

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



**Dissertação**

**Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando nanoemulsão de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e extrato de beterraba (*Beta vulgaris* L.)**

**Tamires Soares Schug**

Bacharela em Química de Alimentos

Pelotas, julho de 2023

TAMIRES SOARES SCHUG

**Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando nanoemulsão de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e extrato de beterraba (*Beta vulgaris* L.)**

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

**Comitê de orientação**

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra (orientador)  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Carla Rosane Barboza Mendonça  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Tatiane Kuka Valente Gandra

Pelotas, julho de 2023.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação da Publicação

S383d Schug, Tamires Soares

Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando nanoemulsão de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e extrato de beterraba (*Beta vulgaris* L.) [recurso eletrônico] / Tamires Soares Schug ; Eliezer Avila Gandra, orientador ; Carla Rosane Barboza Mendonça, Tatiane Kuka Valente Gandra, coorientadoras. — Pelotas, 2023.  
130 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Produtos cárneos. 2. Nanotecnologia. 3. Nanopartículas. 4. Oxidação lipídica. 5. Betalaínas. I. Gandra, Eliezer Avila, orient. II. Mendonça, Carla Rosane Barboza, coorient. III. Gandra, Tatiane Kuka Valente, coorient. IV. Título.

CDD 641.1

Tamires Soares Schug

Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando nanoemulsão de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e extrato de beterraba (*Beta vulgaris* L.)

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 26 de julho de 2023

Banca examinadora:

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra (Orientador)  
Doutor em Ciência e tecnologia agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof.<sup>a</sup> Dra. Elessandra da Rosa Zavareze  
Doutora em Engenharia e ciência dos alimentos pela Universidade federal do Rio grande.

Dra. Marjana Radünz  
Doutora em ciência e tecnologia de alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a Deus e minha mãe Iemanjá pois sem fé e esperança nada seria possível.

A Universidade Federal de Pelotas e o programa de pós-graduação em Nutrição e Alimentos por me permitir fazer o mestrado e ser meu lar durante estes dois anos.

Aos meus pais Cleber e Tania, e minha irmã Gabriele, que sempre me apoiaram durante todo meu período torceram por minhas vitórias.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eliezer Gandra, por toda ajuda durante este período, por me motivar e incentivar a seguir em frente.

As minhas coorientadoras Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Gandra e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Mendonça, por toda ajuda, principalmente a Prof<sup>a</sup> Carla por me acolher e sempre estar disposta a me ajudar.

Ao Prof. Mariano Michelin, por ceder seu tempo e laboratório para preparação das nanoemulsões, além de toda ajuda durante este período.

Aos meus colegas do laboratório LACABIM, pela amizade e companheirismo ao longo deste período.

Aos meus colegas do laboratório LAIMPPA, por me acolherem e me fazerem sentir parte da equipe, por toda ajuda e apoio durante o período que estive com vocês.

As minhas amigas Larissa e Lilia, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando, me dando apoio e torcendo por mim.

E a todos outros amigos, colegas e parceiros que conquistei durante estes dois anos de mestrado, que de alguma forma me ajudaram a concluir mais esta etapa.

## Resumo

SCHUG, Tamires Soares. **Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando nanoemulsão de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e extrato de beterraba (*Beta Vulgaris* L.).** Universidade Federal de Pelotas. 2023. 129p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

Os embutidos cárneos são produtos suscetíveis a deterioração microbiana. O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) possui forte atividade inibitória contra muitos patógenos de origem alimentar e bactérias deteriorantes. Porém, quando utilizado diretamente nos alimentos, pode interferir negativamente nas características sensoriais dos produtos. Desta maneira, sua encapsulação torna-se uma alternativa, dentre os métodos destacam-se as nanoemulsões, para melhorar sua utilização, dispersão e estabilidade. O extrato de beterraba é uma boa alternativa para substituição de corantes artificiais. Neste contexto, objetivou-se avaliar o efeito da utilização conjunta de nanoemulsões com óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba em embutidos cárneos para manutenção das características sensoriais e microbiológicas e para redução parcial ou total do uso de nitrato e nitrito de sódio. Primeiramente, elaborou-se as nanoemulsões de óleo essencial de tomilho (NEOT), e testou-se a atividade antimicrobiana, também foi elaborado o extrato de beterraba e analisado, posteriormente foram elaborados embutidos cárneos com NEOT 5% e extrato de beterraba desidratado, sendo utilizadas três formulações (Com mix de conservantes, redução de 50% do mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado e sem mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado) que foram avaliadas em relação a presença de bactérias, características físicas e sensoriais. Foi possível observar a atividade antimicrobiana e inibitória da nanoemulsão de óleo essencial de tomilho 5% frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Houve um aumento no teor de umidade e de acidez dos embutidos durante o

armazenamento para as formulações com NEOT e extrato de beterraba desidratado. Os embutidos formulados com adição de NEOT e extrato de beterraba apresentaram baixos níveis de produtos de oxidação primário e a secundário durante o armazenamento e a adição do extrato de beterraba intensificou a coloração das embutidos frescas. Na análise sensorial, os embutidos tiveram uma boa aceitação do consumidor. Considerando os resultados obtidos, pode-se concluir que o uso conjunto de NEOT e extrato de beterraba desidratado mostrou potencial para substituição de nitrato e nitrito em embutidos cárneos.

**Palavras-chaves:** Produtos cárneos; nanotecnologia; nanopartículas; oxidação lipídica; betalaínas.

## Abstract

SCHUG, Tamires Soares. **Development of meat sausage using nanoemulsion of thyme essential oil (*Thymus vulgaris* L.) and beet extract (*Beta Vulgaris* L.)**. 2023. 129p. Dissertation (Master in Nutrition and Food) – Graduate Program in Nutrition and Food, Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2023.

Meat sausages are products susceptible to microbial deterioration. Thyme essential oil (*Thymus vulgaris* L.) has strong inhibitory activity against many foodborne pathogens and spoilage bacteria. However, when used directly in food, it can negatively interfere with the sensory characteristics of the products. In this way, its encapsulation becomes an alternative, among the methods nanoemulsions stand out, to improve its use, dispersion and stability. Beetroot extract is a good alternative for replacing artificial dyes. In this context, the objective was to evaluate the effect of the joint use of nanoemulsions with thyme essential oil and beetroot extract in meat sausages to maintain the sensory and microbiological characteristics and to partially or completely reduce the use of sodium nitrate and nitrite. First, the thyme essential oil nanoemulsions (NEOT) were prepared, and the antimicrobial activity was tested, the beet extract was also prepared and analyzed, later meat sausages were prepared with NEOT 5% and dehydrated beet extract, being Three formulations were used (with a mix of preservatives, a 50% reduction in the mix of preservatives and the addition of NEOT and dehydrated beet extract and without a mix of preservatives and the addition of NEOT and dehydrated beet extract) which were evaluated for the presence of bacteria , physical and sensorial characteristics. It was possible to observe the antimicrobial and inhibitory activity of the 5% thyme essential oil nanoemulsion against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. There was an increase in the moisture content and acidity of sausages during storage for formulations with NEOT and dehydrated beetroot extract. Sausages formulated with the addition of NEOT and beetroot extract showed low levels of primary and secondary oxidation products during storage and the addition of beetroot extract intensified the color of fresh sausages. In the sensory analysis, the sausages had

good consumer acceptance. Considering the results obtained, it can be concluded that the combined use of NEOT and dehydrated beet extract showed potential for replacing nitrate and nitrite in meat sausages.

