um antimicrobiano natural, capaz de aumentar o tempo de prateleira dos alimentos ou de reduzir os microrganismos patogênicos nos mesmos. Por exemplo, até à data, não foram encontrados trabalhos, em toda literatura pesquisada, sobre a aplicação de extratos de urucum em alimentos propícios à contaminação microbiana, como a carne fresca, nem trabalhos sobre o uso da microbiologia preditiva para a caracterização do efeito antimicrobiano dos extratos de urucum.

Assim, o presente trabalho de investigação teve como objetivos: (1) realizar uma síntese meta-analítica da capacidade antimicrobiana *in vitro* dos diversos extratos de folhas e de sementes de *Bixa orellana* sobre o *Staphylococcus aureus*, microrganismo escolhido por ser um patogênico de regular prevalência em carne bovina fresca; e (2) caracterizar, mediante modelos de microbiologia preditiva, a cinética de sobrevivência do *S. aureus* durante o período de refrigeração em bifos de carne bovina revestidos com extrato oleoso de sementes de *Bixa orellana*, embalados em atmosfera normal e a vácuo.

Desta forma, o trabalho de investigação foi realizado em duas fases: a primeira fase visou atingir o objetivo (1) e é apresentada no Capítulo 3, enquanto o trabalho de investigação referente ao objetivo (2) é apresentado no Capítulo 4. Estes capítulos contêm uma breve introdução, metodologia, resultados e discussão. O Capítulo 5 desta dissertação apresenta as conclusões gerais obtidas por meio dos resultados encontrados nos Capítulos 3 e 4. No Capítulo

2, apresenta-se uma breve revisão bibliográfica que serve de marco teórico ao trabalho de investigação realizado.

Referências

- Cordeiro, T. S. (2013). *Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de Alecrim (Rosmarinus officinalis) e Sálvia (Salvia officinalis) para aplicação em alimentos*. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade do Extremo Sul Catarinense. Disponível: <http://189.28.179.196/bitstream/1/1809/1/Tamires%20Silveira%20Cordeiro.pdf>. Acessado 11 de abril de 2020.
- de Góes Nakano, L. C. (1998). Considerações Sobre o Plantio e Extração do Urucum (*Bixa orellana* L.) e a sua Utilização como Corante. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, 2(1).
- de Oliveira Silva, S., de Carvalho, J. M., Pereira, E. C., Melo, L. M. d. C. L., & dos Santos Araújo, R. (2019). *Atividade antimicrobiana e caracterização físico-química de Urucum (Bixa orellana L.) em diferentes estádios de maturação*. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Campina Grande. Disponível: <http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev201/rev2016.pdf>. Acessado 11 de abril de 2020.
- Galindo-Cuspinera, V., & Rankin, S. A. (2005). Bioautography and chemical characterization of antimicrobial compound (s) in commercial water-soluble annatto extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2524-2529.
- Galindo-Cuspinera, V., Westhoff, D. C., & Rankin, S. A. (2003). Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage microorganisms. *Journal of Food Protection*, 66(6), 1074-1078.
- Irobi, O., Moo-Young, M., & Anderson, W. (1996). Antimicrobial activity of Annatto (*Bixa orellana*) extract. *International Journal of Pharmacognosy*, 34(2), 87-90.
- Olegario, L. S., & dos Santos, J. A. B. (2014). Prospecção tecnológica sobre o corante natural de urucum (*Bixa orellana* L.). *Cadernos de Prospecção*, 7(4), 601.
- Scotter, M. (2009). The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. *Food Additives and Contaminants*, 26(8), 1123-1145.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199-1218.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(3), 526-531.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Deterioração da carne

Um dos maiores desafios da indústria de carnes é oferecer ao consumidor uma carne macia, suculenta, com características organolépticas (cor e sabor) apreciáveis, de modo que o frescor da carne perdure durante todo o seu tempo de prateleira, além de ter um controle absoluto de todas as etapas de produção da carne, desde do campo até a mesa do consumidor garantindo a segurança alimentar (Zakrys et al., 2009).

A carne, sendo constituída por um elevado teor de nutrientes e apresentando outros fatores intrínsecos como elevada atividade de água e pouca acidez, é propícia ao crescimento de microrganismos deteriorantes e até patogênicos, o que pode promover a perda significativa de alimentos e também infecções e intoxicações alimentares na população (Franco et al., 2008). A carne não possui em sua composição constituintes antimicrobianos, o que ajuda ainda mais para o crescimento microbiano.

A quantidade e os tipos de microrganismos que se desenvolvem na carne são influenciados pelas etapas de manejo ante-mortem e post-mortem como: *stress* pre-mortem e idade do animal, condições de abate, refrigeração pós abate, maturação, métodos de cocção, entre outros (de Felício, 1997). As bactérias presentes na carne, podem ser de dois tipos, deteriorantes e patogênicas. Os principais microrganismos envolvidos na deterioração da carne são as bactérias *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Shewanella putrefaciens*, *Brochotrix thermosphacta*, *Lactobacillus* e algumas espécies da família *Enterobacteriaceae*. No entanto, nas etapas de maior manipulação como evisceração, processamento e corte, pode ocorrer contaminação com bactérias patogênicas como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* produtor de shigatoxina, *Staphylococcus aureus*, entre outras.

A putrefação da carne é principalmente determinada pelo desenvolvimento de bactérias deteriorantes na sua superfície, uma vez que o tecido interno do músculo é estéril até a etapa do corte. Os microrganismos que se desenvolvem em carnes refrigeradas são influenciados pelas

condições de estocagem às que são submetidas. A velocidade de deterioração pode variar conforme as condições da atmosfera que envolvem o produto e com a tecnologia aplicada no processamento. Por exemplo, a embalagem com atmosfera modificada prolonga o tempo de estocagem e retarda a deterioração microbiana (de Alcantara et al., 2012).

Existem diferentes sistemas de embalagem para carne fresca, em que o maior propósito é aumentar o tempo de prateleira do produto por intermédio da minimização do desenvolvimento e/ou contaminação por microrganismos patogênicos e deteriorantes. Atualmente, um dos sistemas mais utilizados é a embalagem a vácuo, onde é observado efetivamente este retardamento do crescimento microbiano. No entanto, esse método promove alteração indesejável no aspecto visual da carne devido a formação do pigmento denominado deoximioglobina, de coloração vermelho púrpura formado em decorrência da ausência de oxigênio (Fischmann, 2016).

Outra forma efetiva de inibição das bactérias é o emprego de atmosfera modificada em carne fresca conservada em bandejas. Esse sistema consiste na incorporação de uma mistura gasosa capaz de desacelerar a perda por oxidação da cor vermelha característica da carne, juntamente com a capacidade de inibir o desenvolvimento da microbiota deteriorante ou patogênica. Habitualmente, são utilizadas misturas de oxigênio (O_2), dióxido de carbono (CO_2) e nitrogênio (N_2). O CO_2 é responsável por inibir o crescimento de bactérias aeróbicas deteriorantes e selecionar as bactérias lácticas, o O_2 por preservar a cor característica da carne e o N_2 pela inertização (Venturini, 2007). A proporção desses gases é dependente do tipo do produto cárneo, da temperatura de acondicionamento, das propriedades de barreiras e da relação entre o espaço disponível da embalagem com o peso do alimento (Jeremiah, 2001).

Além do aumento da vida útil e conseqüentemente a racionalização da produção, estocagem e distribuição, ao fazer uso dessa embalagem a indústria ganha ainda mais, nomeadamente, a comercialização de produtos com maior qualidade, a maior conservação da cor e do aroma, menores perdas na distribuição, maior lucro, melhor aceitação pelo consumidor e eliminação completa ou redução do uso de conservantes. As principais desvantagens da utilização de atmosfera modificada é o aumento no volume das embalagens ocupado pelo gás e uma maior hipótese de rompimento da embalagem durante a sua distribuição (Jayasingh et al., 2001; Mano et al., 2002).

Uma modalidade recente para aumentar o tempo de prateleira da carne é uso de antimicrobianos naturais. Os antimicrobianos naturais são definidos como compostos que apresentam a capacidade de inibir o desenvolvimento de microrganismos, tais como bactérias e fungos. Por possuírem esta capacidade inibitória, estão sendo cada vez mais utilizados em alimentos para garantir sua segurança sem que haja alteração na qualidade do produto (da Cruz & Pereira, 2010). Quando esses compostos antimicrobianos exibem simultaneamente potencial antioxidante tornam-se ainda mais promissores pelo fato das oxidações lipídicas de pigmentos e de proteínas constituírem importantes processos de deterioração de carnes.

2.2 *Staphylococcus aureus*

O médico escocês Alexander Oston entre os anos de 1879 a 1882 foi o primeiro a se referir a *Staphylococcus spp.*, ao descrever a presença deste microrganismo em pus retirado de abscessos em seres humanos, e a sua decorrente capacidade de causar doença piogênica quando injetados em ratos. Depois de dois anos, o cientista alemão Friedrich Julius Rosenbach pesquisou e relatou a cultura pura, designando a bactéria por *Staphylococcus aureus* (Tatini & Bennett, 1999).

S. aureus é uma bactéria do tipo *cocos*, Gram positiva, catalase positiva e seu agrupamento de células ocorre de forma irregular e tridimensional sendo similar a cachos de uvas (*Staphylococcus*). No que se refere ao seu metabolismo, é anaeróbico facultativo conseguindo se desenvolver em ambiente redutor ou oxidativo. Por essa razão, *S. aureus* cresce em condições de anaerobiose ou aerobiose, no entanto, em condições de aerobiose o seu crescimento é mais rápido, porém com um menor tempo de sobrevivência (Luppens et al., 2002).

S. aureus não é uma bactéria competitiva. Com a presença de outros microrganismos é possível controlar o seu crescimento e a produção de suas enterotoxinas, todavia essa inibição depende diretamente da proporção e do tipo desses microrganismos competidores, da temperatura de armazenamento e do tipo de substrato (Vignolo & Fadda, 2007).

Staphylococcus é tolerante ao sal quando as demais condições de crescimento são ótimas e o seu desenvolvimento é possível em baixos valores de atividade de água (a_w) como 0,850. Quanto ao parâmetro temperatura, a faixa de crescimento do *S. aureus* é entre 7 e 48 °C, sendo considerado o intervalo de temperatura ótima 35°C-37°C e em relação ao pH crescem em uma faixa entre 4 e 9, sendo o ótimo variando entre 6 e 7 (Mitchell et al., 2012; Salavessa, 2009).

Apesar de toda a complexidade do desenvolvimento do *S. aureus*, este microrganismo é responsável por intoxicações alimentares por conta da produção das enterotoxinas estafilocócicas.

Na maioria dos casos, a contaminação da carne por *S. aureus* é por conta do ser humano. Os indivíduos possuem *S. aureus* como parte da microbiota do nariz, pescoço e mãos. Quando o manipulador entra em contato com o alimento pode ocorrer a contaminação do alimento cru e do alimento processado. Por este motivo, *S. aureus* é um indicador de contaminação pós processo ou das condições sanitárias das superfícies que entram em contato direto com o alimento (Moura et al., 2006). A temperatura inadequada para conservação da carne também favorece a multiplicação deste patógeno (Ponath et al., 2016).

Dentre os vários produtos alimentares, a carne e os produtos cárneos são um importante reservatório de *S. aureus*, e tem sido veículos de transmissão de vários surtos de intoxicação no mundo (Aydin et al., 2011; Hennekinne et al., 2012; Sallam et al., 2015; Wang et al., 2013). Um estudo em Iowa (EUA) estimou que os valores de prevalência média de *S. aureus* em carne fresca de peru, porco, frango e bovina são de 19,4%, 18,2%, 17,8% e 6,9% (Hanson et al., 2011). Maiores valores de prevalência tem se registrado em carne fresca de bovino produzida em Colômbia (46% de incidência com 75 amostras positivas com contagens de *S. aureus* por cima de 100 CFU/g de um total de 160 amostras analisadas) (López Gutiérrez et al., 2016) e na China (50,4% de incidência com 63 amostras positivas de um total de 125) (Wu et al, 2018).

2.3 Antimicrobianos naturais

A procura de novos agentes antimicrobianos é necessária devido ao surgimento de microrganismos cada vez mais resistentes. Trata-se de um estudo muito abrangente, pois além da sua aplicabilidade no âmbito alimentar também contribui para avanços no setor farmacêutico e cosmético (Guedes et al., 2009).

Nos últimos anos houve um aumento em pesquisas relacionadas com o descobrimento ou redescobrimto do poder antimicrobiano de várias espécies de plantas medicinais; por conta disso faz-se necessária a existência de um sistema que possua métodos capazes de avaliar tal eficácia. Numa primeira fase, realiza-se uma avaliação biológica dos extratos obtidos da planta para assegurar a sua efetividade antimicrobiana e a sua segurança; e numa segunda fase, ocorre a

identificação dos princípios ativos, formulações de dosagem e perfil farmacocinético do possível novo antimicrobiano (Das et al., 2010).

A capacidade antimicrobiana das plantas está correlacionada com a sua composição química. Geralmente, a capacidade antimicrobiana de um extrato mede-se por ensaios *in vitro* empregando técnicas de difusão em ágar e diluição (macro e microdiluição). Outro método que pode ser utilizado é a autobiografia, que consiste em determinar compostos bioativos com atividade antimicrobiana de extratos de plantas com base na inibição dos microrganismos por meio da descoberta de anticorpos antimicrobianos (Rozatto, 2012).

2.3.1 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana

O método físico de difusão em ágar também é conhecido como difusão em placas e é definido como um teste em que o microrganismo é posto contra uma substância biologicamente ativa em um meio de cultura sólido, e a partir disso é relacionado o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo com uma determinada concentração da substância ativa (Ostrosky et al., 2008).

Um fator limitante deste teste é que só pode ser aplicado em microrganismos aeróbicos facultativos ou aeróbicos que possuem crescimento rápido. A avaliação é comparativa seguindo um padrão biológico de referência (controle positivo) e o halo de inibição de crescimento é medido desde a circunferência do disco ou poço até mesmo onde existe a margem relativa ao crescimento de microrganismos. Conforme o comprimento do halo, os microrganismos são classificados em: *sensíveis*, quando o diâmetro do halo é maior ou não mais do que 3 mm menos que o controle positivo; *moderadamente sensíveis*, zona de inibição maior que 2 mm, porém menor que o controle positivo de mais de 3mm; e *resistentes*, halo com diâmetro igual ou menor que 2 mm. Para o controle positivo, aplica-se um quimioterápico padrão, e para o controle negativo emprega-se o solvente usado para dissolver os extratos (Karaman et al., 2003; Springfield et al., 2003).

A técnica de difusão em placas é mais utilizada para análise do perfil de resistência antimicrobiana de bactérias, pois é vista como de simples cumprimento, fácil reprodução, baixo custo e possibilita a realização de testes com diferentes concentrações das substâncias em uma mesma placa. Todavia, é um método que pode sofrer alterações facilmente conforme as

variações nas técnicas do operador, à capacidade de difusão das amostras e na interpretação do diâmetro da zona de inibição. Por conseguinte, para associar os resultados qualitativos com diferentes concentrações dos antimicrobianos, são fundamentais a obtenção de resultados quantitativos sob a forma de concentração inibitória mínima (MIC) (Nogueira, 2012; Rozatto, 2012).

O MIC é definido como a menor concentração de um antimicrobiano que impede o crescimento de um microrganismo. Um fator de elevada importância na determinação do MIC dos extratos vegetais é a atenção em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais relevantes aos compostos naturais e suas combinações (Pinto et al., 2015).

As modificações relativas à determinação do MIC de extratos de plantas são devidas a diversos fatores, tais como, o método aplicado, o microrganismo e a cepa utilizada no experimento, a origem da planta, a época de colheita, a forma de preparo dos extratos (plantas frescas ou secas), e a quantidade de extrato que está sendo utilizada no teste. Por conta desses fatores não existe uma metodologia padrão para apresentar os resultados dos testes antimicrobianos de produtos naturais (Fennell et al., 2004).

Outro método de referência para determinação de atividade antimicrobiana é o de diluição em tubos. Este método gera resultados tanto qualitativos quanto quantitativos e não sofre influência da velocidade dos microrganismos como o método de difusão em ágar; contudo, exige uma grande demanda de tempo para preparar e executar a metodologia, e gera uma elevada parcela de resíduos. O resultado obtido está em proporção da densidade da turbidez produzida pelo crescimento microbiano (Langfield et al., 2004).

As duas técnicas citadas acima necessitam de uma elevada quantidade da substância que está sendo analisada, pelo que esses métodos estão limitados a bioensaios para compostos antimicrobianos de origem vegetal, uma vez que, na grande maioria, para a realização dos testes são extraídas baixas quantidades das mesmas, reduzindo dessa forma o número de repetições do ensaio (Nogueira, 2012).

A microdiluição é um método bastante utilizado e possui grandes vantagens tais como, não é de alto custo, não demanda tempo, é de fácil execução e alto rendimento, encontra-se a possibilidade de analisar grande variedade de amostras que apresentam baixas quantidades ou baixas concentrações das substâncias isoladas, sendo um dos fatores mais importantes uma vez que a maioria das amostras são escassas por se tratar de extratos naturais. A técnica de

microdiluição possibilita a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) da substância. Essa metodologia também permite a utilização de mais de uma substância-teste, assim como, inúmeros microrganismos em um mesmo experimento, além do mais, expressa resultados reprodutíveis. Em contrapartida, as células de alguns microrganismos podem aglutinar-se na base do poço; pode ocorrer a precipitação de alguns compostos que se encontram nos extratos, a coloração do extrato quando está em alta concentração pode interferir com a análise. No entanto, mesmo com essas desvantagens, as vantagens se sobrepõem fazendo com que seja a técnica mais apropriada (Alves et al., 2008; Cushnie & Lamb, 2005; Palombo, 2011; Salazar-Aranda et al., 2011).

O *Checkerboard* e *Time-Kill* também são outros métodos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana, porém não são aplicadas diariamente por demandarem bastante tempo e custo. O objetivo de seguir estas metodologias é quantificar o efeito de combinações de agentes antimicrobianos no crescimento bacteriano *in vitro*. As terapias de combinações antimicrobianas melhoram a efetividade e possibilitam uma terapia de amplo espectro, além de impedir o crescimento de microrganismos resistentes (Drago et al., 2007).

Após um breve resumo de metodologias de determinação de atividade antimicrobiana, na Tabela 2.1 apresenta-se uma série de MICs extraídos de diversos artigos científicos que têm em comum a investigação da eficácia de extratos e óleos essenciais de plantas atuando contra dois microrganismos patogênicos – *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* – presentes em carnes.

2.4 Plantas com potencial antimicrobiano

O poder antimicrobiano do óleo de coco e do extrato oleoso de urucum são objetos de estudo nessa tese, por essa razão esta seção aborda a composição química dessas plantas. O *Cocos nucifera* L. e a *Bixa orellana* L. têm em comum a elevada concentração de compostos fenólicos e a presença de carotenoides. Diversos estudos apontam que esses são os compostos responsáveis pela função bacteriostática presente em um produto, seja em um óleo de coco comercial ou em um extrato proveniente de alguma parte da planta que tem potencialidade de ser utilizado dentro de uma indústria. Além disso, a partir dessas duas plantas é possível a elaboração de substâncias que podem ser utilizadas com fins medicinais, agregando para o melhoramento da saúde humana (de Pinho & Souza, 2018; Vieira, 2018).

2.4.1 *Cocos nucifera* L.

O *Cocos nucifera* L. conhecido popularmente como coqueiro é cultivado com o objetivo de produzir frutos destinados para consumo ou para fins industriais (Figueira, 2012). A sua utilização no âmbito industrial ocorre a partir do processamento do endosperma sólido exposto à secagem (copra) ou fresco. No Brasil, o coco fresco é usado para a fabricação de bolos, bombons, chocolate, leite de coco e coco ralado (Fontenele & Brasil, 2005).

O óleo de coco é proveniente da copra, e apresenta uma elevada quantidade de lipídeos de baixo peso molecular (Marina et al., 2009). De acordo com Araújo (2008), no óleo de coco é possível encontrar ácido caprílico, cáprico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico e ácido láurico, sendo esse último identificado em proporção mais alta. Em menores concentrações estão presentes os monoglicerídeos, diglicerídeos, fosfatídeos, ceras, pigmentos (carotenoides e clorofila) e esteróis (matéria insaponificável) como os tocoferóis, cuja função é inibir a oxidação das cadeias de ácidos graxos insaturados do óleo de coco (Moretto, 1998).

Tabela 2.1. Valores de concentração inibitória mínima (MIC em mg/ml) de diferentes extratos contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*

Patogênico	Tipo de Extrato	MIC (mg/ml)	Referência
<i>L. monocytogenes</i>	Óleo essencial de erva doce	0,15	(Khanjari et al., 2019)
	Óleo essencial de tomilho	2,00	(Kerekes et al., 2016)
	Óleo essencial de alecrim	10,0	(Oliveira et al., 2013)
	Óleo essencial de capim limão	15,6	(Oliveira et al., 2013)
<i>S. aureus</i>	Solução de curcumina	0,125	(Altunatmaz et al., 2016)
	Óleo de salvia	5,00	(Cui et al., 2015)
	Folha de oliveira	9,00	(Djenane et al., 2012)
	Casca da magnólia	0,02	(Hu et al., 2011)
	Óleo essencial de eucalipto	0,09	(Djenane et al., 2011)
	Óleo essencial de murta	1,20	(Djenane et al., 2011)

Fonte: Elaboração própria

Em vista da sua composição, o óleo de coco tem sido investigado no que diz respeito ao seu efeito antimicrobiano contra bactérias, fungos, vírus e protozoários. O ácido láurico e seus

derivados têm se apresentado como os mais eficazes agentes antimicrobianos para alimentos (Khoramnia, et al., 2013). Todavia, a forma de extração do óleo interfere nesta composição química, no rendimento e nas propriedades bioativas do óleo (de Pinho & Souza, 2018). Os métodos principais para a extração de óleos são a extração artesanal mecânica e por solventes, entretanto qual mecanismo faz com que o óleo de coco virgem exerça o papel de antimicrobiano ainda é muito inexplorado (Lourenço et al., 2016).

Um experimento realizado por de Pinho & Souza (2018) avaliou o rendimento da extração de óleo de coco de *C. nucifera* L. por método artesanal e por método com solvente orgânico e o comparou com o óleo comercial extraído por prensagem a frio, com relação à atividade antimicrobiana contra o crescimento das cepas *E. coli*, *S. aureus* e *Candida albicans*. Os resultados obtidos revelaram que tanto os óleos de coco extraídos de modo artesanal, com solvente orgânico quanto o óleo de coco comercial não apresentaram capacidade de inibir o crescimento microbiano, revelando que indiferentemente do método de extração escolhido e das características químicas que cada um apresenta, os óleos de coco analisados não apresentaram atividade antimicrobiana. Contudo, esses dados se contrapõem aos resultados alcançados por Figueira (2012) e Lúcio et al. (2012), autores que demonstram que as raízes, folhas, pecíolo e o óleo de *Cocos nucifera* L. inibem o crescimento bacteriano.

2.4.2 *Bixa orellana* L.

2.4.2.1 Classificação botânica

Essa denominação de *Bixa orellana* L. é decorrente de uma homenagem prestada ao conquistador espanhol Francisco de Orellana que descobriu a espécie no século XVI (Miranda et al., 2017). O Sistema de Engler caracteriza *B. orellana* L. de acordo com a Tabela 2.2.

2.4.2.2 Descrição da planta

Originária das regiões tropicais da América, a *Bixa orellana* L. pode ser conhecida por diversos nomes, tais como: achiote, urucum, urucu, annatto, orellana ou changerica dependendo de onde é encontrada (Franco et al., 2008).

Tabela 2.2. Classificação da *Bixa orellana* L.

Subdivisão:	Angiosperma
Classe:	Dicotiledoneae
Ordem:	Parietales
Subordem:	Cistianeae
Família:	Bixaceae
Gênero	Bixa

Fonte: Franco et al. (2008).

Segundo o lugar de cultivo e a idade da planta é designada como um arbusto perene grande ou uma árvore pequena, que tem uma altura variável de 2 a 5 m (Figura 2.1). A planta possui grandes mudanças nos aspectos de cor, podendo mostrar-se com caule, frutos verdes e flores brancas ou caule vermelho, flores rosas e frutos vermelho-escuro. As pétalas são dialipétalas e espaçadas entre si, com cinco sépalas (Demczuk Junior, 2012).



Figura 2.1. Planta *Bixa orellana* L. (Google Imagens)

O tronco tem uma cor castanho café, sendo capaz de atingir uma altura de até 5 m com um formato cilíndrico, contendo um diâmetro de base entre 10 a 15 cm, podendo haver algumas delas com um diâmetro maior do que 30 cm, bem como as suas raízes ramificadas, onde da raiz principal grossa crescem raízes secundárias e terciárias que estão distribuídas no solo, mais finas

e com uma coloração de café escuro. Estas raízes podem alcançar aproximadamente 30 cm de profundidade, podendo a raiz principal atingir 1 m de profundidade (Valério et al., 2015).

As folhas apresentam um formato de coração, dispostas na forma espiral e podendo medir de 8 a 20 cm de comprimento, e 4 a 15 cm de largura, possuindo uma estrutura peciolada, ou seja, contêm uma nervação da folha peninérvea com nervuras secundárias e terciárias ao longo da folha, tendo uma borda com limbo ondulada e pequenas ondulações ao longo da folha (Alves & Albuquerque, 2012).

A flor do urucum é hermafrodita, porém a flor não pode autofecundar-se por causa da protandria, ou seja, os grãos do pólen ficam viáveis ou maduros antes das anteras estarem receptivas. O grão do pólen encontra-se maduro apenas na véspera da abertura da flor e os estames duram um dia, impedindo que haja a autopolinização. Por conta disso, a fecundação é proveniente da polinização cruzada, que geralmente é feita por ventos ou por insetos (entomófila). Vale ressaltar, que a polinização beneficia a ocorrência de uma maior diversidade de características do fenótipo, o que está relacionado com o teor de bixina nos grãos e nos frutos (Vieira, 2018).

Em relação aos frutos, podem ser do tipo cápsula ou cachopa, ovoides ou globosos, com 2 a 3 carpelos que variam de 3 a 4 cm de comprimento e 3 a 5 cm de diâmetro. No que diz respeito a parte externa da planta, elas são revestidas por espinhos moles que apresentam coloração que se alternam entre o verde, vermelho-pálido e o roxo. Internamente, geralmente estão divididas em duas valvas com uma quantidade de sementes que variam de 10 a 50 (Ingram & Francis, 1969).

Esses grãos apresentam um formato arredondado com um diâmetro médio de 0,4 cm uma camada de revestimento pastosa com uma pigmentação avermelhada (Figura 2.2), o que está diretamente ligado com as suas características, ou seja, eles tornam-se secos, duros e de coloração escura a partir do seu amadurecimento. O pigmento que está em maior concentração nos grãos é a bixina, com cerca de 80% da totalidade dos carotenoides, sendo lipossolúvel e podendo ser extraído por determinados solventes orgânicos (Franco et al., 2002).