**Keywords:** Meat products; nanotechnology; nanoparticles; lipid oxidation; betalains.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de literatura

Figura 1	Sistema de nanoemulsão -----	26
----------	------------------------------	----

### Artigo

Figura 1	Gráfico de intensidade relativa por diâmetro de partícula da nanoemulsão de óleo essencial de tomilho -----	97
Figura 2	Gráfico de comparação de medias de bactérias mesófilas aeróbicas (Log.UFC.g <sup>-1</sup> ) com relação ao tempo de armazenamento e as diferentes formulações -----	101
Figura 3	Gráfico de comparação de umidade com relação ao tempo de armazenamento e as diferentes formulações -----	103
Figura 4	Gráfico de comparação do índice de acidez com relação ao tempo de armazenamento e as diferentes formulações -----	104
Figura 5	Gráfico de comparação do índice de p-anisidina em relação ao tempo de armazenamento e as formulações -----	105
Figura 6	Gráfico de comparação do coeficiente de extinção específica em relação ao tempo de armazenamento e as formulações -----	105
Figura 7	Gráfico de comparação de medias de luminosidade das diferentes formulações ao longo do tempo de armazenamento -----	107
Figura 8	Gráfico de comparação de medias de Vermelhão das diferentes formulações ao longo do tempo de armazenamento -----	108
Figura 9	Gráfico de comparação de medias de amarelamento das diferentes formulações ao longo do tempo de armazenamento -----	108
Figura 10	Teste de intenção de compra para embutidos frescos bovina com adição de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba -----	110

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Formulações das nanoemulsões de óleo essencial de tomilho -----	86
Tabela 2	Ingredientes utilizados na formulação do embutido cárneo com três formulações diferentes -----	88
Tabela 3	Atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho e das nanoemulsões de óleo essencial de tomilho por meio da técnica de difusão em ágar, CMI e CBM -----	95
Tabela 4	Análise físico-química do extrato de beterraba líquido e desidratado -----	98
Tabela 5	Medias das contagens de bactérias mesófilas aeróbias em três formulações de embutidos frescais bovinas em diferentes tempos de armazenamento a 7°C -----	100
Tabela 6	Resultados da análise de variância do teste de ordenação múltipla das embutidos frescais bovina -----	109

## Lista de abreviações

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mês	Microemulsões
NEs	Nanoemulsões
OEs	Óleos Essenciais
NEOT	Nanoemulsão de óleo essencial de tomilho
OT	Óleo essencial de tomilho
CIM	Concentração inibitória mínima
CBM	Concentração bacteriana mínima

## Sumário

1. Introdução .....	13
2. Objetivos.....	16
2.1 Objetivo Geral .....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. Hipóteses.....	17
4. Revisão bibliográfica.....	18
4.1 <b>Microrganismos nos produtos cárneos e a necessidade de conservantes</b> 18	
4.1.1 <b><i>Salmonella spp.</i></b> .....	19
4.1.2 <b><i>Escherichia coli</i></b> .....	20
4.1.3 <b><i>Listeria monocytogenes</i></b> .....	21
4.2 <b>Óleos essenciais, atividade antimicrobiana e aplicabilidade em</b> <b>produtos cárneos</b> .....	21
4.2.1 <b>Óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)</b> .....	24
4.3 <b>Nanotecnologia</b> .....	25
4.4 <b>Extrato de beterraba</b> .....	27
4.5 <b>Análise sensorial de alimentos</b> .....	29
5. Projeto de pesquisa.....	30
6. Relatório de campo.....	77
7. Artigo.....	78
8. Considerações finais.....	117

## 1. Introdução

Os embutidos cárneos, dependendo do tipo, podem apresentar como características alta atividade de água, teor de gordura relativamente alto, estrutura cominutiva das matérias-primas e falta de processamento térmico, podendo tornar esses produtos muito suscetíveis a deterioração microbiana (ŠOJIC et al., 2018). Os conservantes químicos sintéticos podem ser usados para a conservação destes produtos, inibindo o crescimento microbiano. Comumente são usados os sais de cura constituídos por nitritos e/ou nitratos de sódio, que além da conservação são responsáveis pela alteração de características sensoriais, tornando mais atrativo o produto para o consumidor, suas vantagens incluem a formação de cores de cura exclusivas, promoção do sabor e potencial antioxidante (PAPADOCHRISTOPOULOS et al., 2021).

Apesar destas vantagens, os sais de cura, em determinadas situações, podem gerar alguns riscos à saúde, recebendo atualmente respostas negativas dos consumidores que exigem alternativas mais seguras, que buscam produtos com ingredientes naturais que possam sustentar os padrões de segurança microbiológica. As nitrosaminas e outros produtos de reação formados a partir de nitrito e nitrato foram associados ao aumento do risco de câncer pela Organização Mundial de Saúde. Em vista disso, são necessárias alternativas para substituição parcial ou total do nitrato e nitrito em produtos alimentícios, por substâncias que apresentem alta estabilidade e eficiência antimicrobiana (PAPADOCHRISTOPOULOS et al., 2021; WANG et al., 2018).

Apesar destas vantagens, os sais de cura, em determinadas situações, podem gerar alguns riscos à saúde, recebendo atualmente respostas negativas dos consumidores que exigem alternativas mais seguras, que buscam produtos com ingredientes naturais que possam sustentar os padrões de segurança microbiológica. As nitrosaminas e outros produtos de reação formados a partir de nitrito e nitrato foram associados ao aumento do risco de câncer pela Organização Mundial de Saúde. Em vista disso, são necessárias alternativas para substituição parcial ou total do nitrato e nitrito em produtos alimentícios, por substâncias que apresentem alta estabilidade e eficiência antimicrobiana (PAPADOCHRISTOPOULOS et al., 2021; WANG et al., 2018).

A utilização de substâncias bioativas como óleos essenciais, surge como uma alternativa para substituição aos aditivos químicos sintéticos (CHEN et al., 2023; FALLEH et al., 2020). O tomilho (*Thymus vulgaris L.*) têm sido amplamente utilizados nas áreas alimentícia, médica e cosmética devido ao seu odor e sabor agradáveis e possuir forte atividade inibitória contra muitos patógenos de origem alimentar ou bactérias deteriorantes, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*. Este efeito antibacteriano está relacionado principalmente a presença de timol, que atua na membrana citoplasmática da célula bacteriana. Além do timol o óleo essencial apresenta outros monoterpênicos como carvacrol, b-cariofilos, c-terpineol, e p-cimeno (HUSSEIN et al., 2021; ALMASI et al., 2021; FRAQUEZA et al., 2021; LIU & LIU, 2020).

A incorporação de óleo essencial puro diretamente em produtos alimentícios como os produtos cárneos é dificultada pela interação dos componentes do óleo com a matriz alimentar, além de serem comumente instáveis e sensíveis a fatores extrínsecos como, temperatura, luz e pH. Outra limitação é o seu forte odor e sabor que é transferido para o alimento, principalmente quando se utiliza altas concentrações de óleo essencial para atingir o efeito inibitório satisfatório, causando diminuição na aceitação pelos consumidores, sendo assim necessário utilizar outras estratégias para aplicação do mesmo em alimentos (SILVA et al., 2021; SAMPAIO et al., 2022). Em vista disso, a encapsulação de óleos essenciais tem sido investigada como uma estratégia de aplicação, em que novos sistemas de liberação são utilizados como veículos para incorporação, transporte, proteção e liberação controlada de compostos bioativos, assim melhorando sua utilização, dispersão e estabilidade (GARAVAND et al., 2021).

Entre as abordagens de encapsulamento as nanoemulsões se destacam como sendo apropriados para utilização na indústria de alimentos. As nanoemulsões (NEs) são sistemas coloidais, cineticamente estáveis, sua formação requer alta energia mecânica. Sendo considerada uma emulsão óleo/água com tamanho médio de gotícula que varia de 50 a 1000 nm necessitam de baixas concentrações de surfactantes para sua formulação (ALMASI et al., 2021). Podendo ser facilmente incorporadas em matrizes

alimentares, podendo ser empregadas no processamento de carnes, onde podem ser utilizados como revestimento ou como ingrediente no preparo de embutidos cárneos (GARAVAND et al., 2021; OJEDA-PIEDRA et al.; 2022).