O urucuzeiro floresce, frutifica e matura quase o ano todo; no entanto, existe uma maior intensidade em duas estações, as quais as circunstâncias de clima são consideradas normais, tendo a primeira floração nos meses de fevereiro e março, e nos meses de junho e julho a colheita principal. Já a segunda floração ocorre nos meses de julho e agosto, tendo novembro e dezembro como os meses da colheita. Os frutos necessitam ser colhidos somente quando

estiverem maduros e secos, pois o alto percentual de umidade dos grãos torna-se propício para o crescimento de microrganismos. Após a colheita, esses frutos continuam no campo durante um curto intervalo de tempo e depois são armazenados em um local adequado (Franco et al., 2008).



Figura 2.2. Fruto da *Bixa orellana* L. aberto com exposição das sementes (Vieira, 2018)

A separação das sementes das cachopas (descachopamento) pode ser realizada de forma manual ou mecânica, sendo a última opção a mais indicada por reduzir a perda de corantes. A segunda operação é a secagem, que se baseia no recolhimento dos grãos que são peneirados em lonas, terreiros ou secadores de alvenaria durante aproximadamente um dia. Na armazenagem desses grãos nota-se a perda de teor corante, e isso está associado a alguns fatores como, por exemplo, exposição ao ar e umidade relativa do ambiente, teor de umidade e atividade de água (Vieira, 2018). Outro fator que está relacionado com o a concentração de pigmentos na semente do urucuzeiro é a variedade da cultura e a qualidade do solo. A partir disso, a concentração de bixina pode variar entre 1% e 6% (Demczuk Junior, 2012).

2.4.2.3 Componentes principais da planta

2.4.2.3.1 Bixina

A bixina é o principal corante presente no urucum, sendo a responsável por uma tonalidade de cor que varia do amarelo ao vermelho. A bixina ($C_{25}H_{30}O_4$) é um diapo-carotenoide que

quimicamente se caracteriza por ser a parte central da molécula de um carotenoide, sem os anéis terminais (Figura 2.3) (Stringheta & Silva, 2008).

A especificidade da bixina quando comparada aos outros carotenoides é que se encontra na configuração *cis* e possui na sua molécula dois grupos carboxílicos, sendo o éster metílico um deles. Por ter essa configuração, caracteriza-se por ser uma molécula lipossolúvel. Quando a bixina sofre um processo de hidrólise alcalina no grupamento metílico forma-se um sal hidrossolúvel de norbixina (Rivera-Madrid et al., 2016).

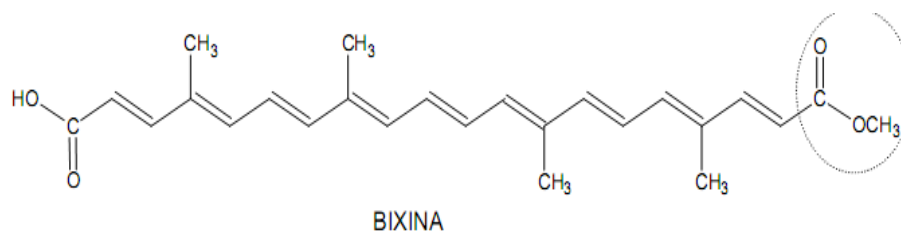


Figura 2.3. Estrutura química da bixina (Stringheta & Silva, 2008)

Em relação a estabilidade do extrato de urucum, quando está na presença de oxigênio em meio anidro é consideravelmente estável, diferentemente quando é submetido aos efeitos de luminosidade. Uma maneira de reverter esta instabilidade do corante é a adição de antioxidantes. A norbixina tem efeito sinérgico com tocoferóis e ácido ascórbico, desacelerando a deterioração oxidativa em emulsões (Kiokias & Gordon, 2003). Chisté et al. (2011) analisaram diferentes extratos de urucum e descobriram uma correlação entre os teores de bixina e os parâmetros de cor (L^* e C^*). Além disso, investigaram a correlação entre os teores de bixina e a atividade antioxidante de acordo com diferentes solventes.

2.4.2.3.2 Norbixina

A norbixina ($C_{24}H_{28}O_4$) se caracteriza pela presença do segundo grupo carboxílico na molécula (Figura 2.4) contribuindo com o aumento da hidrossolubilidade. As ligações duplas conjugadas presentes tanto nas moléculas de norbixina quanto nas de bixina podem sofrer o processo de isomerização. No urucum as configurações encontradas são *cis*-bixina e *cis*-norbixina, porém podem ser transformadas na configuração *trans*, que é mais estável, quando submetida a elevadas temperaturas (Vieira, 2018).

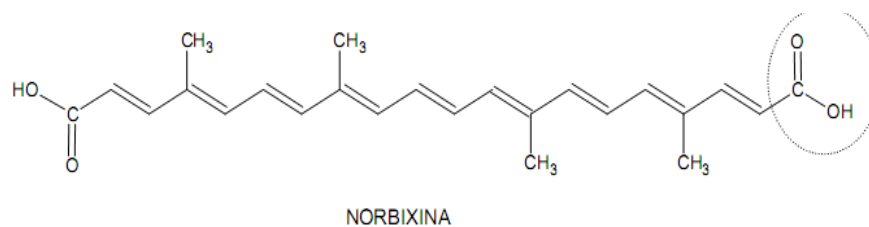


Figura 2.4. Estrutura química da norbixina (Stringheta & Silva, 2008)

Ao adicionar polissorbatos ou propilenoglicol a hidrossolubilidade da norbixina e bixina é aumentada, porém, no urucum encontra-se em diversas configurações, as que são solúveis em água ou em solventes orgânicos, dependendo do meio de extração que será utilizado e também do tipo de misturas, emulsões, diluições e suspensões que são empregadas para a extração ou para a obtenção de um produto final (Venugopalan et al., 2011).

Resumidamente, a bixina ocorre nas configurações estereoquímicas *cis* e *trans*. Em condições normais, a *cis*-bixina ou a *cis*-norbixina são as que predominam, sendo estas configurações com menor estabilidade do que a *trans*-bixina (Constant et al., 2002). Por conta das diferenças estruturais entre a norbixina e bixina, a solubilidade, polaridade e a tonalidade são distintas; como consequência, cada componente poderá ter uma aplicação diferente (Garcia et al., 2012).

2.4.2.4 Outros componentes

Chisté et al. (2011) descobriram que a hipoaletina e os derivados de ácido cafeico são compostos fenólicos e estão presentes na semente de urucum. Em conjunto com os carotenoides, os compostos fenólicos são considerados relevantes para a saúde humana, porque são responsáveis por funções biológicas, tais como, a diminuição do risco de doenças cardiovasculares, inflamatórias e degenerativas (Krinsky, 1994).

A cultura do urucum como planta medicinal está difundida por longos anos, desde a sua utilização pelas comunidades indígenas sul-americanas, como proteção contra queimaduras solares, repelentes de insetos, cicatrizante e antialérgico além do uso da parte da planta para o preparo de chá ou como antidiurético ou para o tratamento de febres (de Moraes et al., 2005). De fato, um estudo coordenado por Coelho et al. (2003) verificou que pigmentos extraídos da flor, folha, fruto, caule e raiz do urucum possuem ação antimicrobiana sobre algumas espécies de bactérias.

A bixina é o único componente do urucum que tem valor comercial, no entanto esta planta possui outros constituintes. O geranilgeraniol (Figura 2.5) é um exemplo disto, este composto possui teores próximos a 1% e está localizado na parte externa da semente, tendo o óleo essencial do urucum como a fonte mais abundante deste componente (Costa & Chaves, 2005). Os resultados obtidos a partir das investigações de Eduardo & Dos Santos (2012) e Jondiko & Pattenden (1989) apontam que este composto é usado como um importante intermediário de biossínteses de substâncias como a vitamina K, de tocoferóis e tocotrienóis, de diversos hormônios e carotenoides.

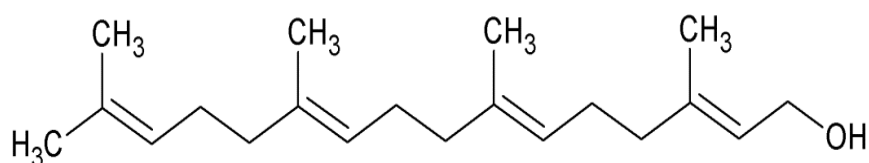


Figura 2.5. Estrutura química do geranilgeraniol (Stringheta & Silva, 2008)

2.4.2.5 Componentes químicos das partes utilizáveis da *Bixa orellana* L.

Os métodos de extração dos pigmentos das sementes de urucum são por processos mecânicos mediante a atrição e raspagem das sementes, por processos físico-químicos através da utilização de solventes e pela utilização de enzimas. Existe certa facilidade ao realizar a extração dos pigmentos das sementes, uma vez que eles estão localizados no pericarpo e estão aderidos a esta superfície por conta de uma resina (Silva, 1999).

No que se refere a extração por solvente, a mesma pode ser feita por três métodos básicos: extração alcalina (solução de NaOH ou KOH) em que ocorre a conversão da bixina em norbixina, extração em óleo (soja, milho, coco) ocasionando a eliminação de bixina e de outros materiais coloridos, porém em quantidades menores; e a extração por solventes orgânicos (clorofórmio, etanol, acetona, propilenoglicol) que é responsável pela extração mais pura dos pigmentos. Independentemente da técnica utilizada é preciso levar em consideração a degradação dos pigmentos por fatores, como por exemplo, exposição à luz e ao calor excessivo (Alves, 2001). A temperatura e o tempo de aquecimento que a semente é submetida são responsáveis pelo balanço da coloração vermelho/amarelo (Lancaster & Lawrence, 1996).

2.4.2.5.1 Extração mecânica

Quando comparada com a extração por solventes, a extração mecânica possui vantagens, as principais delas são: a obtenção de um extrato de bixina sem a presença de outras substâncias, tais como os glicídios que atuam como impurezas no concentrado de corante; a não utilização de solventes, o que evita a combinação dos mesmos no extrato; e a redução de etapas no processo, por exemplo, a não necessidade de separar o solvente do extrato, e da não realização da etapa de secagem após a extração. Porém, mesmo com essas vantagens o rendimento alcançado de bixina é muito inferior ao obtido por extração com solventes (Bhalkar & Dubash, 1983).

A extração em leite de jorro consiste na simples movimentação das sementes de urucum, o choque causado pelo movimento é suficiente para que a bixina seja liberada no fluxo de ar. Outro método de extração é pelo moinho de bolas, onde a liberação de extrato resulta da ação simultânea do atrito entre as sementes e destas com as bolas do moinho. Esses dois tipos de extração precisam ser realizados com bastante precisão, pois a quebra das sementes acarretaria na perda de pigmento, uma vez que o mesmo se encontra no pericarpo da semente e não no seu interior (Guimarães et al., 1989; Massarani et al., 1992).

Na literatura encontra-se estudos que comprovam como a bixina é facilmente extraída das sementes por causa do atrito juntamente com o impacto das partículas. Porém, para que se tenha essa facilidade na extração é preciso que as sementes sejam submetidas a um tratamento, no qual as sementes são secas em baixas temperaturas com o objetivo de preservar a qualidade do pigmento (Alves, 2001).

2.4.2.5.2 Extração por solventes

Diversos autores têm dedicado estudos à forma mais eficiente de extrair pigmentos da semente de urucum com solventes. Segundo Smith & Wallin (2006), os procedimentos são:

Bixina solúvel em solvente orgânico: A extração do pigmento da semente é feita por um solvente apropriado, como por exemplo a acetona. O extrato obtido é purificado com um outro solvente no qual o pigmento não consegue ser dissolvido, geralmente utiliza-se hexano. Essa última etapa tem como finalidade a remoção de impurezas e de odores indesejáveis.

Bixina solúvel em soluções alcalinas: Sob agitação e à temperatura ambiente, as sementes de urucum entram em contato com uma solução de hidróxido de sódio ou de potássio. Como consequência, ocorre o deslocamento e a separação da camada de pigmento. Quimicamente, esta

camada de pigmento é o ácido precipitado. Por fim, ocorre a etapa de filtração que tem como propósito a remoção das impurezas.

Bixina solúvel em óleo vegetal: Sob agitação constante as sementes de urucum são submersas no óleo vegetal sem que a temperatura desse óleo seja maior do que 70°C. Os processos unitários posteriores são a centrifugação e filtração que têm como objetivo a separação das cadeias curtas das de cadeia longa e a remoção dos materiais insolúveis, respectivamente.

Taham et al. (2015) realizaram a extração convencional da bixina com clorofórmio a 50°C. Para que houvesse uma comparação, os autores também efetuaram a extração em água utilizando a mesma temperatura. A condição da temperatura inferior a 80 °C é para garantir que haja a mínima degradação do composto. As extrações ocorreram numa célula de equilíbrio em agitação constante através de um agitador magnético, fixada com um recirculador com o intuito de não perder substâncias voláteis e com a temperatura do banho termostatizado a 5 °C. Obteve-se como resultado uma porcentagem de 4,54% de bixina extraída das sementes, um rendimento global de 35,42%, e uma concentração de bixina de 12,82%.

Além da extração convencional, os autores fizeram a extração mecânica da bixina utilizando o leite do jorro (Taham et al., 2015). Eles definiram duas condições operacionais para o processo das sementes: a primeira tinha o propósito de maximizar a capacidade de obtenção do extrato de urucum com uma porcentagem mínima de 30% de bixina, e a segunda tinha a finalidade de obter extrato de urucum com maior porcentagem de bixina possível sem que houvesse uma definição mínima da quantidade de extrato utilizado. Foi alcançado como resultado da primeira e segunda condição, respectivamente, um rendimento global de 1,31% e 6,93%, e uma concentração de bixina de 3,84% e 31,10%. Por fim, pode-se concluir que a extração em leite de jorro não é mais eficiente do que a extração convencional.

Uma inovação no método tradicional de extração de bixina pelo Soxhlet utilizando clorofórmio como solvente foi proposta por Costa (2007), obtendo uma concentração de 3,6% do carotenoide em vez de apenas 1,3%. A metodologia consistiu na secagem e fragmentação das sementes antes que fosse submetida à extração com clorofórmio durante 6 horas. Uma segunda alteração foi realizada: o sistema de percolação convencional foi alterado para uma placa de teflon perfurada e recoberta com algodão. O resultado foi a apresentação de um concentrado com uma coloração vermelha-púrpura intensa.

Mehta et al. (2015) primeiramente fizeram um teste preliminar com a extração do carotenoide utilizando um solvente alcalino (KOH) seguindo o método empregado por Veríssimo (2003). O objetivo dessa análise era investigar se existia igualdade nas concentrações de bixina quando as sementes são coletadas de diferentes localidades utilizando a mesma metodologia. A conclusão destes autores é bastante relevante pois eles constataram diferenças no teor de bixina devidas às diferentes práticas de cultivo e aos efeitos climáticos.

Após a realização deste teste preliminar, Mehta et al. (2015) prosseguiram com o experimento fazendo uma extração em óleo de mamona. Para tal, as sementes foram submersas em água destilada com volumes diferentes durante 24 horas a temperatura ambiente. Para a extração da cor, as sementes foram retiradas da água, e a cada 10 gramas de semente colocaram 50 ml de óleo de mamona e submeteram a 100 °C por 1 hora. Os investigadores concluíram que quando as sementes são submersas em 500 ml de água se obtém uma maior extração (0,46% bixina) e quando elas estão submersas em volumes maiores como 1000 ml e 1500 ml existe uma diminuição nesse teor de bixina, sendo de 0,44% e 0,41% respectivamente. Esses resultados demonstram que o conteúdo de bixina diminui com a submersão em água e isso pode ser justificado por dois fatores que ocorreram no pré tratamento, o primeiro foi que a camada de pigmento pode ter se desprendido da semente e o segundo foi que o arrefecimento devido à evaporação da água ocorreu simultaneamente durante o processo de extração diminuindo a sua efetividade.

2.4.2.5.3 Determinação do conteúdo de bixina nos extratos

A FAO (2006) apresenta metodologias para a determinação do teor de bixina e norbixina a partir de extratos oleosos e aquosos de urucum bem como de emulsões de extratos. Para extratos de urucum em óleo compostos principalmente de bixina, o método de determinação é o seguinte:

- Transfere-se de 0,1 a 1,0 g de extrato num balão volumétrico de 100 ml, e se adicionam 10 ml de tetrahidrofurano, misturando até dissolver o pigmento;
- Dilui-se até o volume de 100 ml com acetona e mistura-se;
- Transfere-se 1 ml em outro balão volumétrico de 100 ml e complete-se com acetona até os 100 ml;
- Mede-se a absorvância A desta solução ao comprimento de onda de 487 nm;
- Estima-se a concentração de bixina em porcentagem usando a seguinte equação:

$$Bixina (\%) = \frac{A}{3090} \times \frac{100,000}{\text{peso da amostra (mg)}} \times 100$$

- De ser necessário, ajusta-se a quantidade de amostra, se a absorvância *A* não estiver entre 0.2 e 1.0.

2.4.2.6 Aplicação dos extratos de urucum na indústria alimentar

Os extratos de urucum podem estar na forma de pós, pastas, suspensões ou soluções, não podendo ser atribuída nenhuma atividade vitamínica às mesmas. No que se diz respeito ao uso na indústria de alimentos, os extratos de urucum são aplicados em maior proporção nos segmentos de derivados lácteos com a finalidade de intensificar a cor dos queijos, manteigas, iogurtes e margarinas (Bareth et al., 2002).

Em relação à sua aplicação em conservas de carne é por conta da sua inocuidade e da coloração atrativa, além dos embutidos defumados (linguiças), aplica-se em embutidos cozidos como mortadelas, salsichas e salsichões. O emprego do extrato não é feito diretamente na massa dos produtos, e sim na superfície ou nos revestimentos, como é no caso dos embutidos cozidos (Marcolino, 2008).

Em virtude do uso do pó de sementes de urucum como potenciador de sabor na gastronomia de certas regiões do mundo, Van Cuong & Chin (2016) testaram o pó de sementes de urucum como aditivo em almôndegas de porco em concentrações de 0,1%, 0,25% e 0,5% (p/p). Eles observaram que a um nível de 0,25% as almôndegas possuíam não só uma cor mais apelativa devido à presença de bixina e norbixina, como um processo de oxidação lipídica mais lento em comparação às almôndegas controle e menores concentrações de *Enterobacteraceae*. Assim, estes autores concluíram que o pó de semente de urucum podia ser utilizado na produção de almôndegas de carne para estender o tempo de prateleira das mesmas. No entanto, não se tem encontrado na literatura qualquer investigação sobre a aplicação de extratos de sementes de urucum em carnes ou produtos cárneos com fins antioxidantes ou antimicrobianos, pela que a presente investigação serve para preencher esta falta de informação.

2.4.2.7 Legislação

A utilização de corantes alimentares na União Europeia é controlada pela Diretiva 94/36/CE da Comunidade Europeia (Comissão Europeia, 1994). De acordo com essa diretiva, o emprego de urucum, bixina e norbixina como corante em alimentos é autorizado, porém o mesmo não acontece quando se trata da sua utilização em especiarias, óleos e molhos. Um dos programas da Food Standards Agency (Reino Unido) tem como objetivo realizar análises para detectar fraudes alimentares. Numa dessas operações foram realizados ensaios em 893 amostras de alimentos detectando o corante bixina em 18 amostras de especiarias e molhos. Por conta desta situação, criou-se um alerta para RASFF da Europa (Sistema Rápido de Alerta para Alimentação Humana e Animal) gerando uma grande mudança à indústria de alimentos (Broberg, 2010; Scotter, 2009).

Após essa situação, a comissão da União Europeia para esclarecer esta matéria do que seria legal e do que não seria legal, elaborou uma lista de produtos alimentares que poderiam utilizar o corante urucum, bixina e norbixina, no sentido de não se refazer o mesmo procedimento, e ficando assim mais claro em quais situações podem ser utilizados, uma vez que a União Europeia tem uma legislação de corantes diferente às de outros países. De acordo com a legislação da UE, o urucum encontra-se classificado sob nº E160b e CI Natural Color 4 (Comissão Europeia, 1994).

Segundo a ANVISA no Brasil existem três categorias de corantes permitidos em alimentos: o corante caramelo, os corantes artificiais e os corantes naturais. De acordo com Artigo 10 do Decreto nº 55.871, 26 de março de 1965 que é referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, o corante natural é definido como o pigmento ou corante inócuo extraído de substância vegetal ou animal. O urucum é um exemplo de corante natural e um dos mais utilizados na indústria brasileira porque pode ser empregado em diversos alimentos, tais como em iogurtes aromatizados, revestimentos de embutidos e cozidos de carnes, sucos de frutas, biscoitos e similares com ou sem recheio, com ou sem cobertura, entre outros.

Por motivo das limitações do uso de corantes sintéticos, o urucum surge como uma boa alternativa tendo aplicabilidade em diversos setores industriais. Todavia, existem algumas limitações no seu uso, e isso vai depender da legislação em vigor e do produto em questão; cada país é responsável por estabelecer os limites máximos de utilização, que varia de acordo com a natureza do alimento, podendo ou não ser usado como uma especiaria (Scotter, 2009).

2.4.2.8 Toxicologia

Existem investigações desenvolvidas com o objetivo de determinar as concentrações máximas de urucum em produtos alimentares. Os resultados das avaliações revelam largas mudanças decorrentes da composição do extrato de urucum aplicado e também por conta das concentrações utilizadas serem dependentes da matriz alimentícia, estado físico, opacidade do produto e coloração desejada (Tennant & O'Callaghan, 2005). Todavia, em 2002, o Comitê de Especialista em Aditivos Alimentares (JECFA) da FAO/WHO estabeleceu um limite para a ingestão deste extrato, formado essencialmente por bixina, de, no máximo, 0,065 mg/kg de peso corpóreo/dia (JECFA, 1982).

Paumgartten et al., (2002) analisaram extratos de urucum (28% de bixina) com relação a sua toxicidade em ratas. O experimento consistiu na introdução de quantidades até de 500 mg/kg de massa corporal/dia no estômago de ratas grávidas, para examinar o efeito nas mães e nos fetos. Como resultado, não houve efeito adverso nas mães, nem nos fetos. Concluiu-se que o extrato de urucum não exibiu toxicidade.

Análises feitas por de Lima et al. (2003) demonstraram que extratos de urucum na alimentação de ratos machos não exibiu nenhuma atividade mutagênica ou antimutagênica nas células de medula dos ratos. Hagiwara et al. (2003) examinaram o aparecimento de tumor de fígado em ratos quando foram introduzidos extratos de urucum na alimentação, e contestou-se que mesmo com a aplicação de doses elevadas como 200 mg/kg de massa corporal/dia a possibilidade da existência de um perigo com potencial hepatocarcinogênico para o homem é desprezível.

2.5 Modelação da cinética microbiana

2.5.1 Estudos de desafio ou inoculação

Os testes de desafio microbiológico são uma ferramenta de grande utilidade para estabelecer a capacidade de um alimento de suportar o crescimento de bactérias deteriorantes ou agentes patogênicos. Estes testes servem para caracterizar a cinética de crescimento, inativação ou sobrevivência de um microrganismo num alimento em função a características tanto intrínsecas (pH, atividade de água etc.) como extrínsecas (temperatura, atmosfera produzida pela embalagem etc.). Os estudos de desafio microbiológico também exercem um papel fundamental

na autenticação de processos que determinam o grau de letalidade contra um microrganismo ou um grupo de microrganismos que fazem parte do ensaio. Em certos testes de desafio de patogênicos, existe uma norma de desempenho que está relacionada com o que o procedimento deve gerar como resultado, por exemplo, em carnes fermentadas o processamento deve visar atingir redução de 5 log de *E. coli* O157:H7. A realização dos ensaios de forma adequada pode assim validar a compatibilidade de um processo de inativação com o desempenho pré-estabelecido por diretrizes regulatórias.

O planejamento, a aplicação e a avaliação dos estudos de desafio microbiológico são trabalhos de grande complexidade, e são dependentes dos fatores que se relacionam com todas as etapas de um alimento (formulação, fabricação, embalagem, distribuição, preparo e consumo). Todos esses processos são fundamentais para que se possa desenhar uma metodologia de investigação que melhor avalie a segurança de um alimento (Notermans et al., 1993).

Os estudos de desafio também são utilizados para determinar o tempo de prateleira de produtos refrigerados ou que são dispostos em temperatura ambiente. Na determinação do prazo de validade é considerada a probabilidade de um produto tolerar o crescimento de bactérias deteriorantes ou agentes patogênicos. Por exemplo, esses estudos de desafio não têm utilidade quando são realizados em alimentos congelados que não suportam o crescimento do microrganismo sob condições de armazenamento adequado (Curiale, 1991).

Basicamente, num estudo de desafio inocula-se o microrganismo selecionado num ponto de interesse dentro da cadeia de produção, e determina-se mediante análises ao longo do tempo o crescimento ou inativação do microrganismo. Existem fatores que devem ser considerados para a realização de um estudo de inoculação, tais como: a seleção dos patógenos ou os substitutos apropriados, o nível de inoculação, o preparo e o método de inoculação, a duração do estudo, a formulação e as condições de armazenamento e as análises das amostras (Vestergaard, 2001).

O experimento realizado por Uyttendaele et al. (2004) avaliou um protocolo de teste de desafio que é aplicado em produtos de carne cozida prontos para consumo com a finalidade de definir as estirpes de *L. monocytogenes* com comportamento expressivo, inicialmente, a variabilidade de respostas múltiplas de estirpes de *L. monocytogenes* de origem humana e alimentar em diferentes condições de estresse e crescimento. Foi inoculado um *cocktail* de quatro estirpes de *L. monocytogenes*, duas clínicas (2000/097 e Scott A 3955) e duas encontradas em alimentos (2000/099 e 2000/071/02) para atribuir maior credibilidade no teste sem comprometer

a segurança dos presuntos que estavam embalados a vácuo e em atmosfera modificada. Um dos intuitos do trabalho foi determinar a influência da temperatura de pré-incubação no crescimento sequencial das bactérias no teste de desafio. Como resultado, em 5 dias, houve um aumento de aproximadamente 2 log do inóculo tanto do microrganismo padrão quanto do que estava adaptado ao frio no produto, ultrapassando em ambos casos o limite máximo de 100 UFC/ml que garante a sua segurança. Este estudo permitiu caracterizar os parâmetros cinéticos da *L. monocytogenes* em presunto, e conhecendo os mesmos, é possível determinar um alvo de concentração máxima de *L. monocytogenes* em presuntos no fim da produção.

2.5.2 Microbiologia preditiva

A microbiologia preditiva surge como uma ferramenta essencial da microbiologia para garantir a qualidade e a segurança dos alimentos possibilitando antecipar a resposta do crescimento ou sobrevivência do microrganismo frente a inúmeros fatores como por exemplo, temperatura, condições de armazenamento, umidade e pH. Com esta antecipação é possível analisar riscos, avaliar tempo de prateleira, e desenvolver novos produtos e processos (Oliveira et al., 2013).

A microbiologia preditiva foca-se tanto nas bactérias deteriorantes como nas patogênicas. Devido ao crescente número de indivíduos que são atingidos por doenças de origem alimentar (DOA), a microbiologia preditiva enfatiza no potencial crescimento excessivo de bactérias deteriorantes e patogênicas, possibilitando o acúmulo de informações quantitativas sobre o comportamento do microrganismo presente no alimento. Segundo Lederberg (1997), estes microrganismos adaptam-se de forma rápida a mudanças, decorrente da sua alta velocidade de reprodução e da obtenção de novos genes, permitindo a emergência e reemergência das bactérias patógenas veiculadas por alimentos.

Os modelos preditivos são derivados de observações obtidas a partir de experiências desenvolvidas sob condições controladas, como é o caso dos estudos microbiológicos de desafio ou inoculação. Devido aos experimentos com alimentos que podem ser laboriosos e complexos, os dados para microbiologia preditiva devem ser obtidos em desenhos experimentais simples onde os fatores intrínsecos e/ou extrínsecos são mantidos.

O primeiro estudo utilizando microbiologia preditiva foi descrito por Esty & Meyer que relataram a morte térmica de esporos de *Clostridium botulinum* tipo A por meio de um modelo linear. Neste modelo foi mostrado que a determinada temperatura, a relação entre a taxa de mortalidade do patógeno com o tempo torna-se constante (Baranyi & Roberts, 1994).

O crescimento, a sobrevivência e a morte de um microrganismo são definidas pelas propriedades intrínsecas dos alimentos (atividade de água, potencial redox e pH) e por fatores extrínsecos (temperatura, umidade relativa e atmosfera). A microbiologia preditiva retrata de forma quantitativa os efeitos destes fatores intrínsecos e extrínsecos no crescimento ou na inativação dos microrganismos nos alimentos. Baseado nesta descrição, os modelos matemáticos provenientes dos estudos de desafio ou inoculação são constituídos, e geram curvas de crescimento ou inativação microbiana (Dannenhauer, 2010; Nakashima et al., 2000).

Esses modelos preditivos podem ser definidos como equações matemáticas capazes de descrever o crescimento, sobrevivência, inativação ou processo bioquímico de um determinado microrganismo. Especificamente, ao serem aplicados numa indústria alimentar possibilitam analisar objetivamente as modificações causadas pela carga microbiana em um alimento desde colheita até a produção. Com a utilização dessa modelação a indústria consegue: controlar as etapas de transformação, armazenamento e distribuição dos alimentos; estabelecer pontos críticos em uma Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP); analisar as consequências dos desvios de processos sobre os pontos referentes ao controle microbiológico (McDonald & Sun, 1999; Stavropoulou & Bezirtzoglou, 2019).

As autoridades responsáveis pela qualidade e segurança dos alimentos também podem utilizar esses modelos para realizar a avaliação dos riscos e elaborar medidas de segurança alimentar. Além do mais, pesquisadores podem aplicar estes modelos para compreenderem melhor as diferentes tecnologias de processamento que atuam sobre os microrganismos, e entender seu comportamento para que seja possível a criação de testes microbianos mais simples, além de uma criação de base de dados (Stavropoulou & Bezirtzoglou, 2019).

Contudo, a microbiologia preditiva possui limitações que precisam ser levadas em consideração. Tais como, os modelos preditivos não podem ultrapassar as condições das quais os intervalos de temperatura e atividade de água encontram-se fora das circunstâncias originárias, porque as previsões que não estão nos intervalos experimentais não são exatas. Os estudos são feitos em laboratório, onde as cepas inoculadas podem não ter necessariamente a mesma cinética

das cepas presentes na fábrica de alimentos. Da mesma forma, o nível de estresse ao qual as bactérias são submetidas no processamento real, pode não ser imitado na sua totalidade num laboratório de microbiologia (Fakruddin et al., 2011).

2.5.3 Tipos de modelos microbiológicos preditivos

Tradicionalmente, os modelos microbiológicos preditivos classificam-se como primários, secundários e terciários, embora existam outras classificações. Os modelos primários têm por objetivo estimar os parâmetros cinéticos do microrganismo, nomeadamente, taxa de crescimento ou inativação, duração da fase lag ou concentração microbiana inicial/máxima a partir de ensaios de desafio onde a concentração microbiana é medida ao longo do tempo num caldo de cultura ou alimento mantido a condições ambientais constantes (por exemplo, a temperatura constante). Por esta, os parâmetros cinéticos obtidos baixo um modelo primário somente se aplica aos fatores intrínsecos ou extrínsecos que caracterizaram às observações. Um modelo primário de crescimento muito utilizado é o modelo logístico de Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994), e um modelo primário de inativação ou sobrevivência muito utilizado é o modelo de Weibull nas suas diferentes parametrizações. O modelo de Weibull assume uma não linearidade da curva dos sobreviventes no processo de inativação como consequência do princípio de variação biológica na resistência à inativação entre os microrganismos da mesma espécie. Desta forma, o modelo de Weibull é mais flexível que o simples modelo linear que fornece os valores de letalidade D (Van Boekel, 2002).

Os modelos secundários têm por objetivo prever as mudanças nos parâmetros cinéticos tais como taxa de crescimento/inativação e duração da fase lag como uma função dos fatores intrínsecos e/ou extrínsecos. As expressões matemáticas dos modelos secundários têm dois enfoques (Pérez-Rodríguez & Valero, 2013):

- Os efeitos dos fatores ambientais são descritos simultaneamente através de uma função polinomial; este tipo de modelo é de fácil aplicação na microbiologia preditiva, embora não admita extrapolação nas previsões; e
- Os fatores ambientais são modelados individualmente, e um modelo geral é que descreve os efeitos combinados de todos os fatores; este enfoque é o mais notável na microbiologia preditiva e compreende os modelos da raiz quadrada e os modelos de tipo cardinais.

2.6 Referências

- Akshatha, V., Giridhar, P., & Ravishankar, G. (2011). Morphological diversity in *Bixa orellana* L. and variations in annatto pigment yield. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 86(4), 319-324.
- Altunatmaz, S. S., Aksu, F. Y., Issa, G., Kahraman, B. B., Altiner, D. D., & Buyukunal, S. (2016). Antimicrobial effects of curcumin against *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* and *E. coli* O157: H7 pathogens in minced meat. *Veterinari Medicina*, 61(5).
- Alves, E. G., Vinholis, A. H. C., Casemiro, L. A., Furtado, N. A. J. C., Silva, M. L. A., Cunha, W. R., & Martins, C. H. G. (2008). Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova*, 31(5), 1224-1229.
- Alves, R. W. (2001). *Extração e purificação de corantes de urucum*. Tese de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/81775>. Acessado 11 de abril de 2020.
- Anvisa. (1965). Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965. In: Diário Oficial da União Brasília.
- Araújo, G. d. S. (2008). *Produção de biodiesel a partir de óleo de coco (Cocos nucifera L.)*. Tese de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Disponível: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/15750/1/GiselleSA.pdf>. Acessado 11 de abril de 2020.
- Aydin, A., Sudagidan, M., & Muratoglu, K. (2011). Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 148(2), 99-106.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3-4), 277-294.
- Bareth, A., Strohmar, W., & Kitzelmann, E. (2002). HPLC and spectrophotometric determination of annatto in cheese. *European Food Research and Technology*, 215(4), 359-364.
- Bhalkar, S., & Dubash, P. (1983). Methods of extraction of annatto from the seeds of *Bixa orellana*. *Indian Journal of Dairy Science*, 36(2), 157-161.
- Broberg, M. (2010). Global Agro-Food Trade and Standards. In: Gibbon P., Ponte S., Lazaro E. (Eds), *European Food Safety Regulation and Developing Countries' Regulatory Problems and Possibilities*. Palgrave Macmillan, Londres.
- 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.
- Chisté, R. C., Yamashita, F., Gozzo, F. C., & Mercadante, A. Z. (2011). Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. *Journal of Chromatography A*, 1218(1), 57-63.
- 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.

-
- Constant, P. B. L., Stringheta, P. C., & Sandi, D. (2002). Corantes alimentícios. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 20(2).
- Costa, C. K. (2007). *Estudo fitoquímico de Bixa orellana L., Bixaceae e aplicação de seu óleo em formulação cosmética*. Tese de mestrado, Universidade Federal do Paraná. Disponível:
<https://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/10322/BIXA%20ORELLANA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acessado em 11 de abril de 2020.
- 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.
- Cui, H., Zhang, X., Zhou, H., Zhao, C., & Lin, L. (2015). Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil. *Botanical studies*, 56(1), 1-8.
- Curiale, M. S. (1991). Shelf-life evaluation analysis. *Dairy Food Environ Saint*, 11(4), 364-369.
- Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343-356.
- da Cruz, P. B., & Pereira, C. A. M. (2010). Avaliação da presença de antimicrobianos naturais em condimentos industrializados. *Revista Simbio-Logias*, 3(5), 125-131.
- Dannenhauer, C. (2010). *Desenvolvimento de um aplicativo computacional para microbiologia preditiva*. Tese de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível:
<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/93671/279602.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acessado 11 de abril de 2020.
- Das, K., Tiwari, R., & Shrivastava, D. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 104-111.
- de Alcantara, M., de Moraes, I. C. L., de Matos, C., & de Souza, O. d. C. C. (2012). Principais microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 6(1), 1-20.
- DebMandal, M., & Mandal, S. (2011). Coconut (*Cocos nucifera* L.: *Arecaceae*): in health promotion and disease prevention. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(3), 241-247.
- Djenane, D., Yangüela, J., Amrouche, T., Boubrit, S., Boussad, N., & Roncalés, P. (2011). Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. *Food Science and Technology International*, 17(6), 505-515.
- Djenane, D., Yangüela, J., Derriche, F., Bouarab, L., & Roncales, P. (2012). Olive tree leaf extract; in vitro tests on *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Pseudomonas aeruginosa*; application in turkey meat. *Phytotherapie-Heidelberg*, 10(1), 10.
- de Felício, P. E. (1997). Fatores ante e post mortem que influenciam na qualidade da carne bovina. *Produção de novilho de corte*, 1, 79-97.
- de Lima, R. A., Azevedo, L., Ribeiro, L. R., & Salvadori, D. M. F. (2003). Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. *Food and Chemical Toxicology*, 41(2), 189-192.
- de Moraes, S. M., Dantas, J. D. a. P., da Silva, A. R. A., & Magalhães, E. F. (2005). Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15(2), 169-177.

- de Pinho, A. P. S., & Souza, A. F. (2018). Extração e caracterização do óleo de coco (*Cocos nucifera* L.). *Revista Perspectivas Online: Biológicas & Saúde*, 8(26), 9-18.
- Demczuk Junior, B. (2012). Estabilidade e aplicação do corante de urucum no Estado do Paraná.
- Drago, L., De Vecchi, E., Nicola, L., & Gismondo, M. R. (2007). In vitro evaluation of antibiotics' combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. *BMC Infectious Diseases*, 7(1), 111.
- Eduardo, K., & Dos Santos, V. (2012). Extração, Separação de Geranilgeraniol em sementes de urucum. 6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica. Jaguariúna, SP.
- European Commission. 1994. European Parliament and Council Directive 94/36/EC, of 30 June 1994 on colours for use in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities L*, 237, 13-29.
- Fakruddin, M., Mazumder, R. M., & Mannan, K. S. B. (2011). Predictive microbiology: modeling microbial responses in food. *Ceylon Journal of Science*, 40(2), 121-131.
- FAO (2006). Annatto extracts: chemical and technical assessment, in: 67th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, Italy, 2006. Disponível: <ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/ctaannatto.pdf>. Acessado 11 de abril de 2020.
- Faria, L. J. G. d. (1998). Análise experimental do processo de secagem de urucum (*Bixa orellana* L.) em leito fixo. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas. Disponível: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266444>. Acessado 11 de abril de 2020.
- Fennell, C., Lindsey, K., McGaw, L., Sparg, S., Stafford, G., Elgorashi, E., Grace, O., & Van Staden, J. (2004). Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2-3), 205-217.
- Figueira, C. d. N. T. (2012). *Avaliação da atividade antimicrobiana, citotóxica e capacidade sequestradora de radicais livres de extratos brutos do Cocos nucifera Linn.* Tese de mestrado, Universidade Federal de Alagoas. Disponível: <http://www.repositorio.ufal.br/handle/riufal/1170>. Acessado 11 de abril de 2020.
- Fischmann, M. S. (2016). *Avaliação da vida-de-prateleira e qualidade da carne bovina submetidas a embalagens sob diferentes atmosferas.* Tese de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/158091>. Acessado 11 de abril de 2020.
- Fontenele, R., & Brasil, C. D. C. N. (2005). Caracterização Do Mercado Atual E Perspectivas Futuras. XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural. Ribeirão Preto, SP.
- Franco, C., Silva, F., Filho, J., Neto, M., José, A., Rebouças, T., Fontinelli, I., & Barbosa, A. (2002). Urucum: agronegócio de corantes naturais. Disponível: http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev_1/pal01.pdf. Acessado 11 de abril de 2020
- Franco, C., Silva, F., Filho, J., Neto, M., José, A., Rebouças, T., Fontinelli, I., & Barbosa, A. (2008). Etnobotânica e Taxonomia do Urucuzeiro. Disponível: http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/UrucumTaxon/index.htm. Acessado 11 de abril de 2020
- Garcia, C. E. R., Bolognesi, V. J., Dias, J. d. F. G., Miguel, O. G., & Costa, C. K. (2012). Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. *Ciência Rural*, 42(8), 1510-1517.

-
- Guedes, R. C., Nogueira, N. G., Fusco-Almeida, A. M., Souza, C. R., & Oliveira, W. P. (2009). Atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Petiveria alliacea* L. *Latin American Journal of Pharmacy*, 28(4), 520-524.
- Guimarães, I., Barbosa, A., & Massarani, G. (1989). Nota sobre a Produção de Concentrado de Bixina em Leito de Jorro. *Revista Brasileira de Engenharia Química*, 12(2), 22-23.
- Hagiwara, A., Imai, N., Ichihara, T., Sano, M., Tamano, S., Aoki, H., Yasuhara, K., Koda, T., Nakamura, M., Shirai, T. (2003). A thirteen-week oral toxicity study of annatto extract (norbixin), a natural food color extracted from the seed coat of annatto (*Bixa orellana* L.), in Sprague–Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, 41(8), 1157-1164.
- Hanson, B., Dressler, A., Harper, A., Scheibel, R., Wardyn, S., Roberts, L., Kroeger, J., & Smith, T. (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.
- Hennekinne, J-A., De Buyser, M-L., & Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 815-836.
- Hu, Y., Qiao, J., Zhang, X., & Ge, C. (2011). Antimicrobial effect of *Magnolia officinalis* extract against *Staphylococcus aureus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(6), 1050-1056.
- Ingram, J. S., & Francis, B. J. (1969). The annatto tree (*Bixa orellana*, L.) - A guide to its occurrence, cultivation, preparation and uses. *Tropical Science*, 11, 97-103.
- Jayasingh, P., Cornforth, D. P., Carpenter, C. E., & Whittier, D. (2001). Evaluation of carbon monoxide treatment in modified atmosphere packaging or vacuum packaging to increase color stability of fresh beef. *Meat science*, 59(3), 317-324.
- JECFA (1982). Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Twenty-sixth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *Technical Report Series*, 683.
- Jeremiah, L. E. (2001). Packaging alternatives to deliver fresh meat using short or long-term distribution. *Food Research International*, 34(9), 749-772.
- Jondiko, I. J., & Pattenden, G. (1989). Terpenoids and an apocarotenoid from seeds of *Bixa orellana*. *Phytochemistry*, 28(11), 3159-3162.
- Karaman, I., Şahin, F., Güllüce, M., Öğütçü, H., Şengül, M., & Adıgüzel, A. (2003). Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 85(2-3), 231-235.
- Kerekes, E.-B., Vidács, A., Török, J. J., Gömöri, C., Petkovits, T., Chandrasekaran, M., Kadajkunnan, S., Alharbi, N. S., Vágvölgyi, C., & Krisch, J. (2016). Anti-listerial effect of selected essential oils and thymol. *Acta Biologica Hungarica*, 67(3), 333-343.
- Khanjari, A., Bahonar, A., Noori, N., Siahkalmahaleh, M. R., Rezaeigolestani, M., Asgarian, Z., & Khanjari, J. (2019). In vitro antibacterial activity of *Pimpinella anisum* essential oil and its influence on microbial, chemical, and sensorial properties of minced beef during refrigerated storage. *Journal of Food Safety*, 39(4), e12626.
- Khoramnia, A., Ebrahimpour, A., Ghanbari, R., Ajdari, Z., & Lai, O.-M. (2013). Improvement of medium chain fatty acid content and antimicrobial activity of coconut oil via solid-state fermentation using a Malaysian *Geotrichum candidum*. *BioMed Research International*. DOI:10.1155/2013/954542
- Kiokias, S., & Gordon, M. H. (2003). Antioxidant properties of annatto carotenoids. *Food Chemistry*, 83(4), 523-529.

-
- Krinsky, N. I. (1994). The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 66(5), 1003-1010.
- Lancaster, F. E., & Lawrence, J. F. (1996). High-performance liquid chromatographic separation of carminic acid, α - and β -bixin, and α - and β -norbixin, and the determination of carminic acid in foods. *Journal of Chromatography A*, 732(2), 394-398.
- Langfield, R. D., Scarano, F. J., Heitzman, M. E., Kondo, M., Hammond, G. B., & Neto, C. C. (2004). Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2-3), 279-281.
- Leal, F., & de Clavijo, C. M. (2011). Annatto: botany and horticulture. *Horticultural reviews*, 39(2), 389-419.
- Lederberg, J. (1997). Infectious disease as an evolutionary paradigm. *Emerging Infectious Diseases*, 3(4), 417.
- López-Gutierrez, L., Martínez, A. B., & Mahecha, H. S. (2017). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from meat raw in Cartagena, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 70(1), 8091-8098.
- Lourenço, J., Neto, L. S., Silva, C., Coêlho, D., & Carvalho, S. (2016). Extração mecânica de óleo de coco (*Cocos nucifera L.*). XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Fortaleza, CE.
- Lúcio, I. M. L., Almeida, L. C. T. d., Tenório, L. M. d. M. C., Veríssimo, R. C. S. S., & Bastos, M. L. d. A. (2012). Potencial antimicrobiano do óleo de coco no tratamento de feridas. *Revista de Rede de Enfermagem do Nordeste*, 13(4), 880-887.
- Luppens, S. B., Reij, M. W., van der Heijden, R. W., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2002). Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4194-4200.
- Mano, S. B., Ordóñez Pereda, J. A., de Fernando, G., & Doroteu, G. (2002). Aumento da vida útil e microbiologia da carne suína embalada em atmosfera modificada. *Food Science and Technology*, 22(1), 1-10.
- Marcolino, V. A. (2008). *Inclusão de bixina, curcumina e betanina em ciclodextrina para aplicação na indústria de alimentos*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas. Disponível: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/254748>, Acessado 11 de abril de 2020
- Marina, A., Che Man, Y., Nazimah, S., & Amin, I. (2009). Chemical properties of virgin coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(4), 301-307.
- Massarani, G., Passos, M., & Barreto, D. (1992). Production of annatto concentrates in spouted beds. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 70(5), 954-959.
- Mehta, A., Behera, L., Tandel, M., Jadeja, D., & Vashi, B. (2015). Efficacy of different oils used for the extraction of annatto colour from the seeds of *Bixa orellana L.* *Journal of Applied and Natural Science*, 7(2), 828-831.
- McDonald, K., & Sun, D.-W. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 52(1-2), 1-27.
- Miranda, R. M. d., Nery, L. A., & Ventrella, M. C. (2017). Extrafloral nectaries of annatto (*Bixa orellana L.*): anatomy, nectar composition and activity during organ development. *Acta Botanica Brasilica*, 31(3), 468-476.
- Mitchell, G., Lafrance, M., Boulanger, S., Séguin, D. L., Guay, I., Gattuso, M., Marsault, E., Bouarab, K., & Malouin, F. (2012). Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside

- antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(3), 559-568.
- Moreira, A. C. A., Pereira, M. H. Q., Porto, M. R., da Rocha, L. A. P., Nascimento, B. C., & Andrade, P. M. (2009). Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 8(2), 153-161.
- Moretto, E. (1998). Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos: Varela.
- Moura, A., Acioli, R., Duarte, D., Pinheiro J., Alcântara, J., & Mota, R. (2006). Caracterização e perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de carne caprina comercializadas em mercados e supermercados em Recife, PE. *Arquivos Instituto Biológico de São Paulo*, 73(1), 7-15.
- Nakashima, S. M., André, C. D. S. d., & Franco, B. D. G. d. M. (2000). Revisão: aspectos básicos da Microbiologia. *Brazilian Journal of Food Technology*, 3, 41-51.
- Nogueira, L. G. (2012). *Avaliação do potencial antimicrobiano de Pouteria spp. e de triterpenos quinonametídeos com enfoque no Helicobacter pylori*. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista. Disponível: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/103872>, Acessado 11 de abril de 2020.
- Notermans, S., In't Veld, P., Wijtzes, T., & Mead, G. (1993). A user's guide to microbial challenge testing for ensuring the safety and stability of food products. *Food Microbiology*, 10(2), 145-157.
- Oliveira, A. P. d., Rezende, C. S. M., Sola, M. C., Feistel, J. C., & Oliveira, J. J. d. (2013). Microbiologia preditiva. Enciclopédia Biosfera. *Centro Científico Conhecer*, 9(17), 1909-1928.
- Oliveira, M. M. M. d., Brugnera, D. F., & Piccoli, R. H. (2013). Essential oils of *Thyme* and *Rosemary* in the control of *Listeria monocytogenes* in raw beef. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1181-1188.
- Oliveira, T. L. C. d., Cardoso, M. d. G., Soares, R. d. A., Ramos, E. M., Piccoli, R. H., & Tebaldi, V. M. R. (2013). Inhibitory activity of *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. essential oils against *Listeria monocytogenes* inoculated in bovine ground meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 357-365.
- Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O., & Freitas, B. R. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 301-307.
- Palombo, E. A. (2011). Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. DOI:10.193/ecam/nep067.
- Paumgarten, F., De-Carvalho, R., Araujo, I., Pinto, F., Borges, O., Souza, C., & Kuriyama, S. (2002). Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 40(11), 1595-1601.
- Pérez-Rodríguez, F., & Valero, A. (2013). Predictive models: foundation, types, and development. In *Predictive Microbiology in Foods*, 25-55. *SpringerBriefs in Food, Health and Nutrition*. Nova York.
- Pinto, T. d. J. A., Kaneko, T. M., & Pinto, A. F. (2015). *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. Tese de mestrado, Universidade de São

-
- Paulo. Disponível: <https://repositorio.usp.br/item/002687209>. Acessado 11 de abril de 2020.
- Ponath, F. S., Valiatti, T. B., Sobral, F. d. O. S., Romão, N. F., Alves, G. M. C., & Passoni, G. P. (2016). Avaliação da higienização das mãos de manipuladores de alimentos do Município de Ji-Paraná, Estado de Rondônia, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 7(1), 63-69.
- Rivera-Madrid, R., Aguilar-Espinosa, M., Cárdenas-Conejo, Y., & Garza-Caligaris, L. E. (2016). Carotenoid derivatives in achiote (*Bixa orellana*) seeds: synthesis and health promoting properties. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1406.
- Rozatto, M. R. (2012). *Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de Arrabidaea brachypoda*. Tese de mestrado, Universidade Estadual Paulista. Disponível: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/94817>. Acessado 11 de abril de 2010.
- Salavessa, J. J. S. M. (2009). *Salsicharia tradicional da zona do Pinhal: caracterização e melhoramento da tecnologia de fabrico dos Maranhos*. Tese de doutorado, Universidade Técnica de Lisboa. Disponível: <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/2843/1/Tese%20Doutoramento%20Jo%c3%a3o%20Salavessa%20Vers%c3%a3o%20definitiva.pdf>. Acessado 11 de abril de 2020.
- Sallam, K. I., Abd-Elghany, S. M., Elhadidy, M., & Tamura, T. (2015). Molecular characterization and antimicrobial resistance profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail chicken. *Journal of Food Protection*, 78(10), 1879-1884.
- Salazar-Aranda, R., Pérez-Lopez, L. A., Lopez-Arroyo, J., Alanís-Garza, B. A., & Waksman de Torres, N. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. *Evidenc Based Complementary and Alternative Medicine*. DOI:10.193/ecam/nep127.
- Scotter, M. (2009). The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. *Food Additives and Contaminants*, 26(8), 1123-1145.
- Silva, G. F. d. (1999). *Extração de pigmentos do urucum com CO2 supercrítico*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas. Disponível: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/256360>. Acessado 11 de abril de 2020.
- Silva, M. G. F. d. (2011). *Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de óleos essenciais e extratos hidroalcóolicos de manjerona (Origanum majorana L.) e manjerição (Ocimum basilicum L.)*. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Disponível: <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/440>. Acessado: 11 de abril de 2020.
- Smith, J., & Wallin, H. (2006). Annatto extracts chemical and technical assessment report.
- Springfield, E., Amabeoku, G., Weitz, F., Mabusela, W., & Johnson, Q. (2003). An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. *Phytomedicine*, 10(5), 434-439.
- Stavropoulou, E., & Bezirtzoglou, E. (2019). Predictive Modeling of Microbial Behavior in Food. *Foods*, 8(12), 654.
- Stringheta, P., & Silva, P. (2008). Pigmentos de urucum: Extração, reações químicas, usos e aplicações. Suprema. Viçosa.
- Taham, T., Cabral, F. A., & Barrozo, M. A. (2015). Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. *The Journal of Supercritical Fluids*, 100, 175-183.

- 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.
- Tatini, S., & Bennett, R. (1999). *Staphylococcus* detection by cultural and modern techniques. . *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2071-2076.
- Tennant, D., & O'Callaghan, M. (2005). Survey of usage and estimated intakes of annatto extracts. *Food Research International*, 38(8-9), 911-917.
- Uyttendaele, M., Rajkovic, A., Benos, G., Francois, K., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2004). Evaluation of a challenge testing protocol to assess the stability of ready-to-eat cooked meat products against growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 90(2), 219-236.
- Valério, M. A., Ramos, M. I. L., Braga Neto, J. A., & Macedo, M. L. R. (2015). Annatto seed residue (*Bixa orellana* L.): nutritional quality. *Food Science and Technology*, 35(2), 326-330.
- Van Cuong, T., & Chin, K. B. (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.
- 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.
- Venturini, A. C. (2007). *Sistemas de embalagens para carne bovina fresca em atmosfera modificada contendo reduzido nível de monóxido de carbono e elevadas concentrações de dióxido de carbono*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas. Disponível: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/254569>. Acessado: 11 de abril de 2020.
- Venugopalan, A., Giridhar, P., & Ravishankar, G. (2011). Food, ethanobotanical and diversified applications of *Bixa orellana* L.: a scope for its improvement through biotechnological mediation. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 1(4), 9-31.
- Veríssimo, S. A. (2003). *Extração, caracterização e aplicação do corante de urucum (Bixa orellana L.) no tingimento de fibras naturais*. Tese de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Disponível: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/15862>. Acessado 11 de abril de 2020.
- Vestergaard, E. M. (2001). Building product confidence with challenge studies. *Dairy Food and Environmental Sanitation*, 21(3), 206-209.
- Vieira, M. M. Ó. (2018). *Bixa orellana* L. Tese de mestrado, Universidade de Algarve. Disponível: <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/12362>. Acessado: 11 de abril de 2020.
- Vignolo, G., & Fadda, S. (2007). Handbook of fermented meat and poultry. In Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I; Nip, W.; Sebranek, J.; Silveira, E.; Stahnke, L. & Talon, R. (Eds), *Starter cultures: Bioprotective cultures*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Wang, X., Tao, X., Xia, X., Yang, B., Xi, M., Meng, J., Zhang, J., & Xu, B. (2013). *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken in China. *Food Control*, 29(1), 103-106.
- Warth, A. D. (1989). Transport of benzoic and propanoic acids by *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology*, 135(5), 1383-1390.