A utilização de substâncias que promovam a cor em produtos cárneos é de extrema importância, já que a cor é um dos principais atributos notados pelos consumidores na hora da compra e está diretamente relacionada com a aceitação do produto. Atualmente o uso de corantes artificiais não é desejado pela maioria dos consumidores, que buscam cada vez mais ingredientes naturais. Além de que a utilização de certos corantes artificiais, em determinadas situações, pode ocasionar em doenças, como hiperatividade em crianças e até problemas carcinogênicos. Neste contexto, a utilização de corantes naturais tem sido amplamente estudada visando a aplicação em alimentos. Dentre os corantes naturais destaca-se o presente na beterraba, sendo um dos mais utilizados na indústria de alimentos por ser de fácil extração e conter um alto poder de coloração (LAGES et al., 2021; MEIRELES et al., 2020).

O extrato de beterraba é uma boa alternativa para utilização em produtos cárneos, sendo que as betalainas são pigmentos nitrogenados encontrados em abundância neste extrato. São compostos hidrossolúveis, derivadas do ácido betalâmico, obtidas através da extração aquosa da beterraba vermelha triturada. Podendo ser classificadas em betacianinas, responsáveis pela coloração vermelho-violeta e em betaxantinas, de coração vermelho-alaranjado, porém em menor proporção (BELLUCCI, 2018; MEIRELES et al., 2020).

Diante do exposto, acredita-se que a adição conjunta de nanoemulsões de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba em substituição aos sais de cura, represente uma alternativa natural viável para a produção de embutidos cárneos, propiciando a manutenção das características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da utilização conjunta de nanoemulsões com óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba em embutidos cárneos para manutenção das características sensoriais e microbiológicas e para redução parcial ou total do uso de nitrato e nitrito de sódio.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Obter e avaliar físico-quimicamente extrato de beterraba;
- Desenvolver nanoemulsões o/a com óleo essencial de tomilho;
- Desenvolver embutidos cárneos adicionados de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e de extrato de beterraba, com redução total ou parcial de nitrato e nitrito de sódio;
- Avaliar o efeito da adição de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e de extrato de beterraba nas características microbiológicas e físico-químicas de embutidos carneos durante o armazenamento a temperatura de 7 °C.
- Avaliar a aceitabilidade sob o ponto de vista sensorial dos produtos elaborados.

### **3. Hipóteses**

A adição conjunta de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho com extrato de beterraba em embutidos cárneos inibe o desenvolvimento de *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Aeróbios mesófilos* e *Listeria monocytogenes* e proporciona cor adequada aos produtos, permitindo assim a redução parcial ou total de nitrito e nitrato de sódio.

O emprego do óleo essencial de tomilho na forma de nanoemulsões de o/a diminui a intensidade do sabor e do aroma do óleo essencial, minimizando alterações nas características sensoriais dos embutidos elaborados, proporcionando maior aceitação do produto pelo consumidor.

## **4. Revisão bibliográfica**

### **4.1 Microrganismos nos produtos cárneos e a necessidade de conservantes**

Os produtos cárneos por terem alto teor de água, pH próximo a neutralidade e elevada presença de nutrientes são considerados ambientes favoráveis para o crescimento e multiplicação de microrganismos. A capacidade de microrganismos de se desenvolverem está diretamente relacionada com diversos fatores, sendo divididos em fatores intrínsecos, relacionados com as características próprias do alimento, como pH, composição química, umidade e potencial de oxido-redução e fatores extrínsecos, relacionados ao ambiente em que o alimento está presente, como umidade relativa do ar, temperatura, presença de gases no ambiente e substâncias adicionadas para reduzir ou inibir multiplicação de microbiana (SOARES et al., 2021).

Nitratos e nitritos de sódio são usados para inibição microbiana, além de proporcionarem propriedades sensoriais específicas para o produto, como cor e aroma característicos, podendo ainda ser chamados de “sais de cura”. Sendo um dos seus principais efeitos é o aumento da vida útil dos produtos cárneos. Várias das alterações vistas na carne curada se dão através da reatividade do óxido nítrico (NO) com mioglobina e aminoácidos presentes na carne. Dentre as substâncias que podem ser geradas através do nitrito estão as N-nitrosaminas, que são as mais preocupantes, principalmente pelo fato que alguns estudos indicam o potencial carcinogênico destas substâncias. As nitrosaminas são formadas através da reação de nitrosação do nitrito, gerando o íon nitrosilo (NO<sup>+</sup>) que irá reagir com aminas secundárias não protonadas através de uma reação de substituição nucleofílica. Dentre as condições que favorecem sua formação, incluem-se altas temperaturas, pH ácido (2,5-3,5), presença de amina protonada, elevada quantidade e nitrito residual e maior tempo de armazenamento (FLORES & TOLDRÁ, 2021)

Segundo a RDC nº 272, de 14 de março de 2019, o limite máximo de nitrito de potássio em carnes e produtos cárneos é de 0,015g/100g, enquanto para nitrato de sódio o limite é de 0,03g/100g. A soma dos nitritos e nitratos,

determinados como resíduo máximo, não deve superar 0,015g/100g expresso como nitrito de sódio (BRASIL, 2019).

A instrução normativa nº 4, de 31 de março de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento define como embutido o produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionados ou não de tecidos adiposos, ingrediente, embutidos em envoltório natural ou artificial, e submetido ao processo tecnológico adequado. De acordo com a tecnologia empregada na fabricação pode se caracterizar como um produto fresco, seco, curado e/ou maturado, cozido (BRASIL, 2000).

Dentre os produtos cárneos, destacam-se os do tipo embutido frescal devido a sua alta aceitação e comercialização, além de ser um produto de fácil fabricação, entretanto este produto pode ser facilmente contaminado, quando produzido ou comercializado sem os cuidados higiênicos necessários (LAGES et al., 2021; SOARES et al., 2021). Esse tipo está entre os produtos cárneos mais consumidos pela população brasileira, sendo um produto embutido cru, que não sofre nenhum processo de cozimento durante sua produção. Deste modo, o prazo de validade deste tipo de produto é limitado e deve ser mantido em temperatura de refrigeração. A produção de embutidos frescais abrange várias etapas de manipulação do produto, falhas nas boas práticas de fabricação durante a etapas de processamento pode aumentar significativamente as chances de contaminação por microrganismos (PAVALQUESI et al., 2021; SOARES et al., 2021).

A instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019, estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Para embutidos frescais devem-se analisar os seguintes microrganismos, *Salmonella*, *Escherichia coli*, Aeróbios mesófilos e *Listeria monocytogenes* (BRASIL, 2019).

#### **4.1.1 *Salmonella* spp.**

*Salmonella* é uma bactéria que está amplamente distribuída na natureza, podendo habitar o trato intestinal dos humanos, animais domésticos e selvagens, principalmente as aves. Sendo uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, são gram-negativas, anaeróbia facultativas, na forma de bastonetes e podem ser móveis ou imóveis por flagelos. As carnes, o leite e os

ovos são os principais veículos de transmissão, sendo que a *S. entérica* é considerada a espécie mais patogênica. Além disto, podem sobreviver em produtos alimentícios de baixa umidade e conterem temperatura ótima de crescimento de 38°C (EHUWA et al., 2021; WANG et al., 2020).

A salmonelose é uma das principais infecções transmitidas pelo consumo de alimentos contaminados, incluindo as carnes e produtos cárneos, sendo seus efeitos observados somente quando é ingerida a bactéria na sua forma viável. A cepa específica responsável pela infecção e o estado de saúde do hospedeiro são os fatores que influenciam o grau de gravidade da infecção. Dependendo da espécie envolvida, as infecções por *Salmonella* podem-se manifestar em diferentes sintomas como, febre entérica (febre tifoide) em que os sintomas mais comuns incluem perda de forças, dores de cabeça e febre alta e persistente e enterocolite onde os sintomas envolvem vômito, diarreia, febre, náuseas e dores abdominais (EHUWA et al., 2021; WANG et al., 2020).