- Wu, S., Huang, J., Wu, Q., Zhang, J., Zhang, F., Yang, X., Wu, H., Zenga, H., Chen, M., Lei, T., Zhang, T., & 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).
- Zakrys, P., O'Sullivan, M., Allen, P., & Kerry, J. (2009). Consumer acceptability and physiochemical characteristics of modified atmosphere packed beef steaks. *Meat science*, 81(4), 720-725.

3 MODELAÇÃO META-ANALÍTICA DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DOS EXTRATOS DE URUCUM CONTRA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

3.1 Introdução

Até a data existem vários reportes científicos sustentando a capacidade antimicrobiana dos extratos das folhas e sementes de *Bixa orellana* contra microrganismos como *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., entre outros. Estes estudos são notáveis pela diversidade de métodos de extração em solventes inorgânicos (água, álcali) e orgânicos (em solventes como etanol, metanol, clorofórmio etc.) utilizados, assim como pelas diferenças nas técnicas de quantificação da capacidade antimicrobiana.

A meta-análise define-se como a análise estatística de uma coleção de resultados analíticos com o propósito de integrar uma grande quantidade de estudos primários. Esta técnica permite também a explicação das divergências encontradas entre estudos primários mediante a codificação de variáveis moderadoras que representam características de estudo relacionadas ao desenho experimental, à metodologia de análise, ao tipo e origem de amostras, etc., com a finalidade de reduzir a variabilidade ou heterogeneidade entre estudos (Prado-Silva et al., 2015).

Na última década, a meta-análise tem sido aplicada para sumariar informação de segurança alimentar, tal como efeitos das etapas de processamento e das intervenções que visam reduzir o risco alimentar (Zhilyaev et al., 2017), e tem também sido utilizada como uma ferramenta de síntese para dados de microbiologia preditiva (Silva et al., 2015) e para os modelos de avaliação da exposição de patógenos (Gonzales-Barron et al., 2016). Contudo, a meta-análise ainda não tem sido aplicada para sumariar a susceptibilidade microbiana *in vitro* aos diversos extratos. Isto seria interessante porque permitiria comparar a capacidade antimicrobiana de extratos da mesma planta, porém produzidos em zonas geográficas diferentes, assim como os efeitos dos métodos de extração e solventes utilizados.

Assim, o objetivo do presente capítulo foi realizar uma revisão sistemática e meta-análise da capacidade antimicrobiana *in vitro* dos extratos de folhas e sementes de urucum contra *S. aureus*, mensurada como diâmetros de inibição em ágar e como concentração mínima inibitória.

3.2 Metodologia

3.2.1 Revisão Sistemática

Antes da pesquisa de literatura, definiram-se as duas facetas do problema de meta-análise: população e resultado. A “população” foi definida como os extratos de sementes ou folhas de *Bixa orellana*; e o “resultado” como a capacidade antimicrobiana contra *S. aureus*, mensurada como diâmetros de inibição em ágar ou como concentração mínima inibitória (MIC).

O próximo passo de identificação de literatura foi levado a cabo por meio de pesquisas eletrônicas usando os motores bibliográficos Scopus, Scielo e PubMed com termos em inglês, espanhol e português. A seguinte fórmula (Title/Keywords/Abstract), que consistiu de combinações de palavras-chave provenientes da população e do resultado, foi utilizada: (“*Bixa orellana*” OR achiote OR urucum OR urucu) AND (antimicrobial OR susceptibility OR antibacterial) AND (extract) AND (“minimum inhibitory concentration” OR MIC OR “inhibition zone” OR “inhibition diameter”)

Após a pesquisa, recuperaram-se 44 artigos científicos sem duplicados. Depois de avaliar toda a informação apresentada em cada estudo, um total de 17 artigos passaram nos dois critérios de qualidade, os quais foram: (1) ter usado um método aprovado para a determinação da capacidade antimicrobiana de extratos, e (2) apresentar a informação completa para a meta-análise. Os artigos que reuniram os requisitos para meta-análise foram: Abayomi et al. (2014); Bais (2014); Banadkoki et al. (2018); Ciro Gómez et al. (2012); Duran et al. (2017); Fleischer et al. (2003); Galindo-Cuspinera et al. (2003); Irobi et al. (1996); Muthukumar et al. (2014); Ongsakul et al. (2009); Lourido Pérez & Sánchez (2010); Prathima et al. (2016); Quintero-Quiroz et al. (2019); Rojas et al. (2006); Selvi et al. (2011); Silva et al. (2010) e Yolmeh et al. (2015).

3.2.2 Extração de dados

De cada um dos estudos primários, as seguintes características de estudo e variáveis foram extraídas numa folha de cálculo:

EstudoID: o identificador do estudo primário;

País: O país de origem das amostras de urucum;

Parte da planta: uma variável categórica que consiste em duas classes: sementes e folhas;

Solvente: uma variável categórica que indica o solvente usado na extração;

Concentração de extrato: em mg/ml, é uma variável numérica que se refere à concentração de extrato depositada na placa de ágar para a medição do diâmetro de inibição;

Diâmetro de inibição: em mm, é uma variável numérica e é a média do diâmetro de inibição medido do extrato contra *S. aureus*.

n(Diâmetro): é o número de repetições utilizado para calcular a média do diâmetro;

MIC: em mg/ml, é a média da concentração mínima inibitória do extrato contra *S. aureus*;

n(MIC): é o número de repetições utilizado para calcular a média do diâmetro.

Foram extraídos um total de 59 dados para diâmetro de inibição e 22 dados para MIC dos extratos. A Tabela 3.1 compila a distribuição dos dados para diâmetro de inibição e MIC por país de procedência do urucum, parte da planta utilizada e o solvente da extração.

3.2.3 Modelação meta-analítica

3.2.3.1 Meta-análise do diâmetro de inibição

Três modelos meta-analíticos foram ajustados aos dados de diâmetro de inibição. Estes foram modelos lineares mistos que procuraram atingir três objetivos diferentes. O primeiro modelo (Equação 1) teve por objetivo principal avaliar os efeitos dos solventes na susceptibilidade do *S. aureus* ao extrato de urucum, e foi definido como:

$$Diam_{isp} = (\beta_0 + u_i) + \beta_{1s}Solvente_s + \beta_{2p}Parte_p + (\beta_3 + v_i) \times \ln C + \varepsilon_{isp} \quad (\text{Eq 1})$$

onde $Diam_{isp}$ é o diâmetro de inibição produzido pelo extrato da parte da planta p , extraído com o solvente s e reportado no estudo primário i . O coeficiente β_0 é o intercepto da regressão; β_{1s} um vetor de efeitos fixos dos solventes; β_{2p} o efeito da parte da planta (sementes ou folhas) e β_3 é o efeito da concentração C do extrato no diâmetro de inibição. O amplo intervalo da concentração do extrato C (0,05 – 40 mg/ml) foi reduzido mediante transformação logarítmica para estabilizar a estimação dos parâmetros da regressão. Efeitos aleatórios u_i e v_i foram colocados no intercepto β_0 e no efeito da concentração do extrato β_3 , respectivamente, com a finalidade de extrair a variabilidade entre estudos i . Assumiu-se que estes efeitos aleatórios se distribuem normalmente com média zero e matriz de variância-covariância $[s_u^2, s_{uv}, s_v^2]$. Assim, a variabilidade entre estudos (τ^2) foi calculada como $s_u^2 + s_{uv} + s_v^2$. Similarmente, os residuais ε_{isp} distribuem-se como uma normal com média zero e variância s^2 . A Equação (1) foi ajustada aos dados meta-analíticos completos de diâmetro de inibição (n=59).

O segundo modelo (Equação 2) teve por objetivo comparar a capacidade antimicrobiana (diâmetro de inibição) dos extratos de semente versus a dos extratos de folhas.

$$Diam_{isp} = (\beta_0 + u_i) + (\beta_{2p} + v_s) \times Parte_p + \beta_3 \ln C + \varepsilon_{isp} \quad (\text{Eq 2})$$

Neste modelo, a estrutura dos efeitos aleatórios foi diferente daquela do Modelo 1. Assumiu-se que os efeitos da parte da planta (β_{2p}), donde o extrato foi preparado, variaram de acordo com o solvente de extração s . Assim, v_s representa os efeitos aleatórios devido ao solvente que causam variações no efeito da parte da planta (β_{2p}); estes efeitos aleatórios seguem uma distribuição normal com média zero e variância s_v^2 . Como no Modelo 1, os efeitos aleatórios u_i foram colocados no intercepto β_0 com a finalidade de extrair a variabilidade entre estudos i . Assume-se que os efeitos aleatórios u_i se distribuem normalmente com média zero e variância s_u^2 . A variabilidade entre estudos (τ^2) é então equivalente a s_u^2 . A Equação (2) foi ajustada aos dados meta-analíticos completos de diâmetro de inibição (n=59).

Tabela 3.1. Distribuição dos dados para as medições de capacidade antimicrobiana – diâmetro de inibição e concentração mínima inibitória – por país de procedência, parte da planta e solvente de extração

Medição da capacidade antimicrobiana	Variável moderadora	Categorias	Incidências
Diâmetro de inibição (n=59)	País de procedência	Gana	2
		Índia	30
		Irã	10
		Jamaica	16
		Nigéria	1
	Solvente	Ácido acético	4
		Álcali	4
		Clorofórmio	10
		Dimetilsulfóxido	6
		Etanol	17
		Metanol	16
		Éter de petróleo	2
	Parte da planta	Folhas	22
		Sementes	37
MIC (n=22)	País de procedência	Brasil	1
		Colômbia	5
		Cuba	1
		Índia	3
		Irã	5
		Jamaica	3
		Nigéria	1
		Tailândia	2
		EUA	1
	Solvente	Álcali	1
		Clorofórmio	3
		Dimetilsulfóxido	1
		Etanol	11
		Hexano	1
Metanol		3	
Parte de planta	Água	2	
	Folhas	11	
	Sementes	11	

O objetivo do Modelo 3 foi comparar a eficiência dos solventes etanol e metanol na extração de componentes antimicrobianos do urucum. Para tal finalidade, utilizaram-se somente os dados pertinentes a etanol (n=17) e a metanol (n=16), o que totalizou 33 dados para diâmetro de inibição (Tabela 3.1). Definiu-se o Modelo 3 como:

$$Diam_{isp} = \beta_0 + \beta_{1s}Solvente_s + (\beta_{2p} + u_i) \times Parte_p + \beta_3 \ln C + \beta_4 Solvente \times \ln C + \varepsilon_{isp} \quad (\text{Eq 3})$$

onde os efeitos aleatórios u_i devido aos estudos foram colocados no efeito fixo β_{2p} , o qual assume que os efeitos da parte da planta, para sementes e folhas, variaram conforme os estudos i . Assumiu-se que os efeitos aleatórios u_i se distribuem normalmente com média zero e variâncias independentes s_s^2 para as sementes e s_f^2 para as folhas. Este modelo também admitiu a interação entre solvente e concentração do extrato, e β_4 é o efeito dessa interação na capacidade antimicrobiana do extrato – quantificada como diâmetro de inibição.

3.2.3.2 Meta-análise do MIC

Devido à dispersão dos dados recolhidos para o MIC, estes não puderam ser analisados da mesma forma que os dados do diâmetro de inibição. O MIC global dos extratos provenientes de sementes (MIC_s) e de folhas (MIC_f) foram determinados mediante uma meta-análise de efeitos aleatórios, sem qualquer moderador, de forma:

$$\ln MIC_{si} = (\ln MIC_s + u_i) + \varepsilon_i \quad (\text{Eq 4})$$

$$\ln MIC_{fi} = (\ln MIC_f + u_i) + \varepsilon_i \quad (\text{Eq 5})$$

onde $\ln MIC_{si}$ e $\ln MIC_{fi}$ representam o logaritmo natural das observações recolhidas de MIC de extratos de sementes (n=11) e folhas (n=11), respectivamente; u_i representam os efeitos aleatórios devido aos estudos i ; e ε_i os residuais. Os parâmetros $\ln MIC_s$ e $\ln MIC_f$ representam os valores meta-analisados de MIC para extratos de folhas e sementes, respectivamente. Para o ajuste destes modelos, os MIC foram transformados logaritmicamente para lograr uma normalização dos dados; no entanto os parâmetros ajustados (i.e., MIC globais) foram depois transformados à escala original. Os resultados destes dois modelos são apresentados na modalidade de forest plots.

Finalmente, ajustou-se um modelo linear de efeitos mistos a um subconjunto dos dados mantendo só aqueles solventes cujas incidências eram maiores a 2. Assim, o seguinte modelo (Equação 6) foi ajustado a um subconjunto de dados que contém os MIC de clorofórmio (3), etanol (11) e metanol (3) (Tabela 3.1).

$$MIC_{isp} = (\beta_0 + u_i) + \beta_{1s}Solvente_s + \beta_{2p}Parte_p + \varepsilon_{isp} \quad (\text{Eq 6})$$

Neste modelo, u_i denota os efeitos aleatórios ou desvios do intercepto β_0 causados pelos diferentes estudos, e segue uma distribuição normal com média zero e variância s_u^2 , a qual é equivalente à variabilidade entre estudos τ^2 .

Todos os modelos meta-analíticos (Eq. 1 a 6) foram ajustados como uma regressão linear de efeitos mistos com pesos dados às observações conforme o número de repetições n . Para cada modelo meta-analítico realizou-se um análise de heterogeneidade com a finalidade de determinar a variabilidade entre estudos (τ^2), e a partir desta, calcular a proporção da variância entre estudos explicada pelas características de estudo (R^2). O R^2 foi calculado como $[(\tau^2 - \tau_{\text{null}}^2) / \tau_{\text{null}}^2]$, onde τ_{null}^2 é a variância entre estudos correspondente ao modelo nulo (i.e., cada um dos modelos ajustados sem os efeitos fixos, mantendo só interceptos e efeitos aleatórios no intercepto). Toda a análise, incluindo ajuste de modelos, previsões e análise de heterogeneidade, foi levada a cabo no software R versão 2.14.2 (R Development Core Team), usando a função *lme()* do pacote *nlme*, por ser mais flexível e pela possibilidade de fazer estrutura de erros. Construíram-se também forest-plots utilizando o pacote *metafor*.

3.3 Resultados

3.3.1 Meta-análise do diâmetro de inibição produzido pelo extrato de urucum contra *S. aureus*

Os diâmetros de inibição obtidos dos estudos primários foram medidos por meio das técnicas de difusão em poço ou difusão em disco, onde o extrato é depositado nos poços ou impregnado nos discos, respectivamente. Os poços são perfurados em ágar com um furador, quando se trata da técnica de difusão em poço; e os discos impregnados de extrato são sobrepostos no ágar, quando se usa a técnica de difusão em disco. Em ambos casos, utiliza-se uma concentração conhecida do extrato. Nos estudos primários, estas experiências foram realizadas com concentrações de extrato variáveis, desde 0,05 até 40,0 mg/ml. Foi, assim, esperado que o halo ou zona de inibição produzidos no ágar fosse proporcional à concentração de extrato aplicado. O gráfico de bolhas da Figura 3.1 apresenta a relação direta entre estas duas variáveis: a maior

concentração do extrato, maior será o diâmetro de inibição de *S. aureus* produzido pelo extrato. Embora a tendência linear do gráfico de bolhas é notória, também se pode apreciar a grande variabilidade em torno a esta relação, representada pela quantidade de bolhas (observações) que ficam fora do intervalo de previsão ao 95%. O coeficiente de determinação (R^2) desta relação é de 0,602, o qual estabelece que a concentração do extrato pôde explicar 60,2% da variação nas médias dos diâmetros de inibição extraídos da literatura. Este nível de determinação é bastante alto considerando que existem outras características de estudo que aportam variabilidade ao valor do diâmetro de inibição – tais como origem da planta, parte da planta, método de extração, solvente, entre outros – que não têm sido incluídas no modelo do gráfico de bolhas.

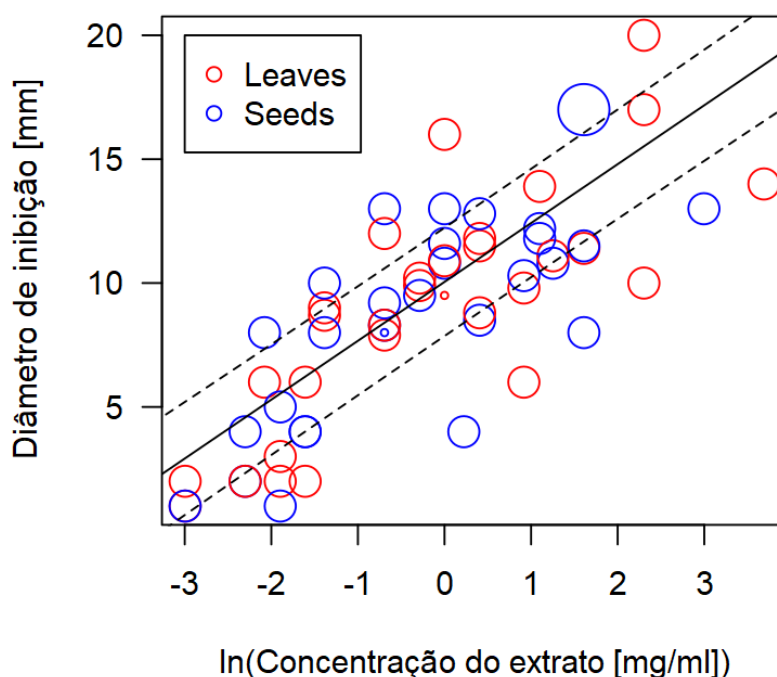


Figura 3.1. Variabilidade dos diâmetros de inibição para *S. aureus* coletados da literatura, representados em função à concentração do extrato de urucum utilizado. O tamanho do marcador é proporcional ao número de replicados utilizados em cada teste

A Tabela 3.2 apresenta os resultados do Modelo 1, isto é, o modelo que contém os efeitos fixos de todas as características de estudo: solvente, concentração do extrato e parte da planta. O modelo completo corroborou o efeito significativo da concentração do extrato ($p < 0,001$) no diâmetro de inibição, e mais ainda removendo este efeito, o Modelo 1 permitiu encontrar

diferenças significativas entre os solventes. Para uma concentração fixa de extrato de folhas de 1,0 mg/ml, a extração em éter de petróleo (12,71 mm), metanol (11,77 mm) e ácido acético (11,03 mm) produziram maiores diâmetros de inibição para *S. aureus* do que a extração em etanol (9,343 mm), dimetilsulfóxido (9,343 mm), clorofórmio (8,910 mm) e álcali (8,954 mm).

Tabela 3.2. Modelo 1: Parâmetros do modelo linear misto que descreve o diâmetro de inibição (mm) produzido pelo extrato de urucum contra *S. aureus*. Os dados extraídos da literatura foram utilizados na sua totalidade (n=59)

Parâmetros	Média	E.E	P > t	Heterogeneidade
Preditores do Diâmetro [mm]				
Solvente				
Ácido acético	11,03 ^b	1,572	<0,001	$\tau^2=13,90$ $R^2 = 87,2\%$
Álcali	8,954 ^a	1,576	<0,001	
Clorofórmio	8,910 ^a	3,703	0,047	
Dimetilsulfóxido	9,343 ^a	1,550	<0,001	
Ethanol	9,343 ^a	1,481	<0,001	
Metanol	11,77 ^b	1,501	<0,001	
Éter do petróleo	12,71 ^b	1,673	<0,001	
Ln (Concentração do extrato)	2,614	0,342	<0,001	
Parte da planta - Sementes	-0,429	0,442	0,337	
Efeitos aleatórios				
s_u (intercepto)	3,663			
s_v (dose)	0,713			
ρ ($s_u s_v$)	-0,033			
s (residual)	0,497			

A bixina – carotenoide que possui uma estrutura conjugada e apresenta grupos carboxilo – é altamente solúvel a pH básico (Quintero-Quiroz et al., 2019), pelo que este fato favorece a sua extração em álcali, sobre tudo das sementes, que são as que contêm a maior proporção de bixina. No entanto, outros compostos antimicrobianos como os polifenóis são moléculas ligeiramente acídicas cuja solubilidade não está significativamente influenciada pelo pH do meio. Os solventes orgânicos como o etanol, o metanol ou o éter de petróleo, podem reter não só a bixina se não também maiores quantidades de polifenóis, embora de maneira variável. Uma análise fitoquímica realizada por Selvi et al. (2011) revelou que os extratos crus de metanol tanto de folhas como de sementes de urucum contêm esteroides, flavonoides, taninos, saponinas e proteínas. Poderá ser esta a razão pela qual os extratos metanólicos têm maior capacidade antimicrobiana (Tabela 3.2). O modo de ação das saponinas contra as bactérias baseia-se na sua

habilidade de causar ruptura de proteínas e certas enzimas da célula; enquanto os esteroides associam-se aos lipídeos da membrana causando a ruptura dos lipossomas.

Embora no modelo completo (Modelo 1), o efeito da parte da planta a ser extraída não atingiu significância estatística ($p=0,337$), o valor negativo da estimativa (-0,497 na Tabela 3.2) revela uma tendência dos extratos de sementes a terem uma menor capacidade para inibir *S. aureus* do que os extratos de folhas. No Modelo 1 é claro que o efeito da parte da planta foi mascarado pelos muitos efeitos fixos de cada solvente. Por isso, para esclarecer se a parte da planta teve algum efeito na capacidade antimicrobiana do extrato é que se ajustou o Modelo 2. De qualquer forma, o alto R^2 logrado no Modelo 1 estabelece que 87,2% da variabilidade no diâmetro de inibição entre estudos pôde ser explicada pelas três variáveis, solvente, concentração do extrato e parte da planta (Tabela 3.2). A bondade de ajuste do Modelo 1 apresenta-se na Figura 3.2, na qual se aprecia o alto grau de coincidência ($R=0,986$) entre os valores da literatura do diâmetro de inibição e os previstos pelo modelo meta-analítico.

Além de confirmar mais uma vez o efeito da concentração do extrato no diâmetro do inibição ($p<0,001$), o Modelo 2 (Tabela 3.3) evidenciou a diferença na capacidade antimicrobiana entre os extratos de semente e os extratos de folha em relação ao *S. aureus*. De acordo com o Modelo 2, para uma concentração de extrato de 1,0 mg/ml ($\text{Ln}(\text{Concentração de extrato})=0$, portanto, $\text{Concentração de extrato}=1,0$), espera-se que a média do diâmetro de inibição do extrato de folhas seja de 10,97 mm e a média para o extrato de sementes de 8,725 mm. Cabe destacar que estes valores foram estimados usando todos os dados, portanto, representam todos os solventes disponíveis. A diferença significativa na capacidade antimicrobiana entre folhas e sementes deve-se principalmente à sua composição e, por conseguinte, aos dos respectivos extratos.

Sabe-se que os carotenoides bixina e norbixina são os principais constituintes das sementes de urucum, as quais são responsáveis pela cor avermelhada dos extratos, enquanto estes carotenoides são somente componentes minoritários nas folhas de urucum (Viuda-Martos et al., 2008). Rojas et al. (2006) indicam que também os esteroides e antocianinas presentes nas sementes de urucum podem ser responsáveis pela sua atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. Por outro lado, Selvi et al. (2011) atribuíram a atividade inibitória do extrato de sementes de urucum à presença de flavonoides. Os flavonoides têm a habilidade de formar complexos com proteínas solúveis extra-celulares, e com a parede celular bacteriana. Os flavonoides lipofílicos também podem destruir a membrana bacteriana.

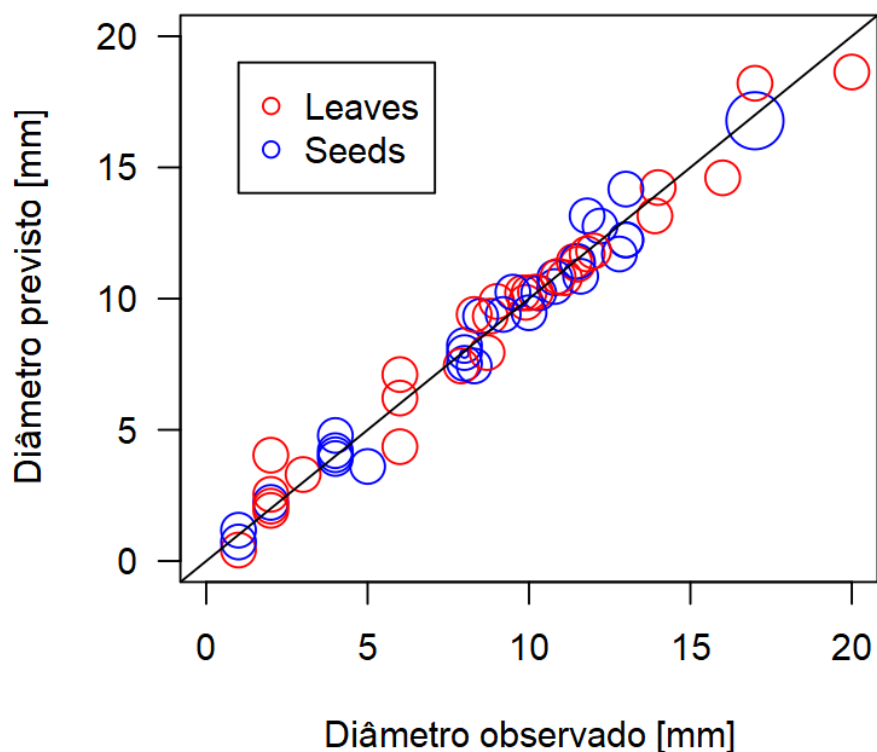


Figura 3.2. Gráfico de dispersão dos diâmetros de inibição observados versus os previstos pelo Modelo 1 com linha de igualdade de 45°. O coeficiente de correlação R é 0,986. O tamanho do marcador é proporcional ao número de replicados utilizados em cada estudo

Tabela 3.3. Modelo 2: Parâmetros do modelo meta-analítico que descreve o diâmetro de inibição (mm) produzido pelo extrato de urucum contra *S. aureus*. Os dados extraídos da literatura foram utilizados na sua totalidade (n=59)

Parâmetros	Média	E.E	P > t	Heterogeneidade
Preditores do Diâmetro [mm]				
Parte da planta - Folhas	10,97	1,282	<0,001	$\tau^2=11,78$
Parte da planta - Sementes	8,725	1,358	<0,001	$R^2 = 47,9\%$
Ln (Concentração do extrato)	2,475	0,103	<0,001	
Efeitos aleatórios				
s_u (estudo)	3,432			
s_{v1} (folhas)	0,618			
s_{v2} (sementes)	1,266			
s (residual)	3,182			

Stohs (2014) reporta que, de acordo com análises fitoquímicas, as folhas de urucum possuem terpenos, triterpenos, esteroides, saponinas, glicósidos, açúcares, taninos, alcaloides, flavonoides e outros compostos fenólicos. Selvi et al. (2011), ao compararem as análises fitoquímicas das folhas e das sementes de urucum, encontraram que as folhas possuíam alcaloides mas não as sementes, e que as sementes possuíam antraquinonas mas não as folhas. Silva et al. (2008) explicam que os alcaloides são capazes de atuar nas proteínas extracelulares. Selvi et al. (2011) estimaram também que os extratos metanólicos de folhas eram 50% mais eficazes que os extratos de sementes.