#### **4.1.2 *Escherichia coli***

São bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, gram-negativas, na forma de bastonetes, capazes de fermentar a lactose, com produção de ácido e de gás e temperatura ótima de crescimento de 37°C, sendo o trato intestinal dos humanos e outros animais de sangue quente o seu principal *habitat*. A maioria das cepas de *E. coli* são consideradas inofensivas, porém algumas causam doenças que podem ser transmitidas por alimentos. As principais infecções causadas por *E. coli* estão relacionadas a 5 sorogrupos: *E. coli enteropatogênica* (EPEC) que tem capacidade de colonizar o intestino onde causa lesões nas microvilosidades, *E. coli enterotoxigenica* (ETEC) sendo a maior responsável por diarreias em crianças, com capacidade de produzir toxinas, *E. coli enteroinvasiva* (EIEC) podendo se desenvolver na mucosa do cólon, invadindo as células epiteliais, multiplicando-se e causando uma úlcera no intestino, *E. coli enterohemorrágica* (EHEC) pode colonizar o trato intestinal e produzir verotoxinas, que são ativadas no cólon, podendo originar casos graves com diarreia hemorrágica e *E. coli enteroagregativa* (EaggEC). *E. coli* pode ser considerada um indicador higiênico-sanitário dentro do processamento de

alimentos devido a sua origem intestinal, sendo indício de contaminação fecal direta ou indireta (CAVALIN et al., 2018; LUI et al., 2020).

#### **4.1.3 *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* é amplamente encontrada na natureza, está presente no solo, água, vegetais e animais. É uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, pertencente à família *Listeriaceae* e as células têm a forma de pequenos bastonetes e a sua mobilidade é conferida por flagelos, como faixa de temperatura ótima para crescimento de 30-37°C. Ainda, podem formar biofilmes e sobreviver a condições adversas, apresentam viabilidade em uma ampla faixa de temperatura, incluindo a de refrigeração, porém, são inativadas pelo processo de pasteurização. Os alimentos mais propícios a contaminação são carnes, queijos macios, leite cru, produtos lácteos, água, vegetais crus, peixes e frutos do mar. A listeriose é a infecção causada por *Listeria monocytogenes*, podendo apresentar sintomas leves como vômito, diarreia, dores de cabeça, em casos mais graves podem causar meningite aguda infecciosa, principalmente em pessoas imunodeprimidas, gestantes e idosos, com alto índice de mortalidade nestes grupos de risco (JORDAN et al., 2018).

#### **4.2 Óleos essenciais, atividade antimicrobiana e aplicabilidade em produtos cárneos**

Os óleos essenciais (OEs) são compostos presentes nas plantas aromáticas e medicinais, sendo voláteis e líquidos incolores em temperatura ambiente. São originados do metabolismo especializado de plantas aromáticas, sendo capazes de serem sintetizados em flores, brotos, sementes, caules e frutos, praticamente quase todos os órgãos, e armazenados em células epidérmicas, cavidades e células secretoras. Geralmente os OEs equivalem a uma fração pequena da composição total da planta, aproximadamente menos de 5% de matéria seca. Desde sua descoberta, os OEs são amplamente utilizados em várias áreas, tais como em cosméticos, na agricultura, nos produtos de limpeza, na aromaterapia, na indústria de alimentos, entre outros. Isso se dá pelo fato de que os OEs exibem uma ampla gama de atividades

biológicas, abrangendo propriedades antibacteriana, antiviral, antifúngica, antioxidante, antimicótica, antiparasitária e inseticida. Além de possuírem vários componentes químicos bioativos, como terpeno, terpenoides e fenólicos, responsáveis pelos odores e aromas específicos que as plantas aromáticas emitem (BHAVANIRAMYA et al., 2019; FALLEH et al., 2020).

Os OEs são altamente solúveis em compostos voláteis como álcool, éter, solventes orgânicos e óleos fixos, porém pouco solúveis em água, além de possuírem índice de refração variável e uma boa atividade óptica. Os OEs são responsáveis também por algumas funções importantes nas plantas, como proteger de pragas e microrganismos e atrair insetos e polinizadores benéficos, bem como, proteger a planta de estresse causado pelo ambiente externo. Os principais constituintes dos OEs são os terpenos, que são formados pela condensação de duas ou mais unidades de isopreno, e os hidrocarbonetos, que são compostos de dois elementos básicos, átomos de carbono e hidrogênio. Os hidrocarbonetos simples são conhecidos como não terpenoides, sendo os compostos fenólicos moléculas responsáveis pelos efeitos antimicrobianos nos OEs. Encontra-se um total de mais de 3 mil tipos de OEs identificados, sendo que apenas 300 contêm importância para indústria de alimentos, os métodos mais usados para extração de OEs são hidrodestilação e a destilação a vapor (BHAVANIRAMYA et al., 2019; FALLEH et al., 2020).

O potencial antibacteriano dos OEs não está relacionado a um mecanismo específico, mas sim pode diversos, em razão da diversidade de compostos químicos presentes. De modo geral, pode-se dizer que a atividade antimicrobiana está ligada a natureza hidrofóbica do OEs, que move os lipídios presentes na membrana celular das bactérias, rompendo assim a estrutura da parede celular, tornando-a mais permeável. Esta mudança na permeabilidade da membrana acaba levando ao vazamento dos materiais celulares, e a morte da célula. Porém, existem diferentes tipos de mecanismos de atividade dos OEs nos microrganismos, sendo eles, destruição da parede celular; danos nas proteínas da membrana; coagulação do citoplasma; redução da força motriz do próton; danificação da membrana citoplasmática; aumento da permeabilidade com vazamento do conteúdo da célula; através da hidrólise de ATP e diminuição

na síntese de ATP, levando a redução do *pool* de ATP intracelular (BHAVANIRAMYA et al., 2019; FALLEH et al., 2020).

As bactérias gram-positivas são mais sensíveis a ação dos OEs do que as gram-negativas, isso devido a presença de uma camada de peptidoglicanos que fica na membrana celular das bactérias gram-positivas que facilitam a penetração dos compostos hidrofóbicos dos OEs, já nas bactérias gram-negativas a membrana externa que envolve a parede celular é composta por uma camada dupla de fosfolipídios, ligada a uma membrana interna de lipossacarídeos, que dificulta a penetração dos compostos dos OEs. A atividade antimicrobiana dos OEs está geralmente associada a compostos como eugenol, timol, alicina, carvacrol e substâncias como o linalol, sabineno, mentol, mirceno e camphene. Esses princípios ativos têm como alvo a proteína, grupos amina e hidroxilamina na membrana bacteriana, para alterar sua permeabilidade, levando à morte da bactéria (BHAVANIRAMYA et al., 2019; FALLEH et al., 2020).

Alguns fatores podem influenciar a atividade antimicrobiana dos OEs em sistemas alimentares, tais como, a microbiota contaminante (concentração e a estrutura bacteriana), a composição química e a atividade biológica dos OEs (espécie vegetal, parte da planta, tempo de colheita, condições climáticas, método de extração, secagem e armazenamento), as propriedades intrínsecas do alimento (pH, teor de proteínas, lipídios e água) e a interação dos constituintes do OEs com os constituintes do alimento (SILVA et al., 2021; FALLEH et al., 2020). Alguns estudos propuseram a incorporação de OEs como conservantes em carnes inibindo e até mesmo eliminando algumas bactérias patogênicas, OEs de cravo, coentro, tomilho ou orégano foram suficientes para inibir *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* e flora de deterioração autóctone em alguns produtos cárneos (SILVA et al., 2021; FALLEH et al., 2020).

Diversos estudos relataram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais em carnes e produtos cárneos com resultados promissores. Ghaderi-Ghahfarokhi et al. (2017) em seu estudo aplicaram óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* L.) diretamente e em nanocápsulas com quitosana em hambúrgueres e verificaram uma redução da população microbiana frente a

*S. aureus*, aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, fungos e bactérias lácticas com maior eficiência do óleo nanoencapsulado, quando comparado ao não nanoencapsulado. Já Šojić et al. (2018) avaliaram a adição de óleo essencial de coentro (*Coriandrum sativum*) em salsichas de carne suína e, em todas as concentrações testadas, contribuíram para uma diminuição na contagem total de microrganismos em placas. No estudo de Radünz et al. (2020) o óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) mostrou um efeito inibitório e bactericida *in vitro* contra *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*.