Yong et al. (2013) avaliaram a composição química de um extrato aquoso de folhas de urucum por GC-MC e reportaram que o ácido acético era o maior constituinte com menores quantidades de 2-butanamina, ácido pentanoico, fenol, pantolactona e ácido benzoico. Raga et al. (2011) prepararam extratos de folhas de urucum em diclorometano e isolaram o triterpeno ishwarane, assim como fitol, polipreno, estigmasterol e sitosterol. Os componentes voláteis das folhas também foram analisados por Giorgi et al. (2013), cujo trabalho demonstrou que os principais constituintes eram sesquiterpenos e monoterpenos. Os sesquiterpenos constituíram mais do 95% do total dos compostos voláteis; α -carpophyllene, α -copaene e α -elemene constituíram mais do 50% do total de sesquiterpenos; e cis-ocimeno foi o monoterpeno principal.

O Modelo 2 também evidenciou que os diâmetros de inibição dos extratos de sementes apresentaram maior variabilidade ($\sigma=1,266$ mm) do que os diâmetros de inibição das folhas ($\sigma=0,618$ mm; Tabela 3.3), o qual pode-se dever ao conteúdo variável de bixina e norbixina das sementes conforme o país de origem ou pode ser somente um artefato do maior número de observações disponíveis para sementes ($n=37$) do que para folhas ($n=22$) (Tabela 3.1).

Dada a diferença significativa na capacidade antimicrobiana dos extratos de acordo com a parte da planta, os dados foram particionados em “sementes” e “folhas”. Com cada subconjunto de dados se realizou uma meta-análise para determinar o diâmetro de inibição global a uma concentração fixa de extrato (1,0 mg/ml). Estas análises são apresentadas como forest plots nas Figuras 3.3 e 3.4 para extrato de folhas ($n=33$) e sementes ($n=37$), respectivamente. Nestes forest plots pode-se apreciar a variabilidade dos diâmetros de inibição dentro de cada combinação solvente-país de origem; esta variabilidade é devida principalmente às diferentes concentrações dos extratos utilizados. No caso dos extratos de folhas de urucum (Figura 3.3), os diâmetros de inibição previstos para *S. aureus*, à concentração fixa de 1 mg/ml de extrato, foram de 9,22 mm

para o extrato etanólico, 11,02 mm para o extrato metanólico, 11,87 mm para o extrato em ácido acético e 13,77 mm para o extrato em éter de petróleo. Assim, dentre os solventes analisados, os preparados de folhas extraídos em etanol apresentaram a menor capacidade antimicrobiana contra *S. aureus*.

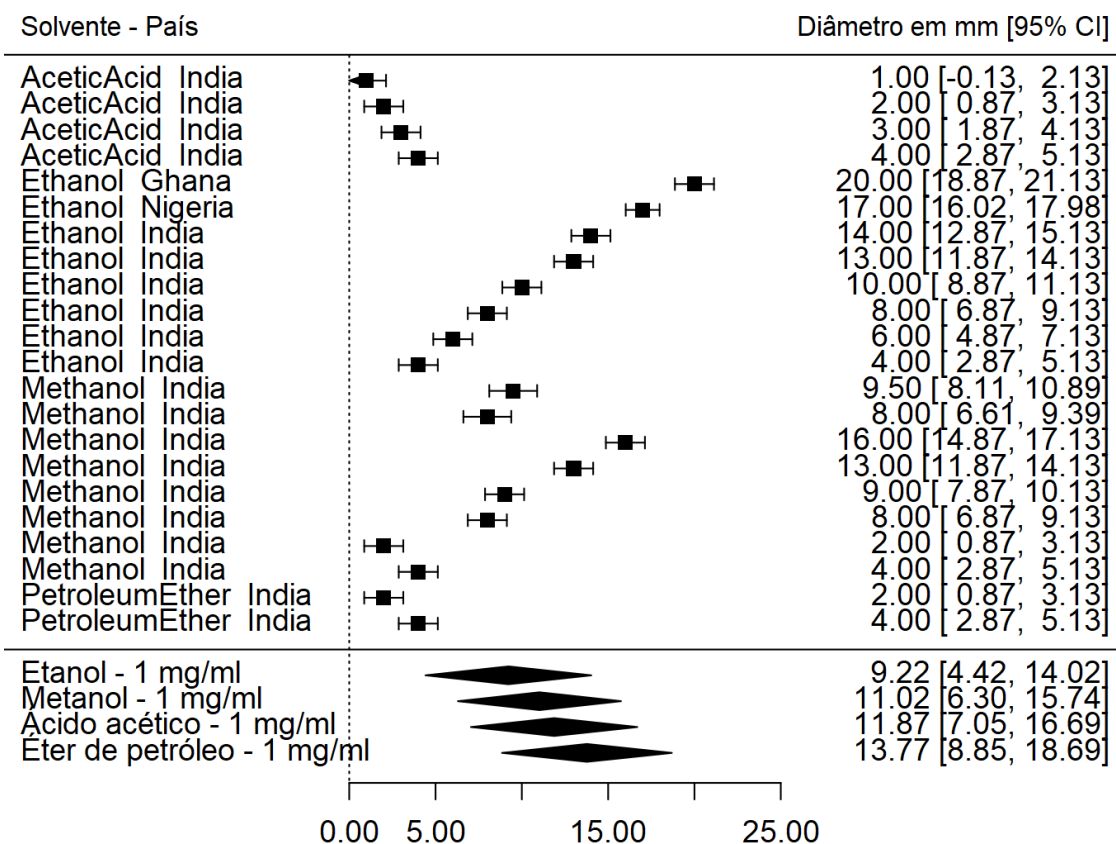


Figura 3.3. Forest plot do diâmetro de inibição produzido pelo extrato de folhas de urucum no *S. aureus*. Na parte inferior do gráfico apresentam-se os valores de diâmetro de inibição preditos para uma dose de 1 mg/ml de extrato aplicada em ágar

No caso dos extratos de sementes de urucum (Figura 3.4), os diâmetros de inibição do *S. aureus*, à concentração fixa de 1 mg/ml de extrato, resultaram em 8,29 mm para clorofórmio, 9,05 mm para álcali, 9,47 mm para etanol, 9,49 mm para dimetilsulfóxido e 12,20 mm para metanol. Mais uma vez, o extrato metanólico teve maior poder bacteriostático que o extrato etanólico.

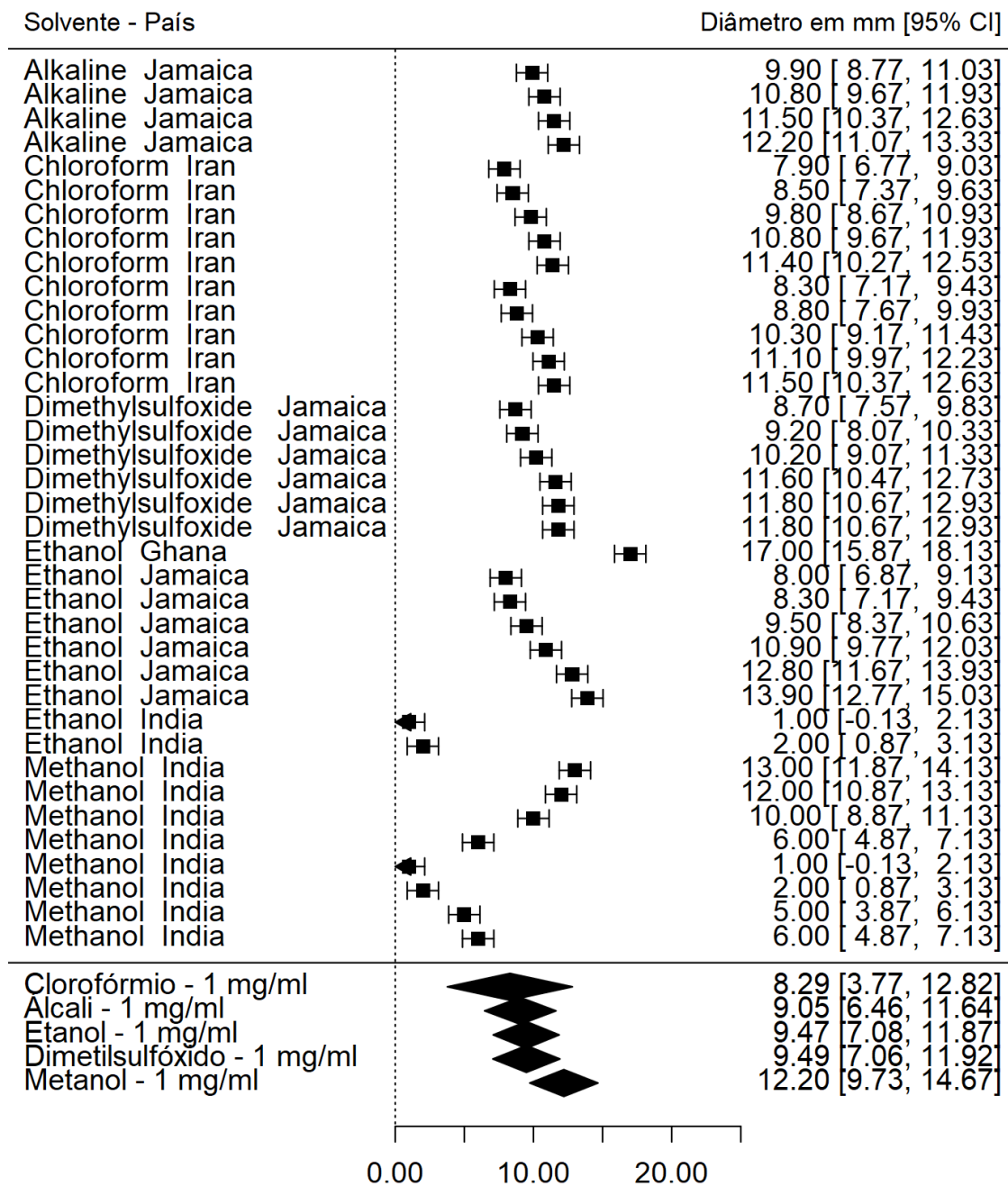


Figura 3.4. Forest plot do diâmetro de inibição produzido pelo extrato de sementes de urucum no *S. aureus*. Na parte inferior do gráfico apresentam-se os valores de diâmetro de inibição preditos para uma dose de 1 mg/ml de extrato aplicada em ágar

Numa última fase, comparou-se mediante um modelo mais apropriado (Modelo 3) a susceptibilidade do *S. aureus* aos extratos etanólicos e metanólicos. Por esta razão, para o Modelo 3 utilizaram-se unicamente os dados de diâmetros de inibição dos dois tipos de extratos. Este modelo (Tabela 3.4), embora tendo uma arquitetura diferente, corroborou mais uma vez que os extratos de folhas de urucum, independentemente do solvente de extração utilizado, têm uma maior ação bacteriostática do que os extratos de sementes (9,093 mm para os extratos etanólicos de folhas versus 8,638 mm para os extratos etanólicos de sementes, a uma concentração de extrato de 1,0 mg/ml).

Tabela 3.4. Modelo 3: Comparação da efetividade dos solventes etanol e metanol na extração de compostos antimicrobianos, avaliados pelo diâmetro de inibição. Somente os dados para estes dois solventes foram usados neste modelo (n=33)

Parâmetros	Média	E.E	P> t	Heterogeneidade
Preditores do Diâmetro [mm]				
Parte da planta - Folhas	9,093	1,752	<0,001	$\tau^2=24,91$ $R^2 = 58,8\%$
Parte da planta - Sementes	8,638	0,800	<0,001	
Ln (Concentração do extrato)	2,921	0,143	<0,001	
Solvente – Metanol	4,823	0,619	<0,001	
Ln (Concentração do extrato)×Metanol	0,734	0,255	0,004	
Efeitos aleatórios				
s _{v1} (folhas)	4,584			
s _{v2} (sementes)	1,983			
s (residual)	3,240			

O modelo meta-analítico também estimou que os extratos metanólicos produziram, na média, halos de inibição 4,823 mm maiores que os extratos etanólicos (p<0,001). Além do mais, a interação Ln(Concentração do extrato)×Metanol foi significativa (p=0,004; Tabela 3.4). Esta interação significa que para um mesmo incremento na concentração do extrato, o metanólico produz um maior incremento no diâmetro de inibição (em 0,734 mm) do que o extrato etanólico. Esta inferência pode ser explicada pelos diferentes compostos e/ou diferentes proporções de compostos com capacidade antimicrobiana que o metanol como solvente é capaz de extrair.

Efetivamente, de acordo com Prathima et al. (2016), o metanol como solvente foi capaz de extrair flavonoides, saponinas e terpenoides a partir de folhas e sementes de urucum da Índia que o etanol não pôde extrair. Em contrapartida, o metanol como solvente não extraiu esteroides, enquanto estes compostos estiveram presentes nos extratos etanólicos de folhas e sementes. Nas amostras processadas por Ponnusamy et al. (2011), os principais constituintes do extrato

metanólico de folhas de urucum, determinados por GC-MS, eram tocoferóis, incluindo a vitamina E.

3.3.2 Meta-análise da concentração mínima inibitória (MIC) do extrato de urucum contra *S. aureus*

Em comparação aos dados de diâmetro de inibição, os dados de MIC recolhidos da literatura tiveram uma maior variabilidade, a qual pode ser apreciada no forest plot da Figura 3.5, onde se apresentam os dados na sua totalidade. O MIC global ou meta-analítico para folhas e sementes, extraídos usando os diferentes solventes, foi de 0,770 mg/ml com um IC 95% amplo de 0,245 a 2,420 mg/ml (Figura 3.5).

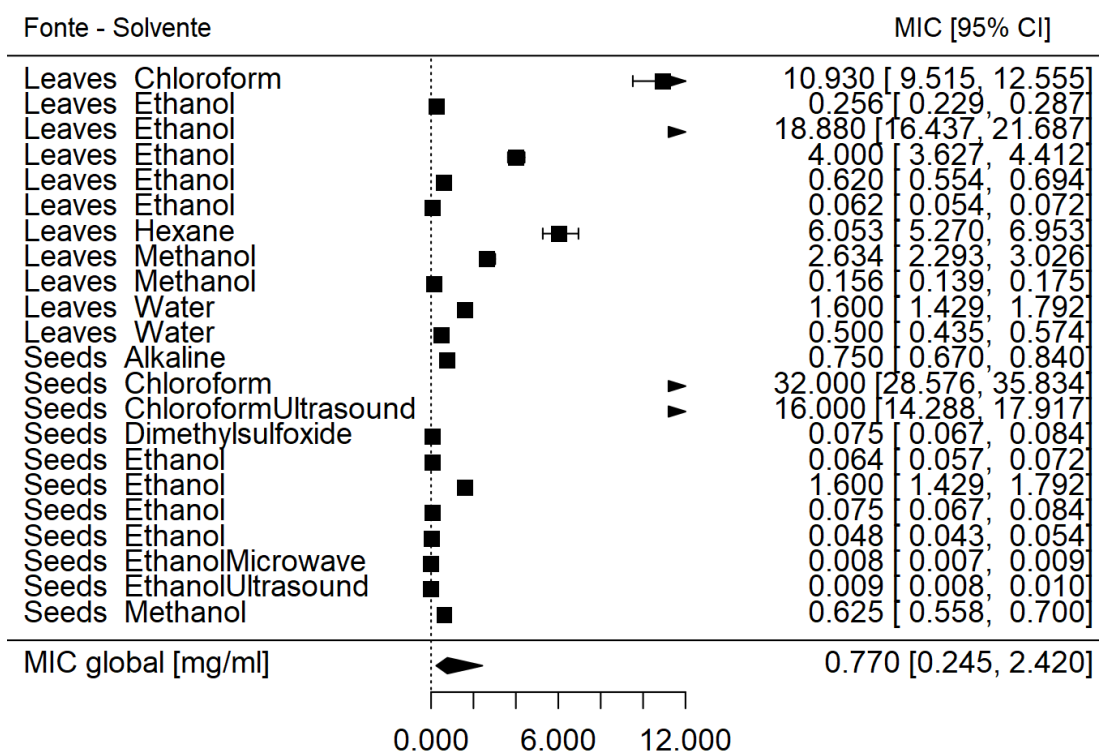


Figura 3.5. Forest plot da concentração mínima inibitória (MIC) do extrato de urucum contra *S. aureus*, mostrando o valor meta-analisado de MIC. Os dados foram utilizados na sua totalidade (n=22) para esta meta-análise

Em contradição com a meta-análise efetuada para os diâmetros de inibição – onde se encontrou que os extratos das folhas apresentam maior efeito antimicrobiano contra *S. aureus* do que os extratos das sementes – na meta-análise dos MIC, o MIC global para os extratos de folhas (1,145 mg/ml; IC 95% 0,334 – 3,921 mg/ml; Figura 3.6) foi maior que o MIC global para os extratos de sementes (0,390 mg/ml; IC 95% 0,049 – 3,079 mg/ml; Figura 3.7). De acordo com estes resultados, os extratos de sementes seriam mais efetivos contra *S. aureus* que os extratos de folhas; no entanto, este resultado é aparente pois os solventes e países de cada meta-análise são diferentes. Cabe ressaltar também que os MICs medidos nos extratos das sementes de urucum procedentes de Colômbia puderam ter enviesado esta meta-análise por possuírem os valores de MIC mais baixos (0,008 a 0,064 mg/ml na Figura 3.7), causando que o MIC global para extratos de sementes seja menor ao MIC global para extratos de folhas.

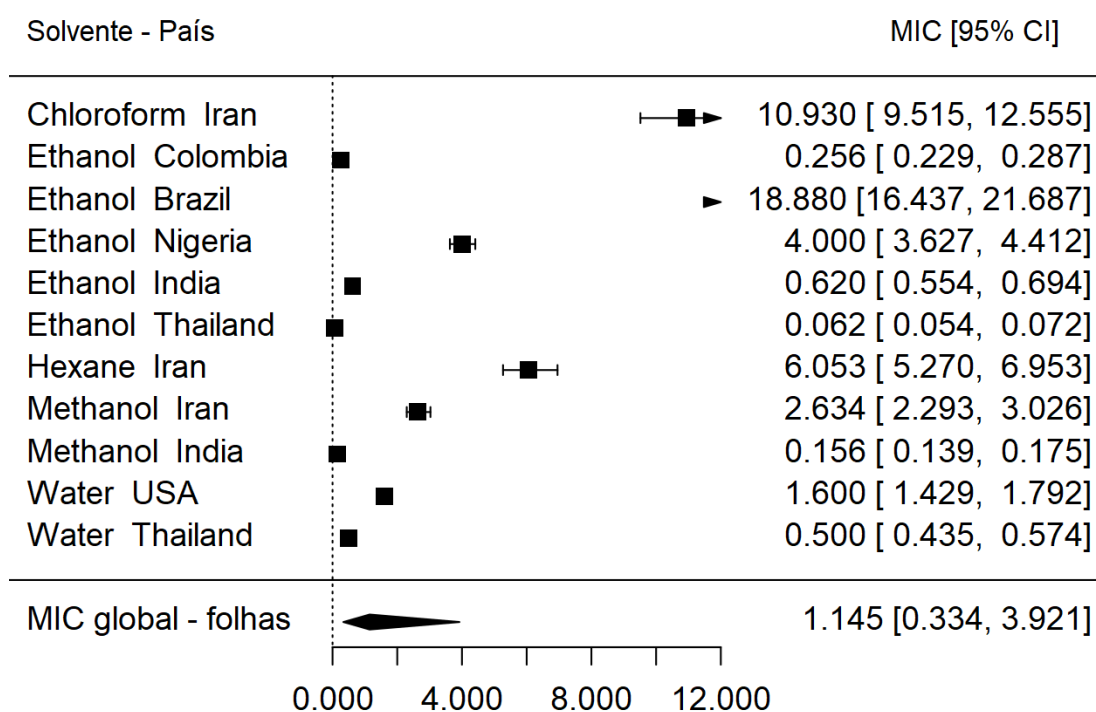


Figura 3.6. Forest plot da concentração mínima inibitória (MIC) do extrato de folhas de urucum contra *S. aureus*, mostrando o valor meta-analisado de MIC. Nesta meta-análise n=11

Se os dados de Colômbia fossem removidos do forest plot da Figura 3.7, o MIC global para extratos de sementes de urucum seria de 1,383 g/ml (IC 95% 0,179 – 10,70 g/ml), valor que é maior que o MIC global dos extrato de folhas, e assim reforçaria o que foi previamente

encontrado com os diâmetros de inibição, que *S. aureus* é mais susceptível aos extratos das folhas de urucum do que aos extratos das sementes. Desta forma, os MIC globais apresentados nas Figuras 3.6 e 3.7 devem ser apenas entendidos como simples médias dos valores recolhidos da literatura.

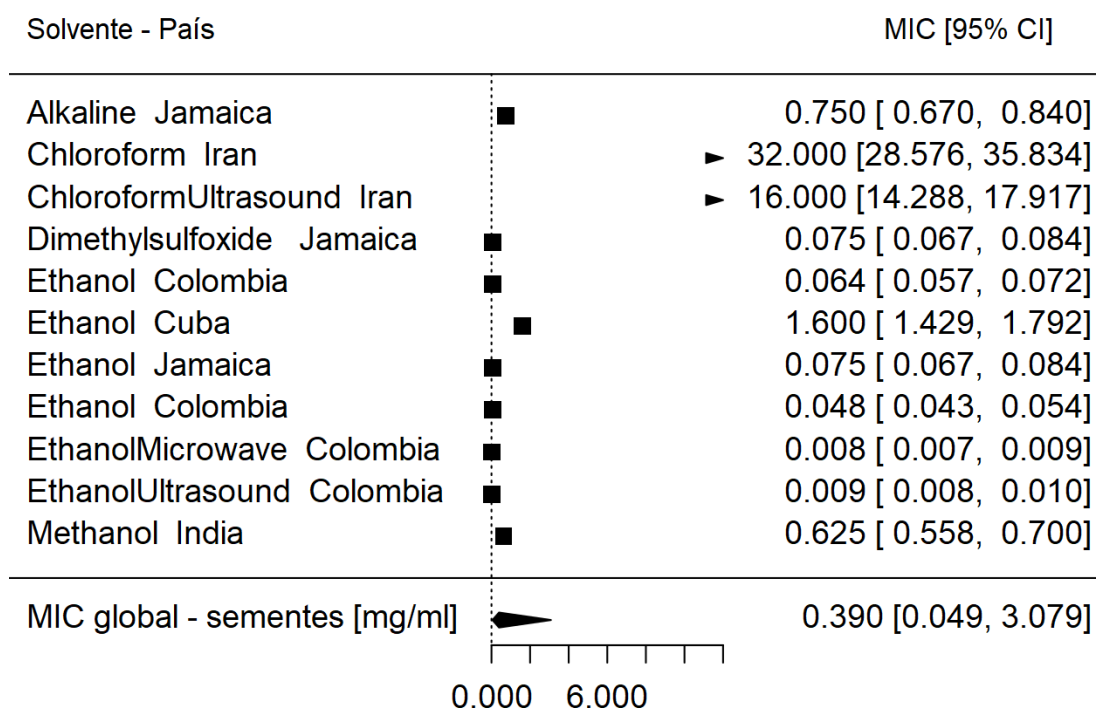


Figura 3.7. Forest plot da concentração mínima inibitória (MIC) do extrato de sementes de urucum contra *S. aureus*, mostrando o valor meta-analisado de MIC. Nesta meta-análise n=11

O último modelo (Tabela 3.5), que visou encontrar diferenças na eficácia dos solventes etanol, metanol e clorofórmio, evidenciou que tanto os extratos metanólicos como os etanólicos tiveram menores MIC ($p < 0,05$) – e por conseguinte maior efeito bacteriostático – que os extratos em clorofórmio. Segundo Rojas et al. (2006), os extratos etanólicos exibem um maior grau de atividade antimicrobiana que os extratos aquosos e em hexano. A variabilidade dos dados para MIC não permitiu encontrar diferenças entre o metanol e o etanol como solventes de extração, como foi possível encontrar na análise dos diâmetros de inibição. Isto explicaria porquê o valor da proporção de variabilidade entre estudos explicada pelos moderadores foi tão baixo ($R^2 = 4,0\%$; Tabela 3.5). Desprende-se desta análise a possibilidade que a técnica de microdiluição

para a determinação de MIC seja mais variável ou sujeita a maior erro de execução que as técnicas de difusão em poço ou em disco utilizadas para estimar o diâmetro de inibição.

Embora o diâmetro de inibição, como medida de atividade antimicrobiana *in vitro*, esteve sujeita a uma menor variabilidade não explicada que o MIC; a partir dos três moderadores estudados (parte da planta, solvente e concentração do extrato), a variabilidade entre estudos pode ser também uma consequência das diferenças nas concentrações das substâncias antimicrobianas tanto no material botânico como nos seus respectivos extratos; dos fatores ambientais onde o urucum é cultivado; do período quando o material foi coletado ou devido às diferenças genéticas das plantas. Adicionalmente, a variabilidade na capacidade antimicrobiana *in vitro* reportada pode ocorrer devido ao uso de diferentes cepas de *S. aureus* e às variações nas metodologias de análise laboratorial.