#### **4.2.1 Óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)**

*Thymus vulgaris* é uma planta aromática, medicinal, pertencente à família Lamiaceae, e à classe das dicotiledôneas, nativas dos países da bacia do Mediterrâneo ocidental, porém, atualmente é amplamente distribuída devido a sua grande variedade de uso culinário e como ervas medicinais, promovendo assim seu cultivo em diferentes regiões do mundo, usualmente, conhecida como tomilho comum. O óleo essencial de tomilho é fonte de compostos bioativos, os principais compostos fenólicos são carvacrol, timol, hidrocarbonetos monoterpeno  $\rho$ -cimeno e  $\gamma$ -terpineno. Os isômeros timol e carvacrol são os principais constituintes presentes no óleo, são responsáveis pelos efeitos antibacteriano, antifúngico e anti-helmínticos (SILVA et al., 2021; NIETO, 2020).

A utilização de óleo essencial de tomilho em alimentos como conservantes vem sendo explorada por muitos autores, devido ao seu potencial antioxidante e antimicrobiano. A adição direta de OEs de tomilho pode inibir o desenvolvimento de processo oxidativo em diversos alimentos. Alguns fatores podem influenciar na bioatividade do OEs de tomilho quando adicionados ao um determinado alimento, tais fatores incluem as condições de armazenamento do alimento, a composição e o tipo de microrganismo que pode contaminá-lo. O principal aspecto limitante para o uso de OE de tomilho nos alimentos é o desenvolvimento de características sensoriais negativas, contribuindo para um odor e sabor desagradável. Sendo de extrema importância empregar novas estratégias que visam diminuir estas limitações sensoriais, como o uso de baixas concentrações ou o preparo na forma de cápsulas ou inclusão em outros sistemas nanoestruturados (SILVA et al., 2021; NIETO, 2020).

### 4.3 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma tecnologia que permite medir, controlar e manipular materiais com dimensões em nanômetro (nm), de modo a alterar suas propriedades e funções. Consiste na caracterização, fabricação e manipulação de estrutura biológica menor que 100 nm. Na indústria de alimentos uma das principais aplicação seria no desenvolvimento de novos sistemas de liberação de compostos bioativos na nanoescala, podendo assim melhorar a biodisponibilidade, solubilidade e até mesmo os aspectos sensoriais dos compostos. Existem vários tipos de abordagens na nanotecnologia, como a preparação de nanopartículas poliméricas e lipídicas, microemulsões (MEs), nanoemulsões (NEs), nanotubos de carbono, conjugado de polímeros, entre outros (GARAVAND et al., 2021; PAVONI et al., 2020; FELÍCIO, 2020).

As NEs consistem na dispersão de dois líquidos imiscíveis, sendo um deles a fase contínua e o outro a dispersa conforme a figura 1. Existem dois tipos de sistema em emulsões, sistemas de água em óleo (a/o) em que a fase contínua é lipofílica e a dispersa hidrofílica e os sistemas de óleo em água (o/a) em que a fase contínua é hidrofílica e a dispersa lipofílica. Esta dispersão ocorre somente na presença de moléculas anfifílicas, capazes de reduzir a tensão interfacial, chamadas de surfactantes. As gotículas nas NEs são compostas por um núcleo cercado por um mono camada de surfactantes, com as caudas apolares em direção a fase lipofílica (óleo) e as cabeças polares em direção a fase aquosa. A utilização de NEs são adequados na presença de compostos lipídicos ou pouco solúveis em água, como os óleos essenciais, que requerem a dispersão em meio aquoso, assim, aumentando a biodisponibilidade e as aplicações (GARAVAND et al., 2021; PAVONI et al., 2020).

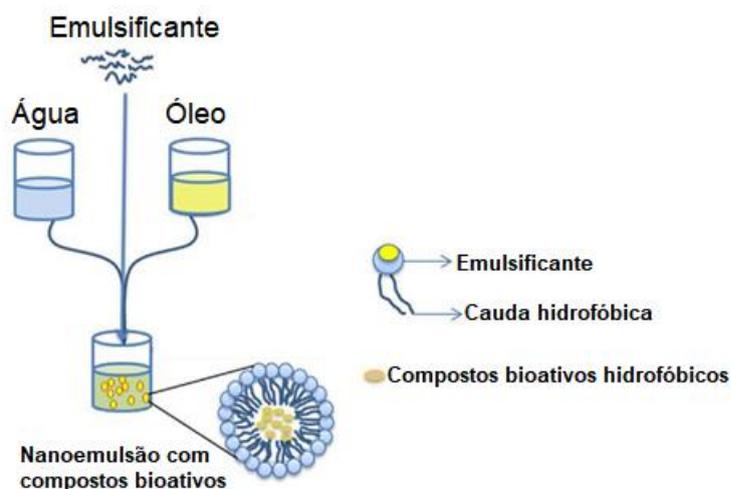


Figura 1- Sistema de nanoemulsão. Fonte: Adaptado de DAS et al., 2020.

As nanoemulsões são sistema que necessitam de energia externa para sua formação, pois as fases separadas possuem menor energia livre em comparação ao sistema coloidal, o emprego de energia externa permite ultrapassar o *gap* de energia entre as fases separadas e o sistema coloidal. Sendo consideradas cineticamente estáveis e termicamente instáveis. Apresentem gotículas esféricas que são formadas como resultado da redução da área interfacial, apresentam uma boa estabilidade e resistência à agregação de gotas e separação de fase gravitacional ou formação de creme (GARAVAND et al., 2021; PAVONI et al., 2020).

Existem duas técnicas para obtenção das NEs, os métodos de alta energia de emulsificação e métodos de baixa energia de emulsificação. Os métodos de alta energia são os mais utilizados neste sistema, são baseados na produção de energia por meio de alta pressão de cisalhamento, através de métodos como homogeneização de alta pressão, sonicação, microfluidização, utilização de ultrassom ou potencial químico dos componentes. Por outro lado, os métodos de baixa energia ocorrem a partir da inversão espontânea na curvatura do tensoativo para promover a formação dos glóbulos menores (GARAVAND et al., 2021; PAVONI et al., 2020; FELÍCIO,2020).

Os OEs são ótimas opções para obtenção de NEs, por apresentarem baixa viscosidade, baixa tensão interfacial e alta polaridade. A utilização de óleos de baixa viscosidade na formulação facilita o processo de redução de tamanho,

por necessitar de um período mais curto para sua formação, utilizando menor energia externa e gerando menores gotícula. As NEs são capazes de carregar maior quantidade de fase dispersa na presença de menor quantidade de surfactante, está baixa quantidade de surfactante garante um melhor perfil toxicológico/segurança, além de poder ser formulado com uma variedade maior de surfactantes. Os tensoativos mais utilizados para obtenção de sistemas coloidais são os polissorbatos Tween 80 e Tween 20, fornecendo suspensões estáveis sem a necessidade de um co-surfactante (GARAVAND et al., 2021; PAVONI et al., 2020).

Os principais fenômenos de instabilidade que podem levar à separação de fases são: formação de creme ou sedimentação, floculação, coalescência e amadurecimento de Oswald. A estabilidade a longo prazo pode ser influenciada pelos diferentes estados de energia livre que os sistemas de NEs contêm, dependendo da altura das barreiras de energia entre o sistema coloidal e as fases separadas, quanto mais baixas foram estas barreiras, mais rápido ocorrerá perda da estabilidade do sistema (GARAVAND et al., 2021; PAVONI et al., 2020).

O amadurecimento de Ostwald é um fenômeno que consiste na condensação e agregação de gotículas menores em gotículas maiores e energeticamente favorecidas, que com o tempo acaba causando a separação de fases, sendo impulsionado pela difusão molecular do óleo através da fase contínua. Para retardar o amadurecimento é necessário a adição de substâncias apolares e de grande volume molar, como triglicerídeos de cadeia média ou longa. Além disso, o tamanho da gota tem um papel fundamental na estabilidade, quanto menores as gotas formadas em uma ampla proporção de superfície, maior a absorção. O potencial zeta é um parâmetro eletrostático que pode indicar a estabilidade física das emulsões (GARAVAND et al., 2021; PAVONI et al., 2020).

#### **4.4 Extrato de beterraba**

As principais causas de perda de qualidade em produtos cárneos, são deteriorações químicas e microbiológicas. A oxidação lipídica é uma das reações químicas que mais ocorrem em produtos cárneos, diminuindo a vida útil e o valor

nutricional, além de refletir diretamente na descoloração do produto. Os produtos secundários formados a partir desta reação são considerados citotóxicos. Essa descoloração ocorre na superfície, é acelerada em produtos moídos ou triturados, por estarem mais expostos ao ar e à ação de microrganismos. A cor é responsável pelo primeiro estímulo de aceitação pelo consumidor, por serem atraídos pela sua coloração e considerada a característica sensorial mais importante. A utilização de corantes naturais vem sendo amplamente utilizada na indústria de alimentos (GONÇALVES, 2018; CHHIKARA et al., 2019; NOWACKA et al., 2019).

A beterraba, cujo nome científico *Beta vulgaris L.* pertence à família Quenopodiacea sendo originária de regiões europeias e norte-africanas de clima temperado. No Brasil, é cultivada principalmente nas regiões sudeste e sul e sua parte comestível é uma raiz tuberosa de formato globular e sabor acentuadamente doce. É fonte de vitaminas A, C e do complexo B, podendo ser considerada um alimento de alto teor vitamínico e possui nutrientes como, potássio, sódio, ferro, cobre e zinco. A beterraba é um vegetal rico em carboidratos, gorduras e lipídios, pigmentos solúveis em água e vem ganhando popularidade devido a sua atividade biológica e sua possível utilidade como alimento funcional (GONÇALVES, 2018; CHHIKARA et al., 2019; NOWACKA et al., 2019).

As betalaínas são os pigmentos nitrogenados presentes na beterraba, hidrossolúveis, derivadas no ácido betalâmico, sendo consideradas antioxidantes naturais por possuírem radicas livres. As betalaínas são divididas em betacianinas (coloração vermelho-violeta) e betaxantinas (coloração vermelho-alaranjado), porém em menor proporção. Para extração de pigmentos é necessário aplicação de detergentes, solventes ou tratamento térmico para que ocorra o rompimento da membrana. Porém a utilização de tratamento térmico em betalaínas não é recomendado por serem altamente sensíveis a altas temperaturas. Além disso outros fatores como, pH, temperatura, atividade de água, luz e metais também afetam a estabilidade do pigmento (GONÇALVES, 2018; CHHIKARA et al., 2019; NOWACKA et al., 2019).

#### **4.5 Análise sensorial de alimentos**

A análise sensorial é uma ciência que evoca, mede, analisa e interpreta as reações humanas frente às características dos alimentos e materiais, percebidas pelos cinco sentidos: paladar, olfato, tato, visão e audição (ABNT, 1993). Podendo ser dividida em dois grupos de testes analíticos, que destinam-se a descrever e agregar produtos, e os testes afetivos, que se destinam a avaliar o grau de aceitação de um determinado produto. Para realização dos testes sensoriais é necessário elaborar documentos para que cada provador possa responder de forma clara e específica as perguntas que lhe for colocada (SÁNCHEZ & ALBARRACÍN, 2010).

A análise sensorial é uma ferramenta indispensável para elaboração de novos produtos, uma vez que os alimentos se destacam pelas suas características, que são determinantes para aceitação e compra dos alimentos. Nos testes afetivos os provadores correspondem ao consumidor não treinado na descrição de preferências, do qual sua avaliação é baseada no gosto pessoal do provador, focando apenas na decisão de compra e aceitação geral. A utilização de método hedônico proporciona uma avaliação sobre o gosto do produto que está sendo testado, fazendo o uso de uma escala hedônica. Nesta escala, os provadores têm que escolher a expressão que se encaixa melhor a sua percepção e aceitação sobre o produto, permitindo assim transformar uma resposta num valor numérico fornecendo informações rápidas sobre a potencialidade do novo produto desenvolvido (RUIZ-CAPILLAS et al., 2021).

**5. Projeto de pesquisa**

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



**Projeto de Qualificação**

**Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando nanoemulsão de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e extrato de beterraba (*Beta vulgaris* L.)**

Tamires Soares Schug

Pelotas, 2022.

TAMIRES SOARES SCHUG

**Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando nanoemulsão de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e extrato de beterraba (*Beta vulgaris* L.)**

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

**Comitê de orientação**

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra (orientador)  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Carla Rosane Barboza Mendonça  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Tatiane Kuka Valente Gandra

Pelotas, 2022.

## Resumo

SCHUG, Tamires Soares. **Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando nanoemulsão de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e extrato de beterraba (*Beta Vulgaris* L.). Universidade Federal de Pelotas. 2022. 47p.**

Os produtos cárneos são alimentos fundamentais na dieta da população, sendo considerados uma das principais fontes proteicas usadas pelos humanos. Os sais de cura constituídos por nitritos e/ou nitratos de sódio são usados para conservação e para alteração de características sensoriais em produtos cárneos. Apesar das vantagens, os sais de cura em determinadas situações podem gerar alguns riscos à saúde dos consumidores. Em vista disso, são necessárias alternativas para substituição parcial ou total do nitrato e nitrito em produtos alimentícios, a utilização de substâncias bioativas como óleos essenciais, surge como uma alternativa. O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) possui forte atividade inibitória contra muitos patógenos de origem alimentar ou bactérias deteriorantes. Apesar do seu grande potencial antimicrobiano, quando utilizados diretamente nos alimentos, podem interferir negativamente nas características sensoriais dos produtos. Estratégias da nanotecnologia, como a encapsulação de substância fenólicas tem sido investigada para melhorar sua utilização, dispersão e estabilidade. A utilização de substâncias para promover a cor em produtos cárneos é de extrema importância, a utilização de extrato de beterraba é uma boa alternativa para substituição de corantes artificiais por corantes naturais. Neste contexto, objetivou-se avaliar o efeito da utilização conjunta de nanoemulsões com óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba em embutidos cárneos para manutenção das características sensoriais e microbiológicas. Será realizada a obtenção do extrato de beterraba seguida da avaliação do concentrado, formação de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e sua avaliação e após será realizada a elaboração do embutido cárneo com diferentes formulações, seguida da avaliação Físico-química, microbiológica e sensorial. Espera-se com este estudo, que a utilização conjunta da nanoemulsão de óleo essencial de tomilho apresente efeito antimicrobiano frente as bactérias *Salmonella ssp*, *Escherichia coli*, Aeróbios mesófilos e *Listeria monocytogenes* evitando a perda da coloração causada pela redução de nitrito

ou mesmo conferindo melhor coloração ao produto, sem afetar a estabilidade físico-química.

Palavras-chave: Produtos cárneos, nanotecnologia, nanopartículas, encapsulamento, betalaínas.