Tabela 3.5. Parâmetros do modelo meta-analítico que descreve o logaritmo da concentração mínima inibitória (MIC em mg/ml) do extrato de urucum contra *S. aureus*. Somente os dados de MIC dos solventes clorofórmio, etanol e metanol foram utilizadas nesta meta-análise (n=17)

Parâmetros	Média	E.E	P > t	Heterogeneidade
Preditores do ln MIC [mg/ml]				
Origem – Folhas	1,236	1,342	0,357	
Origem – Sementes	2,613	1,342	0,052	$\tau^2=4,242$
Solvente – Etanol	-2,887 ^a	1,549	0,062	$R^2 = 4,0\%$
Solvente – Metanol	-1,425 ^a	0,100	<0,001	
Solvente – Clorofórmio	0	-	-	
Efeitos aleatórios				
s _u (estudos)	2,098			
s (residual)	2,046			

3.4 Conclusão

Os resultados desta meta-análise reafirmaram a capacidade antimicrobiana dos extratos de *Bixa orellana*, seja das folhas ou das sementes, contra *S. aureus*. Na técnica dos diâmetros de inibição em ágar, a meta-análise estimou que 60% da variabilidade nos diâmetros de inibição reportados na literatura é explicada só pela concentração do extrato (no intervalo 0,05 – 40 mg/ml). Junto à concentração do extrato, a parte da planta (semente versus folhas), e o tipo de solvente utilizado na extração, explicam em conjunto 87,2% da variabilidade entre estudos no diâmetro de inibição. Independentemente do solvente utilizado para a extração, os extratos das

folhas de urucum apresentam maior capacidade antimicrobiana contra *S. aureus* do que os extratos das sementes (diâmetros meta-analisados de 10,97 mm e 8,725 mm, respectivamente). A meta-análise demonstrou também que *S. aureus* tem maior susceptibilidade aos extratos metanólicos do que aos extratos etanólicos, produzindo os extratos metanólicos na média halos 4,82 mm superiores que os produzidos com os extratos etanólicos ($p < 0,001$). Mais ainda, para um mesmo incremento na concentração do extrato, os diâmetros de inibição produzidos pelos extratos metanólicos se incrementam em maior medida do que os diâmetros produzidos pelos extratos etanólicos ($p = 0,004$). Por outro lado, a meta-análise da concentração mínima inibitória (MIC) revelou que os extratos metanólicos e etanólicos têm maior efeito bacteriostático que os extratos em clorofórmio. Em termos de variabilidade entre estudos, os dados de MIC apresentaram uma maior variabilidade do que os dados de diâmetros de inibição, que não pôde ser moderadamente explicada nem modelada. É provável que a técnica de microdiluição para a determinação dos MIC seja mais variável ou sujeita a maior erro de execução que as técnicas de difusão em poço ou em disco utilizadas para estimar o diâmetro de inibição.

3.5 Referências

- Abayomi, M., Adebayo, A. S., Bennett, D., Porter, R., Campbell, J. S., & Dawkin, G. (2014). Phytochemical testing and in vitro antibacterial activity of *Bixa orellana* (annatto) seed extract. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 1387-1399.
- Bais, R. S. (2014). Antibacterial activity of the ethanolic leaves extract of *Bixa orellana*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(9), 389-394.
- Banadkoki, A. Z., Kouhsari, E., Amirmozafari, N., Roudbary, M., & Nasrabadi, M. R. B. (2018). Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of some medicinal plants against multidrug resistance pathogens. *Reviews in Medical Microbiology*, 29(4), 182-188.
- 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.
- Fleischer, T., Ameade, E., Mensah, M., & Sawyer, I. (2003). Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia*, 74(1-2), 136-138.
- Galindo-Cuspinera, V., Westhoff, D. C., & Rankin, S. A. (2003). Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage microorganisms. *Journal of Food Protection*, 66(6), 1074-1078.
- Giorgi, A., De Marinis, P., Granelli, G., Chiesa, L. M., & Panseri, S. (2013). Secondary metabolite profile, antioxidant capacity, and mosquito repellent activity of *Bixa orellana* from Brazilian Amazon region. *Journal of Chemistry*, 2013.

- Gonzales-Barron, U., Piza, L., Xavier, C., Costa, E., & Cadavez, V. (2016). An exposure assessment model of the prevalence of *Salmonella spp.* along the processing stages of Brazilian beef. *Food Science and Technology International*, 22(1), 10-20.
- Irobi, O., Moo-Young, M., & Anderson, W. (1996). Antimicrobial activity of Annatto (*Bixa orellana*) extract. *International Journal of Pharmacognosy*, 34(2), 87-90.
- Lourido Pérez, H. d. I. C., & Martínez Sánchez, G. (2010). La *Bixa orellana* L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. *Revista Cubana de Farmacia*, 44(2), 231-244.
- Muthukumar, T., Sankari, D., Selvi, A. T., & Sastry, T. (2014). Preparation, characterization, and in vitro bioactivity of *Bixa orellana* extract-impregnated collagen microspheres. *Journal of Materials Science*, 49(16), 5730-5737.
- Naranjo, A. M., Quiroz, J. Q., & Gómez, G. C. (2018). Optimización del proceso de lixiviación de los compuestos bioactivos de las semillas de *Bixa orellana* L.(annato). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(4).
- Ongsakul, M., Jindarat, A., & Rojanaworarit, C. (2009). Antibacterial effect of crude alcoholic and aqueous extracts of six medicinal plants against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Health Research*, 23(3), 153-156.
- Ponnusamy, S., Ravindran, R., Zinjarde, S., Bhargava, S., & Ravi Kumar, A. (2011). Evaluation of traditional Indian antidiabetic medicinal plants for human pancreatic amylase inhibitory effect in vitro. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. DOI: 10.1155/2011/51564.
- Prado-Silva, L., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U., Rezende, A. C. B., & Sant'Ana, A. S. (2015). Meta-analysis of the effects of sanitizing treatments on *Salmonella*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Listeria monocytogenes* inactivation in fresh produce. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(23), 8008-8021.
- 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.
- 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*, 2019.
- Raga, D. D., Espiritu, R. A., Shen, C.-C., & Ragasa, C. Y. (2011). A bioactive sesquiterpene from *Bixa orellana*. *Journal of Natural Medicines*, 65(1), 206-211.
- 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.
- Silva, L. P., Gonzales-Barron, U., Cadavez, V., & Sant'Ana, A. S. (2015). Modeling the effects of temperature and pH on the resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in conventional heat-treated fruit beverages through a meta-analysis approach. *Food Microbiology*, 46, 541-552.
- Silva, R. B., Almeida, C. R., Chavasco, J. M., & Chavasco, J. K. (2010). Avaliação da atividade antimicobacteriana ea determinação da CIM de extratos hidroalcoólicos liofilizados de *Bixa orellana* L., *Bixaceae*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(2), 171-174.

-
- Stohs, S. J. (2014). Safety and efficacy of *Bixa orellana* (achiote, annatto) leaf extracts. *Phytotherapy Research*, 28(7), 956-960.
- Tamil 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.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(3), 526-531.
- 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.
- Zhilyaev, S., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U., Phetxumphou, K., & Gallagher, D. (2017). Meta-analysis on the effect of interventions used in cattle processing plants to reduce *Escherichia coli* contamination. *Food Research International*, 93, 16-25.

4 MODELAÇÃO DA CINÉTICA DO *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM BIFES REVESTIDOS COM EXTRATO DE URUCUM EM ÓLEO DE COCO

4.1 Introdução

S. aureus tem um importante papel entre os microrganismos causadores de intoxicações alimentares. De acordo com o último relatório científico da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA, 2018), no ano 2017, as toxinas bacterianas – sem contar as de *Clostridium botulinum* – foram a primeira causa de surtos alimentares em quatro países da União Europeia (Bulgária, França, Portugal e România), representando 30% do total de surtos. Nesse mesmo ano, aconteceram na União Europeia 809 surtos devido a toxinas bacterianas incluindo as do *S. aureus*, e 16% desses surtos foram veiculados pelo consumo de carne e produtos cárneos (EFSA, 2018).

A contaminação destes produtos por *S. aureus* pode vir diretamente dos animais infectados ou pode ser o resultado de uma higiene deficiente durante o processo de produção ou durante o retalho e o armazenamento dos produtos, desde que o ser humano também pode ser portador deste microrganismo (Ozdemir & Keyvan, 2016). De fato, *S. aureus* enterotoxigênico pode ser encontrado em número e locais diferentes do corpo, como narinas e garganta, tanto do ser humano como dos animais (Borch et al., 1996). Essa bactéria também pode colonizar a pele e membranas mucosas e pode estar transitoriamente no trato intestinal (Hansson, 2001).

Nas plantas de processamento de carne e derivados, *S. aureus* pode ser encontrado nas mãos dos manipuladores, sobre as superfícies de trabalho e equipamentos, demonstrando que a contaminação cruzada entre carcaças e elementos pode ocorrer, revelando a necessidade de limpar e sanitizar o ambiente de abate e processamento (de Lima et al., 2004). Uma investigação recente realizada na Turquia (Ozdemir & Keyvan, 2016) estimou que o 14,6% das carnes frescas de bovino vendidas nos supermercados estão contaminadas com *S. aureus*, e que desta fração um

77% possui *S. aureus* enterotoxigênicos. Estudos microbiológicos similares realizados nos EUA (Hanson et al., 2011), Colômbia (López Gutiérrez et al., 2016) 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, salvia, orégano, tomilho, manjeriço), bulbos (alhos e cebolas), frutas (cardamomo e pimenta), flores (cravinho) e sementes (cominho, erva-doce, noz-moscada) das plantas (Aziz & Karboune, 2016).

Uma planta originária da América do Sul, utilizada pelos nativos pelas múltiplas propriedades benéficas atribuídas, e levada a Europa no século XVII, é a *Bixa orellana* (urucum). O pigmento extraído das sementes de urucum tem importância econômica mundial por se tratar de um dos corantes naturais mais utilizados na indústria 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, fora a sua capacidade corante, vários estudos tem revelado que os extratos de sementes de urucum também possuem atividade antimicrobiana contra uma série de bactérias patogênicas incluindo *S. aureus* (Prathima et al., 2016; Quintero-Quiroz et al., 2019; Raga et al., 2011; Rojas et al., 2006; Selvi et al., 2011). No Capítulo 3 da presente tese, a meta-análise baseou-se em múltiplos estudos *in vitro* publicados, e sumarizou que os extratos etanólicos de sementes de urucum produzem no *S. aureus* um diâmetro médio de inibição de 9,47 mm (IC 95%: 7,08 – 11,87 mm) com uma dose média de extrato de 1,0 mg/ml, e que a concentração mínima para inibir *S. aureus* é 0.390 mg/ml (IC 95%: 0.049 – 3,079 mg/ml). No entanto, até à data, não foi testada a capacidade antimicrobiana dos extratos de sementes de urucum aplicados *in situ*. Considerando que o pó de sementes de urucum tem um uso difundido na culinária de vários países de América, como potenciador de sabor e corante, o presente trabalho visou

explorar uma aplicação potencial do extrato oleoso de sementes de urucum como revestimento de bifes que confirmam não só melhoras na cor e sabor, mas também que possa retardar o crescimento microbiano.

Deste modo, os objetivos deste capítulo foram: (i) avaliar mediante provas 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 patógeno em bifes revestidos com extrato oleoso de sementes de urucum para os dois tipos de embalagem.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Materiais

Todos os experimentos realizados neste trabalho ocorreram no Laboratório de Bacteriologia do Centro de Investigação de Montanha (CIMO) do Instituto Politécnico de Bragança (IPB). Para a realização deste estudo, utilizou-se sementes de urucum 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 WDCM 00032 que é equivalente a ATCC™ 6538.

4.2.2 Preparação dos extratos de sementes de urucum em óleo de coco

A extração por solventes usando óleo vegetal foi o método aplicado para a extração da bixina presente nas sementes de urucum. As pesagens das sementes foram realizadas de acordo com a concentração de óleo de urucum desejada para a realização do experimento. Neste estudo, extrações de 10, 20% e 30% p/p de sementes de urucum em óleo de coco foram utilizadas.

Um esquema da metodologia realizada para obtenção do extrato oleoso de urucum é mostrado na Figura 4.1. Inicialmente, pesaram-se 10, 20 e 30 gramas de sementes moídas e adicionaram-se

sequencialmente em 100 gramas de óleo de coco em estado líquido contido em três beakers. Em seguida, os beakers foram submetidos a uma estufa com agitação a 37°C por 15 horas (SI500, Stuart, Reino Unido). Após a retirada do equipamento, o óleo foi transferido em tubos de 40 ml e colocados numa centrífuga (5804R, Eppendorf, Alemanha), operando a temperatura de 25°C e 5800 rpm por 10 min. Após centrifugar o sobrenadante por duas vezes, fez-se uma transposição do sobrenadante filtrado para um novo tubo com o objetivo de obter uma amostra clarificada. Durante o decorrer da experiência, os extratos foram mantidos em refrigeração e protegidos da luz.

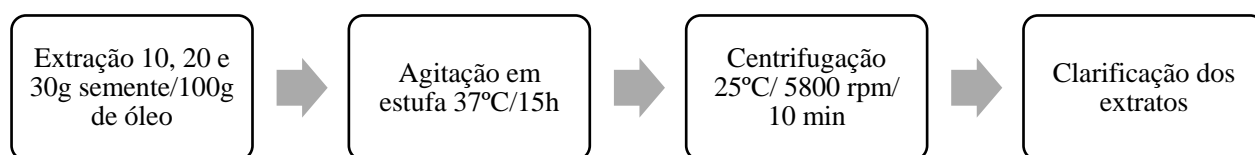


Figura 4.1. Obtenção do extrato oleoso de urucum a 10%, 20% e 30% p/p.

4.2.3 Preparação do inóculo

Staphylococcus aureus WDCM 00032 foi mantido em criotubos como stock congelado em 30% glicerol a -80 °C. O primeiro passo na preparação do inóculo foi então a reativação da bactéria. Usando uma alça estéril transferiu-se um raspado do criotubo para cada um de dois tubos que continham 10 ml de caldo soja triptona (TSB 610053, Liofilchem, Itália). Este caldo nutritivo foi utilizado para possibilitar o aumento do inóculo bacteriano.

Os tubos foram colocados numa estufa com agitação por 15 horas a 37°C (SI500, Stuart, Reino Unido) o qual foi um tempo suficiente para o microrganismo atingir o começo da fase estacionária. Após este tempo de incubação, uma alçada do caldo TSB de cada tubo turvo foi estriada em placas de ágar Baird Parker (BP) suplementado com emulsão gema de ovo telurito (Egg Yolk Tellurite Emulsion, YET) para a obtenção de colônias bacterianas isoladas, e desta forma assegurar que o inóculo se tratava de um cultivo puro. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, e os tubos com caldo TSB foram mantidos em refrigeração por mais dois dias por precaução.

Após os dias de incubação foi observado nas placas o crescimento de colônias características de *S. aureus*. Com o auxílio de uma alça, foi transferida uma picada de colônia isolada de *S. aureus* da placa para um novo tubo contendo 10 ml de caldo TSB, o qual foi realizado sempre um dia antes dos ensaios de inoculação dos bifés. Este novo tubo, denominado “tubo mãe”, foi colocado em agitação na mesma estufa a 37°C por 15 horas. No mesmo dia da inoculação dos bifés, 1 ml de caldo do tubo mãe foi transferido a um tubo de 9 ml de solução fisiológica (denominado “tubo -1”), com a finalidade de reduzir a concentração desde $\sim 10^9$ até $\sim 10^8$ CFU/ml. Os bifés foram inoculados a partir do tubo contendo a solução fisiológica. A determinação do tamanho de alíquota (μl) a ser espalhado no bife para a inoculação superficial foi determinado com a ajuda de uma curva de calibração. Na Figura 4.2 apresenta-se um esquema que sumariza a metodologia utilizada para a preparação do inóculo.

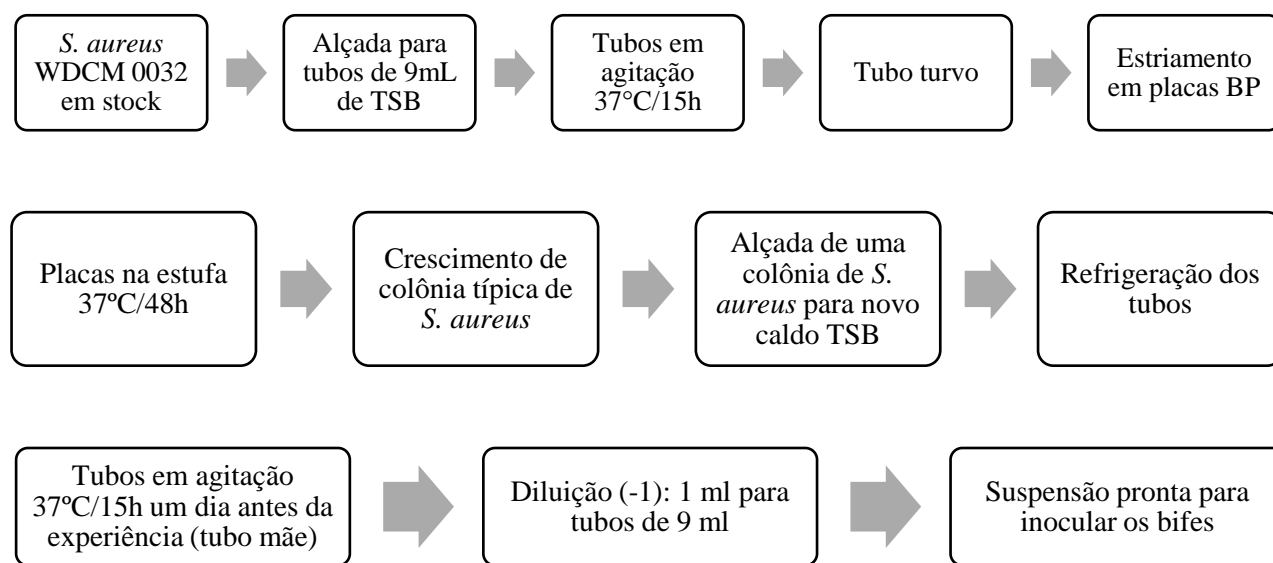


Figura 4.2. Preparação do inóculo de *S. aureus*

4.2.4 Construção da curva de calibração

Para a construção da curva de calibração, partiu-se do tubo com caldo TSB contendo aproximadamente 10^9 CFU/ml *S. aureus*, descrito na Secção 4.2.3. A partir deste tubo “mãe”, se realizaram diluições sucessivas em tubos de 9 ml de TSB até chegar a diluição 10^6 (CFU/ml) de

Staphylococcus aureus. A absorbância de cada tubo, do menos diluído para o mais diluído, foi mensurada em triplicata num espectrofotômetro (Specord, Analytik Jena, Alemanha), a um comprimento de onda de 600 nm. A seguir, determinou-se a concentração de *S. aureus* em log CFU/ml em cada um dos tubos plaqueando 0,1 ml em duplicata em ágar Baird-Parker suplementado com emulsão gema de ovo telurito (conforme descrito na Secção 4.2.7).

A curva de calibração foi obtida mediante uma regressão linear do logaritmo base dez dos valores médios de absorbância como variável independente, e a concentração de *S. aureus* em log CFU/ml no caldo TSB. A Figura 4.3 apresenta a equação de calibração e o coeficiente de determinação ($R^2=0,9886$), o qual foi bastante satisfatório. O objetivo desta equação foi calcular o volume de alíquota (μ l) a ser transferido na superfície dos bifes para a inoculação, bem como quantificar *S. aureus* presente nos tubos ao longo deste trabalho para padronizar as etapas, considerando que este exercício de ativação do stock congelado e inoculação em bifes foi repetido várias vezes.

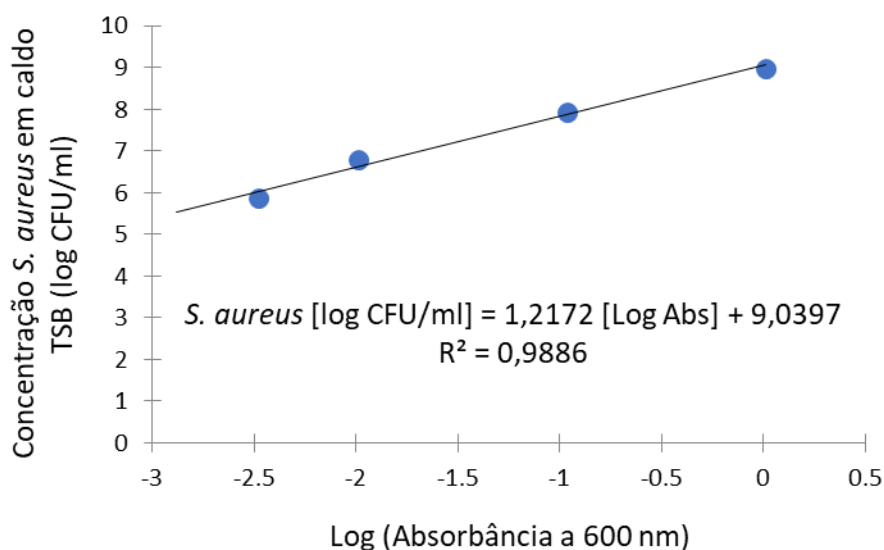


Figura 4.3. Curva de calibração que relaciona a concentração de *S. aureus* em log CFU/ml de caldo TSB com o logaritmo da absorbância média (600 nm)

Através da equação, é possível estimar a concentração de *S. aureus* no tubo mãe (após incubação), e por conseguinte determinar o volume de alíquota (ml) do tubo -1 que deve ser inoculado nos bifes para eles atingirem uma contaminação superficial de $\sim 5,20$ log CFU/cm². Sendo que os bifes foram cortados com um cortador circular de área 40,70 cm² (área dos bifes), a

alíquota de inóculo deve ser de um volume **X** tal que providencie $10^{5.2} \times 40,70$ CFU ($=6,45 \times 10^6$ CFU) na superfície do bife. Assim, conhecendo a concentração de *S. aureus* no tubo mãe mediante o valor de absorbância obtido pela curva de calibração, é possível calcular com exatidão o volume da alíquota **X**. Suponhamos que se determina mediante a curva de calibração que o tubo mãe tem uma concentração de *S. aureus* de 10^9 CFU/ml. Portanto, o tubo -1 terá uma concentração de 10^8 CFU/ml, e a partir disto o problema se reduz a uma regra de três simples:

<i>No tubo -1:</i>	10^8 CFU	→	1 ml
<i>No bife:</i>	$6,45 \times 10^6$ CFU	→	X

Onde **X** resulta 0,065 ml ou 65 μ l. Desta forma, deduz-se que o volume de alíquota a ser pipetado do tubo -1 à superfície de cada bifinho é de ~ 60 μ l. Este procedimento foi seguido cada vez que se realizou um ensaio de desafio.

4.2.5 Ensaio de desafio

O desenho experimental para os ensaios de desafio foi um desenho fatorial 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 que foram replicadas duas vezes.

O preparo dos bifos de bovino e a aplicação dos revestimentos foi realizado da mesma maneira tanto para embalados em atmosfera normal quanto à vácuo e, para os bifos que foram revestidos com 0, 10, 20 e 30% de extrato oleoso de urucum.

Primeiramente, os bifos de carne bovina foram cortados em formato circular com o auxílio de um cortador de 6,50 cm de diâmetro ($40,70$ cm² de área). Para cada condição experimental, cortaram-se 18 amostras de bifos para cobrir as determinações de 6 pontos no tempo (desde Dia 0 até Dia 14) e 3 bifos analisados por ponto (triplicata). Uma vez cortados, os bifinhos foram sanitizados por submersão numa solução 200 ppm de hipoclorito de sódio durante 4 minutos, com o objetivo de reduzir a carga microbiana de *S. aureus* que pudesse estar presente. Ao cabo deste tempo, os bifos foram rapidamente retirados da solução, e acomodados com uma pinça

estéril em bandejas de aço inox estéreis cobertos de papel secante. Posteriormente, as amostras que seriam armazenadas em atmosfera normal foram colocadas em pequenas formas de metal que tinham sido previamente esterilizadas. Imediatamente, cada bife foi inoculado com um volume de ~60 µl do tubo -1 contendo o inóculo, com a finalidade de alcançar uma concentração de ~5.2 log CFU *S. aureus* por cm² de superfície de bife (ver Seção 4.2.4). Rapidamente, o inóculo foi espalhado com um espalhador. Os bifos inoculados foram deixados secar por 30 minutos.

4.2.6 Aplicação do revestimento de 0%, 10%, 20% e 30% de extrato de urucum em óleo de coco

Para o tratamento controle, não se aplicou nenhum revestimento, portanto esses 18 bifos inoculados foram embalados seja em atmosfera normal ou a vácuo (Figura 4.4; acima esquerda). Nos outros tratamentos – aqueles com revestimento de extrato oleoso de urucum – cada bife foi revestido com 1 ml de extrato oleoso de urucum ao 0%, 10%, 20% ou 30%, e espalhado em toda sua superfície com auxílio de um espalhador. O tratamento com extrato oleoso de urucum ao 0% foi denominado também como controle 1 devido a que o bife foi revestido somente com o óleo de coco. Os bifos que foram submetidos a atmosfera normal foram recobertos com um filme de modo a causar uma barreira contra o ambiente externo. Na Figura 4.4 apresentam-se fotografias de amostras de bife já terminadas de controle sem revestimento, controle com 0% extrato oleoso de urucum, e tratamentos de 10%, 20% ou 30% extrato oleoso de urucum embalados em atmosfera normal. Note-se que para os tratamentos em atmosfera normal, os bifos foram acondicionados separadamente nas formas de metal já desde a fase de inoculação.

No caso dos tratamentos submetidos a embalagem a vácuo, cada um dos bifos inoculados e/ou revestidos foram colocados num saco de stomacher (Gofradas, Orved®, Spain, com permeabilidade 84 ± 4.20 cc/m²/24 h/atm para O₂, 361 ± 18.05 cc/m²/24 h/atm para CO₂, 22 ± 1.10 cc/m²/24 h/atm para N₂, e 9.0 ± 0.45 cc/m²/24 h/atm para H₂O) com ajuda de uma pinça, e selado a vácuo (Silvercrest SFS 110B2, Germany). As fotografias da Figura 4.5 apresentam as amostras já terminadas de controle sem revestimento, controle com 0% extrato oleoso de urucum, e tratamentos de 10%, 20% ou 30% extrato oleoso de urucum embalados a vácuo. Os bifos foram mantidos durante 14 dias a 5 ± 0.5 °C num frigorífico que foi exclusivamente

dedicado à execução deste trabalho para evitar variações de temperatura que pudessem afetar a quantificação da cinética do *S. aureus*.



Figura 4.4. Condições experimentais de controle sem revestimento (acima esquerda), controle com 0% extrato oleoso de urucum (acima direita), e tratamentos de 10%, 20% ou 30% extrato oleoso de urucum (abaixo) embalados em atmosfera normal

4.2.7 Quantificação da concentração de *S. aureus*

A concentração de *S. aureus* nos bifes foi determinada nos dias 0 (dia da condução do ensaio de inoculação), 2, 5, 8, 11 e 14, analisando três bifes por tempo e por condição experimental. Na modelação matemática, utilizaram-se as médias em log CFU/cm² dessas três determinações (três bifes).

Para análise de *S. aureus*, prepararam-se tubos de água tamponada peptonada (BPW 611014, Liofilchem, Itália), e placas de ágar Baird-Parker (BP 610004, Liofilchem, Itália) suplementado com 5% emulsão gema de ovo telurito (YET 80121, Liofilchem, Itália), seguindo instruções do fabricante.