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Ingredientes utilizados na formulação de embutido cárneo com três formulações diferentes.....	30
Tabela 2. Lista de reagentes que serão utilizados no projeto com a respectivas cotações.....	37
Tabela 3. Cronograma resumido das atividades do projeto.....	41

### **Lista de Abreviações**

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

MEs – Microemulsões

NEs – Nanoemulsões

OEs – Óleos Essenciais

## Sumário

<b>1 Introdução</b> .....	38
<b>2 Revisão Bibliográfica</b> .....	42
<b>2.1 Microrganismos nos produtos cárneos e a necessidade de conservantes</b> 42	
<b>2.1.1 <i>Salmonella</i></b> .....	44
<b>2.1.2 <i>Escherichia coli</i></b> .....	44
<b>2.1.3 <i>Listeria monocytogenes</i></b> .....	45
<b>2.2 Óleos essenciais, atividade antimicrobiana e aplicabilidade em produtos cárneos</b> 46	
<b>2.2.1 Óleo essencial de Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)</b> .....	48
<b>2.3 Nanotecnologia</b> .....	49
<b>2.3.1 Estabilidade das nanoemulsões</b> .....	51
<b>2.4 Extrato de beterraba</b> .....	52
<b>2.5 Análise Sensorial de Alimentos</b> .....	53
<b>3 Objetivos</b> .....	55
<b>3.1 Objetivos gerais</b> .....	55
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	55
<b>4 Hipóteses</b> .....	56
<b>5 Materiais e métodos</b> .....	57
<b>5.1 Material</b> .....	57
<b>5.2 Obtenção do extrato de beterraba</b> .....	57
<b>5.2.1 Avaliação do concentrado em pó</b> .....	57
<b>5.2.1.1 Umidade</b> .....	57
<b>5.2.1.2 Teor de açúcar (reduzidos e totais)</b> .....	57
<b>5.2.1.3 Sólidos solúveis</b> .....	57

5.2.1.4 Cor.....	58
5.2.1.5 pH.....	58
5.3 Preparo da nanoemulsão de óleo essencial de tomilho.....	58
5.3.1 Análise do tamanho de gota, índice de polidispersidade e potencial zeta	59
5.4 Preparação do embutido cárneo.....	59
5.5 Avaliação físico-química.....	60
5.5.1 Índice de acidez (IA).....	60
5.5.2 Índice de peróxido (IP).....	60
5.5.3 Análise de substâncias reativas ao ácido-2-tiobarbitúrico (TBARS).....	61
5.5.4 Análise de cor.....	61
5.5.5 Análise de umidade.....	61
5.6 Avaliação microbiológica.....	62
5.6.1 <i>Salmonella</i> spp.....	62
5.6.2 <i>Escherichia coli</i> .....	63
5.6.3 <i>Microrganismos aeróbios mesófilos</i> .....	63
5.6.4 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	64
5.7 Análise Sensorial.....	64
5.8 Análise Estatística.....	65
6 Orçamento do projeto.....	66
7 Resultados e impactos esperados.....	68
8 Contribuições científicas.....	69
9 Cronograma do Projeto.....	70
10 Referências Bibliográficas.....	71

## 1 Introdução

Os produtos cárneos são alimentos fundamentais na dieta da população de modo geral, fornecendo nutrientes essenciais como proteínas, vitaminas e minerais, sendo considerados uma das principais fontes proteicas usadas na alimentação humana. O aumento da renda *per capita* da população e a crescente urbanização, resultam num maior consumo de alimentos de origem animal (MANESSIS et al., 2020). Segundo as projeções do Ministério de agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA), o setor de carnes aponta um crescimento nos próximos anos. As taxas de crescimento de produção no período de 2020/21 a 2030/31 para carnes suínas devem ter um crescimento anual de 3,0%, para carne bovina de 2,3% e para carne de frango 2,6%. Além de um aumento de produção de 24,0% (DA SILVA et al., 2021; MAPA, 2020).

Os sais de cura constituídos por nitritos e/ou nitratos de sódio são usados para conservação e para alteração de características sensoriais em produtos cárneos, suas vantagens incluem a formação de cores de cura exclusivas, promoção do sabor, potencial antioxidante e propriedades antimicrobianas. Apesar destas vantagens, os sais de cura em determinadas situações podem gerar alguns riscos à saúde dos consumidores, sendo a redução ou remoção do nitrito e nitrato uma situação crítica para indústria de produtos cárneos. As nitrosaminas e outros produtos de reação formados a partir de nitrito e nitrato estão associados ao aumento do risco de câncer. Em vista disso, são necessárias alternativas para substituição parcial ou total do nitrato e nitrito em produtos alimentícios (PAPADOCHRISTOPOULOS et al., 2021).

Há um interesse crescente das indústrias de alimentos em desenvolver e usar aditivos naturais que atendam às demandas dos consumidores por produtos saudáveis, mas que mantenham a segurança e o valor nutricional e atuem como conservantes prolongando a vida útil, mantendo a qualidade microbiológica e sensorial dos produtos alimentícios. Nesta situação, a utilização de substâncias bioativas como óleos essenciais, surge como uma alternativa para substituição aos aditivos químicos sintéticos e este fato tem ganhado grande atenção na última década (LAGES, 2019; FALLEH et al., 2020).

Os óleos essenciais são substâncias naturais derivadas do metabolismo especializado de plantas, ricos em diferentes compostos, como terpenos e

fenilpropanoides, e podem manter a qualidade dos alimentos através da inibição de microrganismos. Os compostos constituintes não polares presentes nos óleos essenciais têm uma solubilidade em água relativamente baixa, além de conferir propriedades sensoriais e apresentarem baixa toxicidade em relação aos conservantes sintéticos, podendo ser utilizados na indústria alimentícia como aromatizantes, devido ao seu aroma destacado, vinculando sabores, podendo ainda contribuir como um antimicrobiano natural (LAGES, 2019; FALLEH et al., 2020),

Considerando a carne e seus derivados como sistemas alimentares complexos, é fundamental garantir a eficiência da aplicação de óleos essenciais como antimicrobianos naturais, sendo importante conhecer as propriedades e constituintes químicos dos óleos essenciais, a microbiota contaminante, a concentração inibitória mínima contra microrganismos específicos, as possíveis interações de seus constituintes químicos com a matriz alimentar e as alterações sensoriais que podem ocorrer, principalmente devido à capacidade aromatizante (LAGES, 2019; DA SILVA et al., 2021; PAPADOCHRISTOPOULOS et al., 2021).

O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é um dos óleos que apresentam comprovada atividade antimicrobiana. Sendo uma planta herbácea, da família Lamiaceae, com origem no Mediterrâneo Ocidental. Têm sido amplamente utilizados nas áreas alimentícia, médica e cosmética devido ao seu odor e sabor agradáveis e possui forte atividade inibitória contra muitos patógenos de origem alimentar ou bactérias deteriorantes, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*. Atributos esses que podem estar relacionados à presença de timol e seu isômero (carvacrol), b-cariofilos, c-terpineol, e p-cimeno presentes no óleo (FRAQUEZA et al., 2021; LIU et al., 2020; ALMASI et al., 2021).

Apesar do seu grande potencial antimicrobiano os óleos essenciais, quando utilizados diretamente nos alimentos, podem interferir negativamente nas características sensoriais dos produtos, podendo inclusive diminuir a sua aceitação, sendo necessário utilizar estratégias para aplicação dos mesmos. A encapsulação de substância fenólicas tem sido investigada como uma estratégia de aplicação, em que novos sistemas de liberação são utilizados como veículo

para incorporação, transporte, proteção e liberação controlada de compostos bioativos, assim melhorando sua utilização, dispersão e estabilidade. Entre as abordagens de encapsulamento tradicional as microemulsões e nanoemulsões se destacam como sendo apropriados para utilização na indústria de alimentos (GARANVAND et al., 2021; ALMASI et al., 2021; FELÍCIO, 2020).

As nanoemulsões (NEs) são sistemas coloidais, cineticamente estáveis, sua formação requer alta energia mecânica. Diferente das microemulsões que são termodinamicamente estáveis, sendo consideradas uma emulsão óleo/água com tamanho médio de gotícula que varia de 50 a 1000 nm. As microemulsões normalmente requerem altas concentrações de surfactante, enquanto as nanoemulsões podem ser formuladas a partir de uma gama mais ampla de ingredientes e requerem concentrações mais baixas de surfactante. As principais diferenças entre as nanoemulsões e microemulsão são a estabilidade termodinâmica e o diâmetro da gotícula (ALMASI et al., 2021; RADI et al., 2018).

Por terem um processo de obtenção simples e possuir uma alta estabilidade contra floculação, agregação, coalescência e amadurecimento de Ostwald as nanoemulsões atraem mais atenção. Já as microemulsões não são muito utilizadas para aplicação em alimentos, devido a algumas desvantagens operacionais e por apresentar uma emulsificação de baixa energia (FELÍCIO, 2020; GARANVAND et al., 2021).