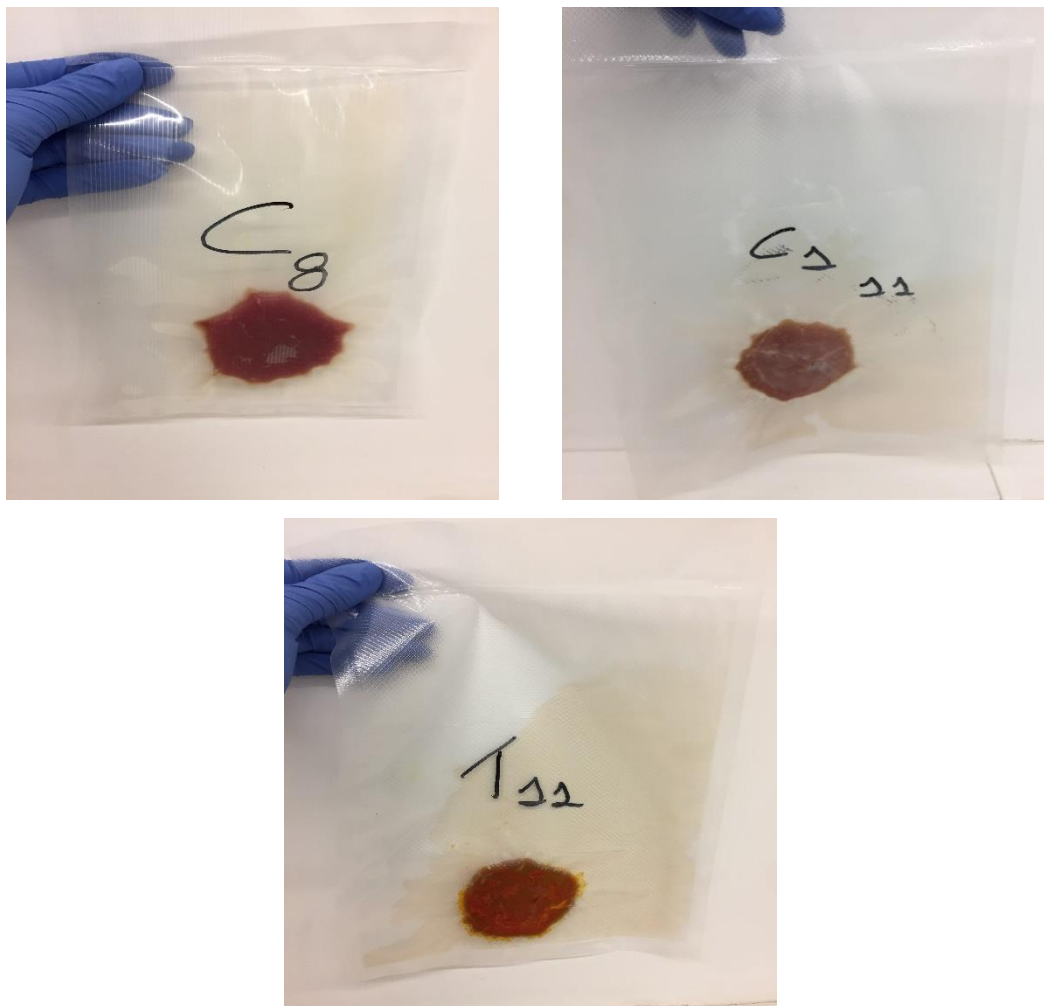


Figura 4.5. Condições experimentais de controle sem revestimento (acima esquerda), controle com 0% extrato oleoso de urucum (acima direita), e tratamento de 10%, 20% ou 30% extrato oleoso de urucum (abaixo) embalados a vácuo

No caso dos tratamentos armazenados em condições atmosféricas, os bifes foram retirados das formas de metal e passados em bolsas de stomacher contendo 50 ml BPW. Já para os bifes acondicionados a vácuo só foi necessária a abertura dos sacos, seguida da adição de 50 ml de BPW. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em um stomacher (BagMixer[®] 400) por 90 s (Figura 4.6). 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, Polônia) a 37°C por 48 h. Depois deste tempo, as colônias típicas de *S. aureus* foram observadas em um contador (Digital S®, J.P. Selecta S.A., Espanha) e contadas nas placas que continham entre 15 e 150 colônias. Estes valores foram convertidos a log CFU/cm².

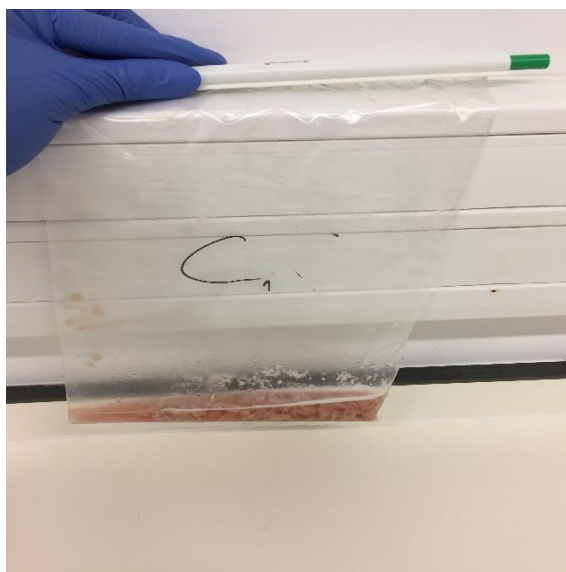


Figura 4.6. Amostra de bife após homogeneização

4.2.8 Modelos de sobrevivência do *S. aureus*

4.2.8.1 Modelação Primária

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 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/cm² no tempo t (dias); $N(0)$ é a concentração microbiana inicial, após inoculação, em CFU/cm²; σ é o parâmetro de escala ou declive, e t é um tempo característico, enquanto β 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 re-parameterizado definindo como variável dependente o rácio de sobrevivência do patogênico ao longo do tempo, $S(t)$,

$$S(t) = \frac{N(t)}{N(0)} \quad (2)$$

Portanto, a Equação (1) transforma-se em:

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

O modelo de Weibull de dois parâmetros da Equação (3) foi ajustado a cada uma das curvas experimentais de sobrevivência produzidas pelos diferentes tratamentos.

Uma vez que os parâmetros σ e β foram estimados para cada uma das curvas experimentais, calculou-se o tempo necessário para atingir uma redução decimal, isto é, $1 \log_{10}$ CFU/cm² (ou $2.3 \ln$ CFU/cm²). Para tal, resolveu-se a Equação (3) para determinar o tempo, agora denotado por $t_{1\log}$,

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

A variável $t_{1\log}$ foi determinada para cada uma das condições ambientais.

4.2.8.2 Modelação Secundária

Com os dois parâmetros cinéticos, declive de Weibull (σ) e tempo para atingir a primeira redução decimal ($t_{1\log}$), já determinados mediante o ajuste dos modelos primários, foi possível realizar a modelação secundária. A modelação secundária teve por objetivo produzir modelos de σ e $t_{1\log}$ em função das condições ambientais, que neste caso são a percentagem de urucum extraído em óleo de coco e o tipo de atmosfera na embalagem. Após a análise dos resultados, verificou-se uma relação linear inversa entre σ e $t_{1\log}$ com a percentagem de urucum extraído em óleo de coco. Assim, os seguintes modelos secundários foram ajustados,

$$\sigma = \beta_0 - \beta_1 \times (\% \text{ Extrato}) \quad (5)$$

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

onde β_0 , β_1 e γ_0 , γ_1 são constantes, e $\% \text{ Extrato}$ é a porcentagem de urucum extraído em óleo de coco, que no ajuste toma os valores de 0, 10, 20 e 30. As equações (5) e (6) para o declive de Weibull (σ) e para o tempo para atingir a primeira redução decimal (t_{1log}) foram ajustadas separadamente aos dados provenientes da atmosfera normal e aos de vácuo, de tal maneira que foram quatro as regressões lineares ajustadas no total.

Toda a análise estatística foi levada a cabo no software R studio versão 3.6.1, utilizando a função *nls()* para ajustar os modelos primários; a função *lm()* para ajustar os modelos secundários; a package *investr* para determinar t_{1log} e os seus intervalos de confiança e previsão ao 95%; e a função *plot()* para construir os gráficos.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Sobrevivência de *S. aureus* em bifés revestidos com extrato de urucum em óleo de coco embalados em atmosfera normal

A Figura 4.7 mostra as curvas experimentais e as ajustadas pelo modelo Weibull para todos os tratamentos que foram embalados em atmosfera normal. Em primeiro lugar, pode-se afirmar que o modelo Weibull foi capaz de descrever bem 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 controle com os tratamentos de revestimento de extrato oleoso de urucum ao 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-se apreciar mediante os valores dos parâmetros do modelo Weibull σ e β , que se apresentam na Tabela 4.1 para cada um dos tratamentos.

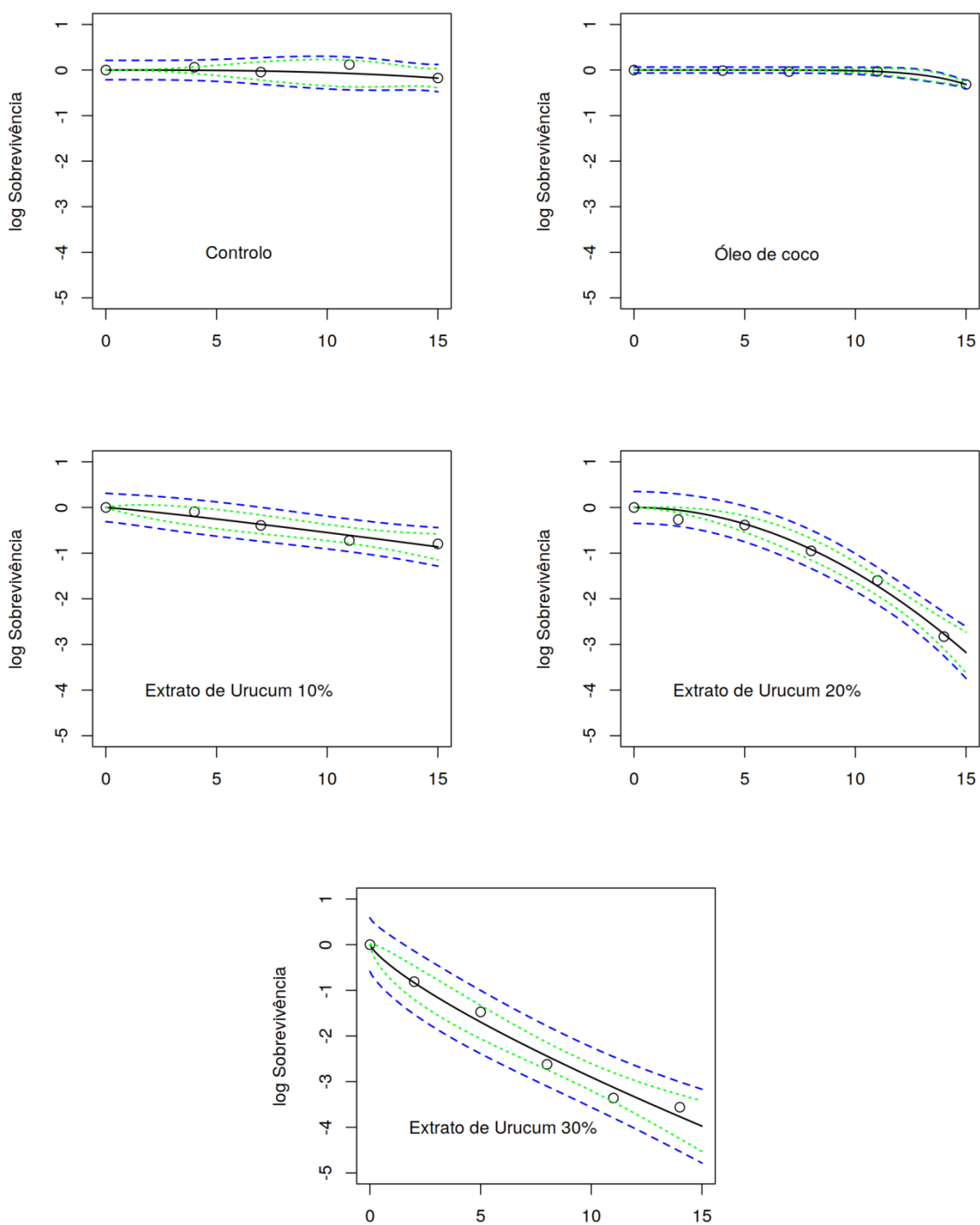


Figura 4.7. Curvas da sobrevivência ($\ln(N(t)/N_0)$) do *S. aureus* em bifes sem revestimento (controle), revestidos com óleo de coco e revestidos com extrato oleoso de urucum ao 10, 20 e 30%, embalados em atmosfera normal e estocados a 5°C. Em cada tratamento, mostra-se a curva ajustada pelo modelo de Weibull com os intervalos de confiança (verde) e de previsão (azul) ao 95%. Eixo x: Dias

A curva experimental para o controle (Figura 4.7) demonstra que *S. aureus*, se bem não é capaz de se multiplicar sob refrigeração, foi capaz de sobreviver nos bifés refrigerados embalados em atmosfera normal. De acordo com Fellows (2018) e Tortora et al. (2016), a eficácia de baixas temperaturas sobre os microrganismos depende de dois fatores: a característica própria do microrganismo e a intensidade com que essa temperatura é aplicada. Em uma variação entre 0 e 7°C, a taxa metabólica da maior parte das bactérias é reduzida ao ponto de não conseguirem se reproduzir ou sintetizar toxinas, portanto a refrigeração tem um efeito bacteriostático, como se tem verificado no controle *S. aureus* é um patogênico com uma capacidade muito reduzida de crescer nessa faixa de temperatura. Hoffmann (2001) explica que este fator extrínseco compromete a fase lag, a velocidade de multiplicação, e a composição química e enzimática das células. Suas reações metabólicas são catalisadas por enzimas e a taxa de reação catalisada enzimaticamente depende da temperatura (de Souza et al., 2013).

Tabela 4.1. Parâmetros do modelo de Weibull que descreve o logaritmo natural da redução ($\ln(N_0/N(t))$) nas contagens de *S. aureus* em bifés controle, e revestidos com óleo de coco e com extrato oleoso de urucum, embalados em atmosfera normal e estocados a 5°C. O erro padrão residual (s) é mostrado para cada modelo.

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

Cabe destacar que no controle, o parâmetro de forma β resultou não ser significativamente diferente de zero ($p=0,437$), o qual reduz o modelo de Weibull a praticamente a equação de uma linha reta para descrever a sobrevivência do *S. aureus*. Isto pode ser apreciado na Figura 4.7. Já

para os outros tratamentos, o parâmetro β foi significativo ($p < 0,05$) devido à existência de curvatura no decréscimo da sobrevivência bacteriana (Figura 4.7).

Em comparação ao controle, a curva de sobrevivência do *S. aureus* em bifes revestidos com óleo de coco, apresentou uma queda muito ligeira, basicamente no dia 15, podendo ser dito que sua ação antimicrobiana nos bifes durante refrigeração é 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* afirmou efeito inibitório do óleo de coco virgem sobre o crescimento de *S. aureus* na concentração de 200 μ l (igual a 0,102% de ácido láurico). Estes autores argumentaram que esta inibição é devida a 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.

Hovorková et al. (2018) avaliaram a atividade antibacteriana *in vitro* de óleos vegetais que contém ácidos graxos de cadeia média contra bactérias Gram positivas, incluindo cinco bactérias de origem alimentar e seis linhagens intestinais domésticas. A metodologia seguida pelos autores referente ao preparo 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 patógeno em questão. Effiong et al. (2018) avaliaram o padrão de suscetibilidade antimicrobiana do extrato de óleo de coco sobre bactéria e fungos selecionados, utilizando a prova *in vitro* do diâmetro de inibição. Os resultados obtidos revelaram que *S. aureus* manifestou maior suscetibilidade ao óleo de coco, devido a sua zona média de inibição de 14,55 mm, do que a *Pseudomonas aeruginosa* que obteve uma zona de inibição média (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 species*, *Lactobacillus species* e *Escherichia coli*. Estes autores determinaram que a zona de inibição do *S. aureus* foi de 10,50 mm, e concluíram 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 gênero *Streptococcus*, mas não possuem efeito contra *S. aureus* ou algumas bactérias Gram negativas, enquanto o ácido láurico apresentou efeito inibitório somente contra *S. aureus* e todo o gênero *Streptococcus*.

Outros autores têm investigado o efeito inibidor *in vitro* do óleo de coco em sinergias com outros compostos. Tangwatcharin & Khopaibool (2012) pesquisaram as atividades *in vitro* do óleo de coco virgem, ácido láurico e monolaurina em combinação com ácido láctico contra *S. aureus*. Foram utilizadas as concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 0,8. 1,6; 3,2 e 6,4% v/v dos agentes antimicrobianos. Já na concentração 0,1% v/v, a combinação de ácido láctico com o ácido láurico e com a monolaurina apresentaram resultados positivos, com uma atividade antimicrobiana (zona de inibição) de $8,0 \pm 0,71\%$ v/v e $7,0 \pm 0,01\%$ v/v, respectivamente. O óleo de coco virgem não inibiu o crescimento do patógeno, diferente do o ácido láurico que apresentou um MIC 1,6% v/v e MBC 3,2% v/v seguido da monolaurina e do ácido láctico que apresentaram o mesmo valor para MIC 0,1% v/v, e de MBC 0,1% v/v e 0,4% v/v, respectivamente. O óleo de coco virgem também é efetivo contra *S. aureus* quando é combinado com o extrato de semente de *Swietenia mahagoni*, conhecida por mogno (zona de diâmetro de inibição 8.49 ± 0.3 mm; Idris et al., 2019), ou quando é combinado com o carvacrol, maior componente de vários óleos essenciais (MIC 1 mg/ml, Božik et al., 2018).

As justificativas que são colocadas para propor o óleo de coco como um antimicrobiano natural é que o ácido láurico (metabólito secundário) consegue desintegrar os lipídios que constituem a membrana das bactérias (DebMandal & Mandal, 2011), e que a monolaurina, um monoéster do ácido láurico, consegue aumentar o vazamento das membranas celular de *S. aureus* ocasionando a sua lise celular (Tangwatcharin & Khopaibool, 2012; Warth, 1989).

Devido às grandes diferenças de resultados encontrados pelos investigadores anteriormente citados sobre a propriedade antimicrobiana do óleo de coco virgem, a sua efetividade contra *S. aureus* se torna questionável. São necessárias mais investigações acerca desse assunto para sustentar que óleo de coco tem capacidade de inibir bactérias Gram negativas e Gram positivas, não somente *in vitro*, se não também quando estão presentes em produtos alimentares. No presente experimento – *in situ*, o óleo de coco virgem não possuiu efeito inibidor relevante contra *S. aureus* nos bifés, pelo menos em atmosfera normal e à concentração aplicada que foi de

1,0 ml de óleo de coco em 40 cm² de superfície de bife. Usar uma maior concentração de óleo de coco nos bifos resultou tecnicamente inviável.

A percentagem de urucum extraído em óleo de coco (10, 20 e 30%) afetou significativamente a cinética de sobrevivência do *S. aureus* nos bifos, como se pode observar na Figura 4.7. Os extratos oleosos de urucum aceleraram a inativação microbiana em diferente medida, como se pode inferir dos parâmetros Weibullianos da Tabela 4.1. Curiosamente, verificou-se que o erro padrão residual dos modelos se incrementou 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 estresse 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, representada pelos valores de β acima de 1 ($\beta=1,113$ para 10% urucum, e $\beta=1,979$ para 20% urucum); Tabela 4.1 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 ao 30% produziu um valor de β menor a 1 ($\beta=0,775$), 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, como se apresentou e sumarizou mediante meta-análise no Capítulo 3 desta tese. 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, e essas variações podem ser decorrente dos protocolos de quantificação utilizado, das diferenças entre as 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, as seguintes MIC contra *S. aureus* tem sido reportadas: 0,032 mg/ml (Ciro et al., 2014), 0,16 mg/ml (Galindo-Cuspinera et al., 2003), e 8 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 incluem compostos bioativos derivados do seu metabolismo secundário, nomeadamente compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos, taninos) e carotenoides (beta caroteno, licopeno, luteína e bixina).

Cabe destacar que na literatura não foi encontrado investigações 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 e segurança dos alimentos. Segundo Costa & 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 & Chin (2016), Yolmeh et al. (2014) e Zarringhalami et al. (2009). Zarringhalami et al. (2009) avaliaram a efetividade do urucum em salsichas inoculadas com 10^2 esporos de *Clostridium perfringens* por 100 g de amostra. As amostras ficaram em refrigeração a $4\pm 1^\circ\text{C}$ durante 30 dias. A partir do 7º dia foi observado a não esporulação do *C. perfringens*. Van Cuong & Chin (2016) analisaram a atividade do pó de sementes de *Bixa orellana* em rissóis suínos durante o armazenamento refrigerado. Foram adicionadas três diferentes concentrações de pó de sementes no preparo 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 controle e as que sofreram tratamento, entretanto com adição do pó de urucum houve a redução da contagem microbiana de *Enterobacteriaceae* a partir da aplicação de um tratamento maior que 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 a temperatura ambiente (25°C). Como conclusão do experimento, foi observado uma maior redução de *E. coli* na temperatura de 25°C quando comparada com a de 4°C , sendo a partir do 12º a 25º dia e 15º dia de armazenamento, respectivamente, o não crescimento de nenhuma *E. coli*. Devido à indisponibilidade de estudos na comunidade científica no que diz respeito a estudos de desafio para quantificar a capacidade antimicrobiana do óleo de coco virgem e do extrato oleoso de urucum aplicados numa matriz alimentar, especificamente em carne fresca, é que se realizou este experimento.

4.3.2 Sobrevivência de *S. aureus* em bifes revestidos com extrato de urucum em óleo de coco embalados a vácuo

As curvas experimentais de sobrevivência do *S. aureus* nos bifes embalados a vácuo podem ser visualizadas na Figura 4.8 para o controle e para os tratamentos com revestimento. Pode-se observar nesta Figura 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 maior (Tabela 4.2).

Uma diferença importante observada entre as curvas de sobrevivência microbiana produzidas sob atmosfera normal (Figura 4.7) e sob vácuo (Figura 4.8) é a presença e a ausência de “ombro”, respectivamente, no início do armazenamento. Em atmosfera normal, *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 em nenhum dos tratamentos a fase de ombro ou de inativação inicial demorada, pelo que o decréscimo em *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 β foram menores a 1 para todos os tratamentos a vácuo exceto o do 20% extrato de urucum (Tabela 4.2). A ausência de ombro nas curvas de todos os 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.

A diferença dos bifes controle armazenados em atmosfera normal onde *S. aureus* não foi inativado, nos bifes controle armazenados a vácuo, *S. aureus*, embora lentamente, sofre inativação, o qual sugere que a temperatura de refrigeração e o vácuo têm um efeito sinérgico sobre a inativação deste patógeno. O mesmo foi verificado nos bifes revestidos com óleo de coco (0% urucum): a inativação do *S. aureus* foi notavelmente maior quando os bifes foram embalados a vácuo (Figura 4.8) do que na atmosfera normal (Figura 4.7). Nesse caso, pode ter-se manifestado sinergia entre temperaturas de refrigeração, ausência de oxigênio e componentes antimicrobianos presentes no óleo de coco virgem.

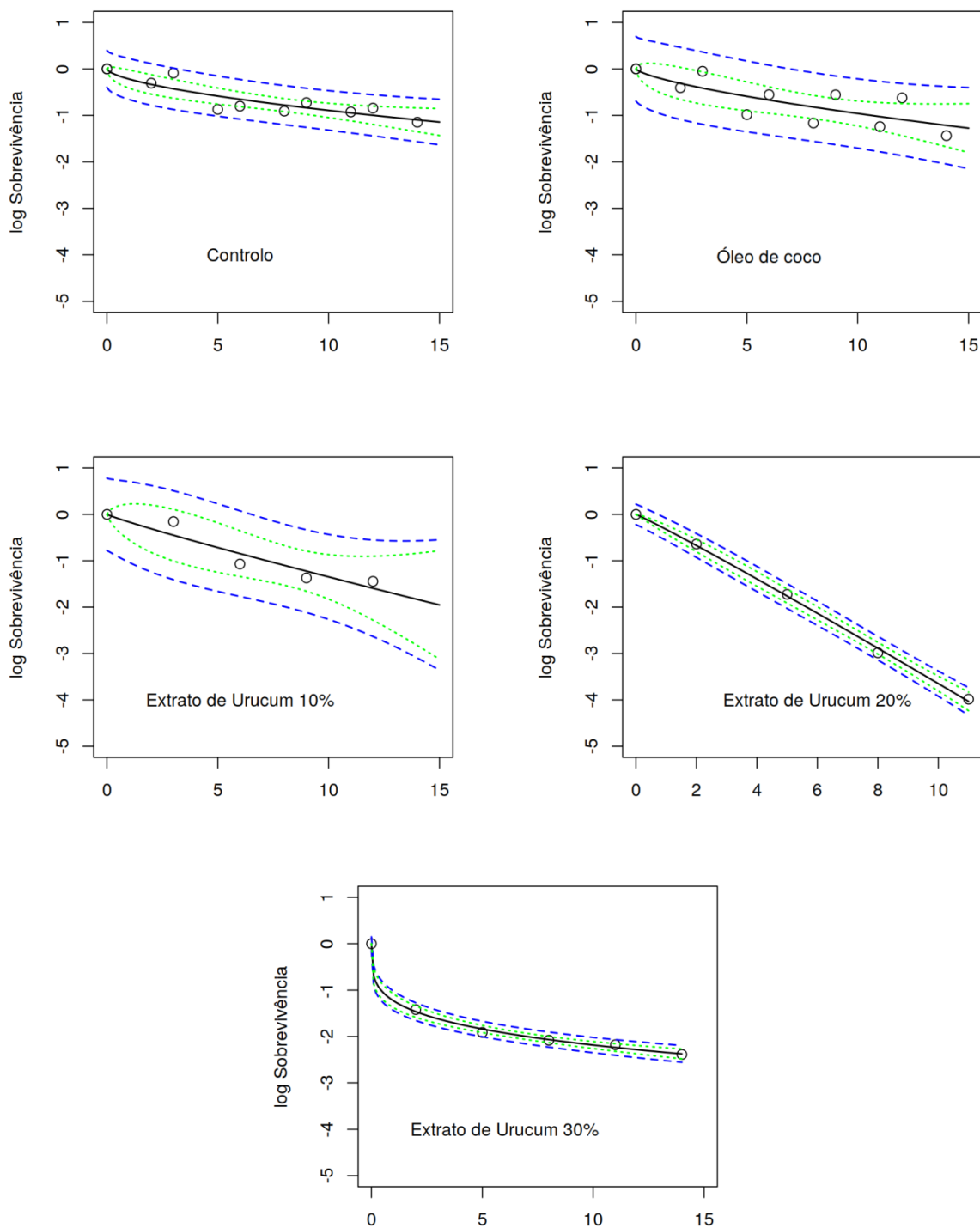


Figura 4.8. Curvas da sobrevivência ($\ln(N(t)/N_0)$) do *S. aureus* em bifes sem revestimento (controle), revestidos com óleo de coco e revestidos com extrato oleoso de urucum ao 10, 20 e 30%, embalados a vácuo e estocados a 5°C. Em cada tratamento, mostra-se a curva ajustada pelo modelo de Weibull com os intervalos de confiança (verde) e de previsão (azul) ao 95%. Eixo x: Dias

Tabela 4.2. Parâmetros do modelo de Weibull que descreve o logaritmo natural da redução ($\ln(N_0/N(t))$) nas contagens de *S. aureus* em bifés controle, e revestidos com óleo de coco e com extrato oleoso de urucum, embalados a vácuo e estocados a 5°C. O erro padrão residual (s) é mostrado para cada modelo.

Tratamento	Parâmetro	Média	Erro Padrão	Pr(> t)	s/R
Controle	Declive (σ)	3,081	1,039	0,016	s=0,4027
	Forma (β)	0,611	0,174	0,006	
Extrato urucum 0% (óleo de coco)	Declive (σ)	3,226	1,624	0,078	s=0,7071
	Forma (β)	0,700	0,303	0,046	
Extrato urucum 10%	Declive (σ)	2,894	1,270	0,107	s=0,5636
	Forma (β)	0,913	0,327	0,068	
Extrato urucum 20%	Declive (σ)	1,320	0,099	<0,001	s=0,2890
	Forma (β)	1,051	0,041	<0,001	
Extrato urucum 30%	Declive (σ)	0,015	0,008	0,118	s=0,4876
	Forma (β)	0,248	0,020	<0,001	

O efeito do vácuo na inativação do *S. aureus* para todos os tratamentos reflete-se nos menores valores de ambos parâmetros (σ , β) do modelo de Weibull (Tabela 4.2) em comparação com os obtidos para os respectivos tratamentos em atmosfera normal (Tabela 4.1); 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 em inibir ou retardar crescimento microbiano, o qual pode ser explorado em combinação com outros fatores intrínsecos estressantes para intensificar o efeito mitigante.

Ao embalar a carne a vácuo, a atmosfera gasosa em torno da sua superfície é alterada. A pequena quantidade de oxigênio que está presente no interior da embalagem é consumida pela atividade metabólica da carne e das bactérias ao longo do seu armazenamento. Dessa forma, um microsistema anaeróbico é criado dentro da embalagem e com o auxílio do efeito inibitório do CO₂ 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 detêm de um menor potencial de multiplicação em baixas temperaturas (Chaves, 2010).

É de ressaltar que o tratamento dos bifés recobertos com extrato oleoso de urucum ao 30% causou uma inativação imediata do *S. aureus*, o que se deduz pela acentuada concavidade da sua curva de sobrevivência (Figura 4.8); no entanto, a partir do quinto dia de armazenamento esta inativação gradativa ocorreu muito lentamente ou asintoticamente, sugerindo que *S. aureus* podia ter adquirido alguma resistência contra o antimicrobiano a esta alta concentração. De fato, este foi o único tratamento onde se observou este tipo de comportamento cinético. É necessário portanto a realização de novos ensaios de carne embalada a vácuo em que se utilize o extrato oleoso de urucum a concentrações maiores de 30%, com a finalidade de analisar se *S. aureus* adquire resistência.

Embora os parâmetros Weibullianos σ e β descrevem a cinética das curvas de sobrevivência microbiana, estes parâmetros em si não são intuitivos; por esta razão os parâmetros ajustados σ e β foram utilizados para estimar outro parâmetro mais intuitivo pela sua direta relação com o nível de letalidade dos tratamentos, que é o tempo necessário para atingir a primeira redução decimal do *S. aureus* t_{1log} (redução em 1 log CFU/cm²). A Tabela 4.3 mostra estes tempos de letalidade para todos os tratamentos em atmosfera normal e a vácuo, com os respectivos intervalos de confiança de 95% para as estimativas.

Tabela 4.3. Tempo (dias) necessário para atingir uma redução de *S. aureus* em 1 log CFU/cm² em bifés revestidos com óleo de urucum extraído ao 0, 10, 20 ou 30%, embalados em atmosfera normal ou a vácuo e estocados 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

Para os bifés refrigerados pertencentes ao grupo controle e aos que sofreram o revestimento 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*, devido a que a

inativação observada nestes dois tratamentos foi insuficiente (Figura 4.7). Esses resultados apontam que para os bifes controle em atmosfera normal, o fator temperatura baixa não foi suficiente para que ocorresse 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 que sofreram o revestimento com extrato de urucum, os resultados são diferentes, e foi possível calcular a letalidade. Ao revestir os bifes contaminados com *S. aureus* com o extrato oleoso foi possível determinar que quanto maior a porcentagem de urucum extraído menor é o tempo necessário para reduzir *S. aureus* em 1 log CFU/cm², demonstrando assim a capacidade antimicrobiana dos extratos oleosos contra este patógeno. Para os bifes que receberam o tratamento de extrato de urucum 30%, a primeira redução decimal se alcançou em 2,531 dias; para os bifes que receberam o tratamento com extrato ao 20%, o tempo necessário foi de 8,364 dias; e para os bifes que receberam o tratamento com extrato ao 10%, o tempo necessário foi bastante alto, de 14,42 dias.

Para os bifes embalados a vácuo, foi possível estimar o tempo de letalidade em todos os tratamentos aplicados. No tratamento controle embalado a vácuo, a primeira redução decimal estima-se que ocorre depois de 12,04 dias de armazenamento refrigerado, enquanto este tempo é menor, de 10,60 dias, para os bifes revestidos com óleo de coco. Mais uma vez, nos bifes revestidos de extrato de urucum, o tempo para a redução decimal ocorreu de forma gradativa: quanto maior a porcentagem de extrato mais rapidamente *S. aureus* foi reduzido, sendo para o extrato ao 30% o tempo necessário de 0,430 (~10 horas); para o extrato ao 20% o tempo necessário de 2,917 dias; e para o extrato de 10%, o tempo necessário de 7,208 dias.

Comparando a letalidade dos extratos de urucum entre os dois tipos de atmosfera, observou-se que o uso de vácuo reduziu pela metade o tempo para atingir a primeira redução decimal quando os bifes foram cobertos com extrato ao 10% (de 14,42 dias a 7,208 dias); para o extrato a 20%, o vácuo reduziu o tempo da redução decimal para um terço do valor em atmosfera (de 8,364 a 2,917 dias); e para o extrato a 30%, o vácuo reduziu o tempo de redução decimal para um sexto do valor em atmosfera (de 2,531 a 0,430 dias). O modo de preparo dos bifes, a aplicação dos tratamentos, a temperatura e os dias de armazenamento foram iguais para todos os bifes, sendo a única diferença o sistema de acondicionamento utilizado. A embalagem a vácuo por si só já consegue retardar o crescimento do patógeno presente na carne, e quando há aplicação de

revestimentos que possuem substâncias com capacidade antimicrobiana esse efeito de inibição é ainda maior.

4.3.3 Modelação secundária da cinética do *S. aureus* em bifés revestidos com extrato de urucum em óleo de coco

Para avaliação da cinética de inativação do *S. aureus* nos bifés, exercida pelo revestimento de extrato oleoso de urucum, ajustaram-se modelos secundários a partir dos parâmetros Weibullianos. Observou-se que a percentagem de urucum teve um efeito linear no parâmetro de declive σ em ambos tipos de embalagem, atmosfera normal e vácuo (Figura 4.9). Depreende-se desta figura que, a medida que o nível de urucum extraído se incrementa, a diferença no declive σ entre atmosfera e vácuo faz-se progressivamente menor. Isto acontece porque a maiores doses de urucum, os extratos provavelmente tem uma ação inibidora no *S. aureus* menor do que a do vácuo.

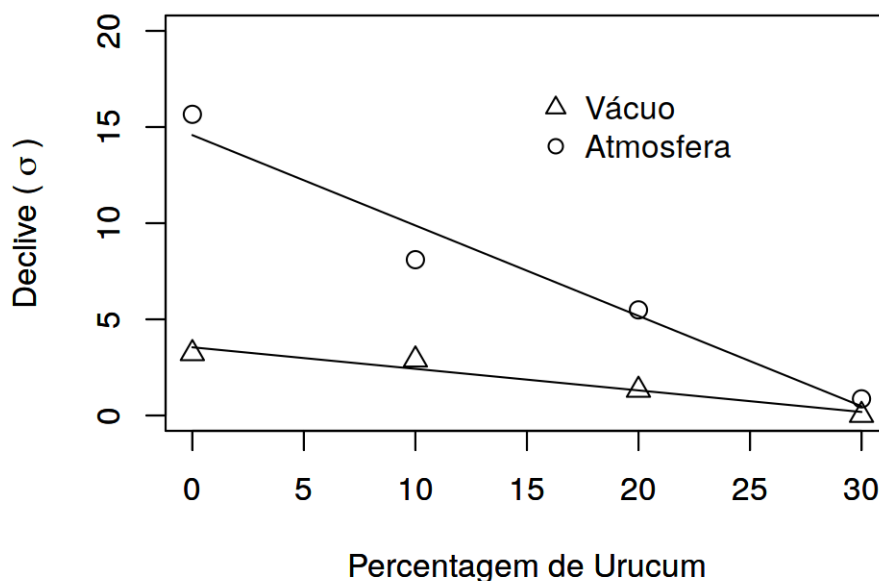


Figura 4.9. Parâmetro de declive (σ) do modelo Weibull que descreve a sobrevivência do *S. aureus* em bifés revestidos embalados a vácuo ou em atmosfera normal, em função à percentagem de urucum extraído em óleo de coco

Devido a esta clara dependência linear do declive à percentagem de urucum extraído, é que se ajustou um simples modelo de regressão linear a cada um dos tipos de embalagem. Os resultados desta regressão apresentam-se na Tabela 4.4.

Já para o parâmetro de forma β , não se observou nenhuma relação com a percentagem de urucum extraída em óleo de coco. Essa ausência de correlação aconteceu tanto para os tratamentos em atmosfera como para os tratamentos a vácuo, e pode ser apreciada na Figura 4.10. No entanto, esse resultado já tem sido observado em outros trabalhos que investigam a sobrevivência de diferentes bactérias em outros produtos alimentares, onde o β apresenta pouca ou nenhuma relação com a condição ambiental ou propriedade intrínseca do alimento.

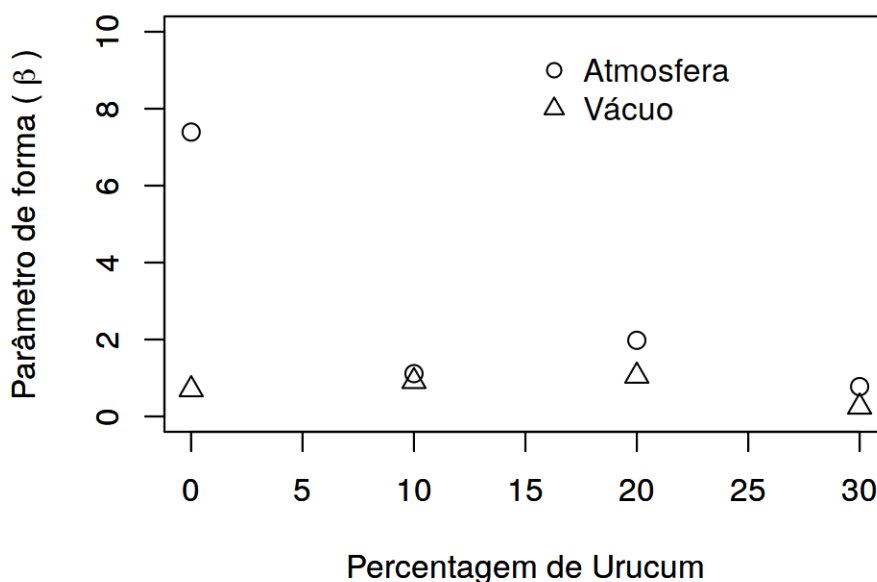


Figura 4.10. Parâmetro de forma (β) do modelo Weibull mostrando ausência de correlação com a percentagem de urucum extraído em óleo de coco para revestimento de bifes embalados a vácuo ou em atmosfera normal

No que diz respeito ao tempo em dias para atingir a primeira redução decimal (t_{1log}), este parâmetro de letalidade foi afetado linearmente pela percentagem de urucum extraída em óleo, em ambos tipos de embalagem, atmosfera normal e vácuo (Figura 4.11). Assim como aconteceu com o parâmetro de declive σ , pôde-se observar que a diferença em t_{1log} entre atmosfera e vácuo fez-se progressivamente menor a medida que a percentagem de urucum se incrementou. O fato das linhas de ajuste das Figuras 4.9 e 4.11 não serem paralelas evidencia que ocorre uma

interação entre tipo de embalagem e percentagem de urucum extraído. Os modelos de regressão linear de t_{1log} para os dois tipos de atmosfera compilam-se na Tabela 4.4

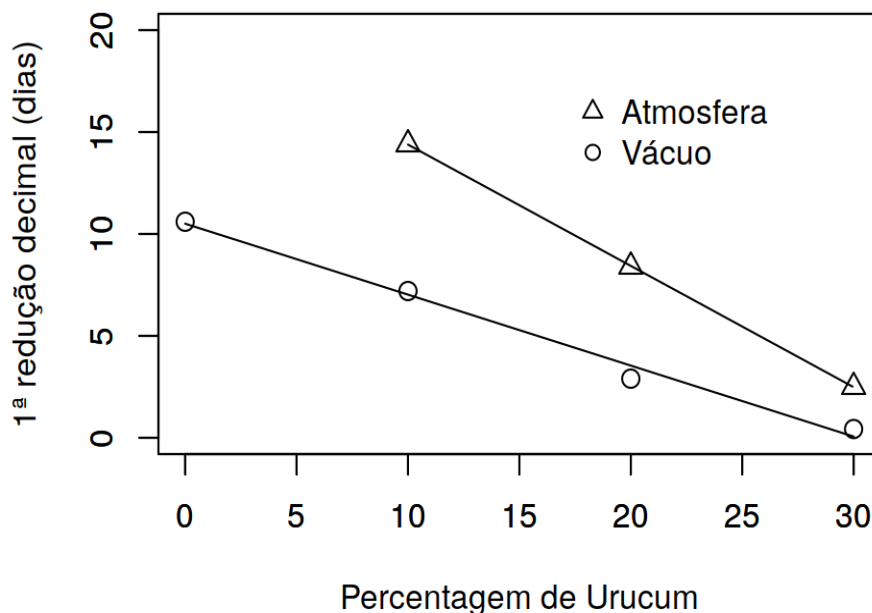


Figura 4.11. Tempo em dias (t_{1log}) para atingir a primeira redução decimal de *S. aureus* em bifés embalados a vácuo ou em atmosfera normal, em função à percentagem de urucum extraído em óleo de coco

Tabela 4.4. Modelos secundários para o declive de Weibull (σ) e para o tempo para atingir a primeira redução decimal (t_{1log}) na concentração de *S. aureus* [$\log \text{CFU}/\text{cm}^2$] em bifés revestidos em função à percentagem de urucum extraído em óleo de coco. Cada equação apresenta o erro residual da regressão (s.e) e o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj})

Parâmetro	Modelos Secundários		
	Equação	s.e	R^2_{adj}
Declive (σ)			
Atmosfera	$\sigma = 14,578 - 0,4699 (\text{Extrato } \%)$	1,513	0,940
Vácuo	$\sigma = 3,545 - 0,112 (\text{Extrato } \%)$	0,419	0,920
Redução 1 log (t_{1log}) [dia]			
Atmosfera	$t_{1log} = 20,333 - 0,595 (\text{Extrato } \%)$	0,041	0,999
Vácuo	$t_{1log} = 10,504 - 0,384 (\text{Extrato } \%)$	0,543	0,986

Como se pode apreciar nas Figuras 4.9 e 4.11, os modelos secundários tiveram 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 em declive e redução decimal são explicadas pelos níveis de urucum extraídos em óleo.

Neste trabalho a contaminação com *S. aureus* foi intencional, logo a escolha por fazer análises com este microrganismo e não com os que dadas as condições de refrigeração e vácuo conseguem-se desenvolver melhor (por exemplo a *Listeria monocytogenes*) está atrelada com a sua alta 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 tem afirmado pela primeira vez o efeito antimicrobiano *in situ* do extrato oleoso de sementes de urucum em carne bovina, e tem modelado também pela primeira vez a cinética microbiana do *S. aureus* em bifes recobertos com este extrato, e baseado nos resultados, propõe a utilização desta cobertura para se obter uma inibição ou proteção contra o patogênico além de só intensificar a cor e sabor do produto. Uma aplicação potencial e nova do extrato oleoso de urucum seria o revestimento de carnes de bovino pré-preparadas para churrasco.

4.4 Conclusão

Os resultados obtidos neste capítulo demonstram que somente a armazenagem dos bifes inoculados com *S. aureus* em temperatura de refrigeração não é suficiente para que ocorra sua inibição, sendo necessário a utilização de uma embalagem a vácuo para que em conjunto esses dois parâmetros atuem sinergeticamente para que seja alcançado um efeito bactericida contra o patógeno. O modelo de Weibull utilizado para demonstrar a sobrevivência cinética do *S. aureus* em bifes nos dois tipos de atmosfera (normal e a vácuo) indicou que o óleo de coco virgem funciona como agente antimicrobiano somente nos bifes revestidos embalados a vácuo, uma vez que para os que foram armazenados em atmosfera normal não foi encontrado nenhuma redução ao longo dos 14 dias de experimento.

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 patogênico. Ao comparar os dois tipos de acondicionamento, uma maior efetividade foi encontrada quando os bifés revestidos com o extrato foram embalados à vácuo dos que os embalados em atmosfera normal. A capacidade de inibição foi gradativa, ou seja, quanto maior a concentração do extrato, maior foi seu poder bactericida. *S. aureus* em carnes embaladas em atmosfera normal apresentou uma resistência inicial à inativação, o qual manifestou-se como uma fase de “ombro” nas curvas cinéticas de sobrevivência – a exceção das carnes revestidas com extrato de urucum ao 30%. Em oposição, *S. aureus* em carnes acondicionadas embaladas a vácuo sofreram uma inativação quase imediata, o qual se refletiu na concavidade das curvas de sobrevivência. Contudo, embora a extração oleosa de 30% de urucum produziu no *S. aureus* uma inativação muito acentuada nos primeiros dias de estocagem, após um determinado tempo, o extrato não foi capaz de o inibir mais; o que pode sugerir o desenvolvimento de certa adaptação deste patogênico ao agente antimicrobiano.

Face ao crescente interesse no desenvolvimento de antimicrobianos naturais eficazes, o extrato oleoso de urucum apresenta-se como um antimicrobiano promissor que pode ser aplicado como cobertura 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*.

4.5 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.
- Álvarez, I., Pagán, R., Raso, J., & Condón, S. (2002). Environmental factors influencing the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Letters in Applied Microbiology*, 35(6), 489-493.
- Arruda, M. O. (2016). *Atividade antimicrobiana e anti-inflamatória de produtos naturais sobre patógenos respiratórios*. Tese de doutorado, Universidade Federal do Maranhão. Disponível: <https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/1658>. Acessado: 11 de abril de 2020.
- Aziz, M., & Karboune, S. (2015). Natural antimicrobial/antioxidant agents in meat and poultry products as well as fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(3), 486-511.

- 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.
- Božik, M., Hovorková, P., & Klouček, P. (2018). Antibacterial effect of carvacrol and coconut oil on selected pathogenic bacteria. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 49(1), 46-52.
- Chaves, R. D. (2010). *Avaliação microbiológica e do potencial de estufamento por bacterias acido lacticas e enterobacterias em cortes bovinos embalado a vacuo*. Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas. Disponível: http://taurus.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/255385/1/Chaves_RafaelDjalma_M.pdf. Acessado 11 de abril de 2020.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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).
- EFSA (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12), 5500.
- Fellows, P. J. (2018). Tecnologia do processamento de alimentos-princípios e prática. In Nitzke J. A (Eds), *Resfriamento*. Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Fernández, A., Salmeron, C., Fernández, P., & Martinez, A. (1999). Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science & Technology*, 10(4-5), 158-162.
- Galindo-Cuspinera, V., Westhoff, D. C., & Rankin, S. A. (2003). Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage microorganisms. *Journal of Food Protection*, 66(6), 1074-1078.
- Gil, M., Brandão, T. R., & Silva, C. (2004). Modelling microbial inactivation kinetics under time-varying temperature conditions. International Conference Engineering and Food. Disponível: https://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/5668/1/trab-int_2004_ESB_239_Brand%c3%a3o_Teresa_32.pdf. Acessado 11 de abril de 2020.

-
- 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.
- Hansson I.B. (2001). Microbiological meat quality in high- and low-capacity slaughterhouse in Sweden. *Journal of Food Protection*, 64(6), 820-825.
- Hoffmann, F. L. (2001). Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. *Brasil Alimentos*, 9(1), 23-30.
- Hovorková, P., Laloučková, K., & Skřivanová, 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.
- 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). DOI:10.1088/1742-6596/1244/1/012045.
- Jansen, P. C. M. (2005). *Bixa orellana* L. In Jansen, P. C. M.; Cardon, D. (eds.). PROTA 3: Dyes and tannins/Colorants et tanins. Wageningen: *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*, Colombia, 70(1), 8091-8098.
- 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* 2011, 70(4), 528-533.
- Miller, F. A., Gil, M. M., Brandão, T. R., & Silva, C. L. (2004). A microbiologia preditiva como instrumento da garantia da segurança de produtos alimentares. Disponível: <https://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/5933/3/A%20Microbiologia%20Preditiva%20como%20Instrumento%20da%20Garantia.pdf>. Acessado 11 de Abril de 2020.
- 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.
- 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.
- 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*, 2019.
- 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.

-
- 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.
- Saraiva, C., Fontes, M. d. C., Patarata, L., Martins, C., Cadavez, V., & Gonzales-Barron, U. (2016). Modelling the kinetics of *Listeria monocytogenes* in refrigerated fresh beef under different packaging atmospheres. *Food Science and Technology*, 66, 664-671.
- 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.
- Silva, R. B., Almeida, C. R., Chavasco, J. M., & Chavasco, J. K. (2010). Avaliação da atividade antimicobacteriana ea determinação da CIM de extratos hidroalcoólicos liofilizados de *Bixa orellana* L., *Bixaceae*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(2), 171-174.
- Tamil 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.
- 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-12ª Edição. In Fonseca, F. G., Frazzon, A. P. G., & Frazzon, J (Eds), *Microbiologia industrial e aplicada*. 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.
- Van Cuong, T., & Chin, K. B. (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.
- Virto, R., Sanz, D., Álvarez, I., Condon, S., & Raso, J. (2006). Application of the Weibull model to describe inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by citric and lactic acid at different temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(6), 865-870.
- Warth, A. D. (1989). Transport of benzoic and propanoic acids by *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology*, 135(5), 1383-1390.
- 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), 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.
- 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.
- 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.

5 CONCLUSÃO GERAL

Na indústria alimentar, o urucum é utilizado somente como um corante, mesmo que já tenha sido comprovado cientificamente que os extratos obtidos das suas sementes desempenham função antimicrobiana. Entretanto, com o passar dos anos e pela mudança dos hábitos da população, as empresas do setor alimentar estão sendo obrigadas a desenvolver produtos mais saudáveis; e a substituição dos conservantes sintéticos pelos naturais surge como uma alternativa economicamente viável para essa mudança na composição dos alimentos. Deste modo, revela-se interessante a utilização dos extratos obtidos das sementes de urucum como conservante natural em alimentos que são consumidos em larga escala pela maioria da população.

Atualmente, não existem muitos estudos que tenham investigado o melhor solvente para a obtenção de um extrato de urucum, com maiores concentrações de carotenoides e de compostos fenólicos, ou trabalhos que testem algum extrato oleoso como um revestimento superficial em produtos alimentares de alta perecibilidade e sujeitos à contaminação microbiana, como é a carne. Assim, esta tese de investigação teve por objetivo preencher este vazio na investigação da comunidade científica de qualidade alimentar.

Neste trabalho, realizamos um estudo de meta-análise da capacidade antimicrobiana *in vitro* dos extratos de folhas e sementes de *Bixa orellana* L., realizados em diversas zonas geográficas, e extraídos por diferentes métodos e pela utilização de diversos solventes sobre o *Staphylococcus aureus*. Além da caracterização, mediante modelos primários e secundários de microbiologia preditiva, foi estudada a cinética da sobrevivência do *S. aureus* durante o período de refrigeração de bifes de carne bovina revestidos com extrato oleoso de sementes de urucum, embalados em atmosfera normal e a vácuo.

Pode-se afirmar que este trabalho possibilitou o entendimento do comportamento do *S. aureus* na presença de antimicrobianos através da utilização do modelo não linear de Weibull. Os extratos oleosos de sementes de urucum possuem clara atividade bactericida contra *S. aureus*, e a inativação é tanto maior quanto maior for a dose utilizada. Este patógeno foi capaz de sobreviver à temperatura de refrigeração de 5°C, quando os bifes estiveram expostos ao oxigênio,

enquanto o óleo de coco somente inibiu *S. aureus* nos bifes embalados a vácuo embora lentamente. No entanto, a ausência de oxigênio e o extrato de urucum tiveram um efeito sinérgico na inativação do *S. aureus*, sendo que com um revestimento de extrato de urucum ao 30%, a primeira redução decimal nos bifes foi atingida em ~10 horas na ausência de oxigênio, em contraste com 2,5 dias na presença de oxigênio. O extrato de sementes de urucum em óleo de coco apresenta-se como um antimicrobiano promissor que pode ser aplicado como cobertura de carne de bovino *in natura* para o controle do *S. aureus*.

6 TRABALHOS FUTUROS

A meta-análise pode ser utilizada como ferramenta para a realização de novas investigações, em que se sintetiza a susceptibilidade microbiana *in vitro* de diversos extratos de plantas que também possuem atividade antimicrobiana, em que pode-se definir um microrganismo de estudo ou realizar de forma abrangente para patógenos alimentares.

São necessárias mais pesquisas sobre a capacidade inibitória *in vitro* do óleo de coco contra bactérias pois os resultados na literatura são muito controversos. Além do mais, a avaliação da sua eficiência precisa ser testada em produtos alimentares, esta dissertação é a única até ao momento que realizou esse tipo de experiência.

Em relação a concentração do extrato oleoso de urucum é necessário a realização de novos ensaios de carne embalada a vácuo em que se utilizem concentrações maiores de 30% com a finalidade de avaliar se *S. aureus* adquire resistência, uma vez que neste trabalho a partir de determinado tempo de acondicionamento a concentração de 30% não conseguiu mais inibir o crescimento do patógeno presente nas amostras de carne.

Novos ensaios podem ser feitos utilizando o extrato oleoso de urucum como um ingrediente, por exemplo, no preparo de almôndegas e avaliar o seu efeito antimicrobiano contra *S. aureus* ou contra outros microrganismos. Através da microbiologia preditiva pode-se realizar a caracterização do comportamento cinético deste patógeno ou outros, e comparar os resultados com os que foram obtidos nesta dissertação com a finalidade de analisar se este extrato tem maior efetividade quando aplicado como revestimento ou na forma de ingrediente. Em ambas formas de aplicação, poderá ser testado se o extrato de urucum apresenta um efeito antioxidante para lipídeos e pigmentos.

Outro ponto importante é avaliar as características visuais e sensoriais desta carne *in natura* na forma de carne pré-preparadas para churrasco. Seria preciso caracterizar como o extrato oleoso de urucum intensifica o sabor e a cor do alimento, e se constituem um fator para a decisão de compra por parte do consumidor.