A utilização de substâncias que promovam a cor em produtos cárneos é de extrema importância, sendo que a cor é um dos principais atributos notados pelos consumidores na hora da compra e está diretamente relacionada com a aceitação do produto. O uso de corantes artificiais não é desejado pelos consumidores, que buscam cada vez mais ingredientes naturais nos produtos. Além de que a utilização de certos corantes artificiais, em determinadas situações, pode ocasionar em doenças, como hiperatividade em crianças e até problemas carcinogênicos. Portanto, a utilização de corantes naturais tem sido amplamente estudada visando a aplicação em alimentos. Dentre os corantes naturais destaca-se o presente na beterraba, sendo um dos mais utilizados na indústria de alimentos por ser de fácil extração e conter um alto poder de coloração (LAGES, 2019; MEIRELES et. al., 2020).

O extrato de beterraba é uma boa alternativa para utilização em produtos cárneos, sendo que as betalaínas são pigmentos nitrogenados encontrados em abundância nesta hortaliça. As betalaínas são compostos hidrossolúveis, derivadas do ácido betalâmico, obtidas através da extração aquosa da beterraba vermelha triturada, este método tem um alto rendimento e baixa degradação. Podendo ser classificadas em betacianinas, responsáveis pela coloração vermelho-violeta e em betaxantinas, de coração vermelho-alaranjado, porém em menor proporção. Contudo, sua instabilidade em altas temperaturas e pH alcalino limita sua aplicação como corante alimentar (SANTOS, 2017; BELLUCCI, 2018).

Diante do contexto exposto, acredita-se que a adição conjunta de nanoemulsões de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba em substituição aos sais de cura, represente uma alternativa natural para produção de embutidos cárneos, propiciando a manutenção das características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

## **2 Revisão Bibliográfica**

### **2.1 Microrganismos nos produtos cárneos e a necessidade de conservantes**

Há uma tendência em países em desenvolvimento como o Brasil, de alto consumo de carne e principalmente de produtos cárneos, este levantamento gera preocupações das autoridades de saúde com relação a qualidade e a segurança destes produtos de origem animal. As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são causadas principalmente pela ingestão de alimentos contaminados por formas viáveis de microrganismos patogênicos ou por suas toxinas pré-formadas nos alimentos (LAGES, 2019; SOARES et al.,2021).

Os produtos cárneos por terem alto teor de água, pH próximo a neutralidade e pela elevada presença de nutrientes são considerados ambientes favoráveis para o crescimento e multiplicação de microrganismos. A capacidade destes microrganismos de se desenvolverem está diretamente relacionada com diversos fatores, sendo divididos em fatores intrínsecos, relacionados com as características próprias do alimento, como pH, composição química, umidade e potencial de oxido-redução e fatores extrínsecos, relacionados ao ambiente em que o alimento está presente, como umidade relativa do ar, temperatura, presença de gases no ambiente e substâncias adicionadas para reduzir ou inibir multiplicação de microbiana.

Nitratos e nitritos de sódio são comumente utilizados em produtos cárneos, para inibição microbiana além de proporcionarem propriedades sensoriais específicas para o produto, como cor e aroma característicos, podendo ainda ser chamados de “sais de cura”. Um dos seus principais efeitos é o aumento da vida útil dos produtos cárneos. Com relação a reatividade do nitrogênio, quando adicionado o nitrito na carne ou produto cárneo, em meio ácido, produz a formação de ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) podendo formar seu anidrido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) que por sua vez estará em equilíbrio com óxido nítrico (NO) e dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ). Várias das alterações vistas na carne curada se dão através da reatividade do óxido nítrico (NO) com mioglobina e aminoácidos. Na presença de água o dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ) pode reagir e formar nitrato (FLORES e TOLDRÁ, 2021).

Dentre as substâncias que podem ser geradas através do nitrito estão as N-nitrosaminas, que são as mais preocupantes, principalmente pelo fato que alguns estudos indicam o potencial carcinogênico destas substâncias. As nitrosaminas são formadas através da reação de nitrosação do nitrito, gerando o íon nitrosilo ( $\text{NO}^+$ ) que irá reagir com aminas secundárias não protonadas através de uma reação de substituição nucleofílica. Dentre as condições que favorecem sua formação, incluem-se altas temperaturas, pH ácido (2,5-3,5), presença de amina protonada, elevada quantidade e nitrito residual e maior tempo de armazenamento (FLORES e TOLDRÁ, 2021).

Segundo a RDC nº 272, de 14 de março de 2019, estabelece os aditivos autorizados para uso em carnes e produtos cárneos, para produtos cárneos industrializados fresco traz um limite máximo de 0,015g/100g para nitrito de potássio e 0,03g/100g de nitrato de sódio. A soma dos nitritos e nitratos, determinados como resíduo máximo, não deve superar 0,015g/100g expresso como nitrito de sódio (BRASIL,2019).

Dentre os produtos cárneos, a embutido frescal se destaca devido a sua alta aceitação e comercialização, além de ser um produto de fácil fabricação, mas também por ser um produto facilmente contaminado, quando produzido ou comercializado sem os cuidados higiênicos necessários (LAGES, 2019; SOARES et al.,2021).

A instrução normativa nº 4, de 31 de março de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento define como embutido o produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionados ou não de tecidos adiposos, ingrediente, embutidos em envoltório natural ou artificial, e submetido ao processo tecnológico adequado. De acordo com a tecnologia empregada na fabricação pode se caracterizar como um produto fresco, seco, curado e/ou maturado, cozido (BRASIL, 2000).

A embutido frescal está entre os produtos cárneos mais consumidos pela população brasileira, sendo um produto embutido cru, que não sofre nenhum processo de cozimento durante sua produção. Deste modo, o prazo de validade deste tipo de produto é limitado e deve ser mantido em temperatura de refrigeração. A produção de embutidos frescais abrange várias etapas de manipulação do produto, falhas nas boas práticas de fabricação durante a etapas

de processamento pode aumentar significativamente as chances de contaminação por microrganismos (PAVELQUESI et al.,2021; SOARES et al.,2021).

A instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019, estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Para embutidos frescos devem-se analisar os seguintes microrganismos, *Salmonella*, *Escherichia coli*, Aeróbios mesófilos e *Listeria monocytogenes* (BRASIL, 2019).

### **2.1.1 *Salmonella***

A *Salmonella* é uma bactéria que está amplamente distribuída na natureza, podem habitar o trato intestinal dos humanos, animais domésticos e selvagens, principalmente as aves. Sendo uma bactéria pertencente a família da *Enterobacteriaceae*, são Gram-negativas, anaeróbia facultativa, na forma de bastonetes e podem ser móveis ou imóveis por flagelos. As carnes, o leite e os ovos são os principais veículos de transmissão, sendo que a *S. entérica* é considerada a espécie mais patogênica. Além de serem conhecidos por sobreviver em produtos alimentícios de baixa umidade e conterem temperatura ótima de crescimento de x°C à xC (WANG et al., 2020; EHUWA et al., 2021).

A Salmonelose é uma das principais infecções transmitidas pelo consumo de alimentos contaminados, os efeitos patogênicos são observados somente quando ingerido a bactéria na sua forma viável. Sendo a cepa específica responsável pela infecção e o estado de saúde do hospedeiro os fatores que influenciam o grau de gravidade da infecção. Dependendo da espécie envolvida, as infecções por *Salmonella* podem-se manifestar em diferentes sintomas como, febre entérica (febre tifoide) em que os sintomas mais comuns incluem perda de forças, dores de cabeça e febre alta e persistente e enterocolite onde os sintomas envolvem vômito, diarreia, febre, náuseas e dores abdominais (WANG et al., 2020; EHUWA et al., 2021).

### **2.1.2 *Escherichia coli***

São bactérias pertencente à família Enterobacteriaceae, Gram-negativas, na forma de bastonetes, capazes de fermentar a lactose, com produção de ácido e de gás. Sendo o trato intestinal dos humanos e outros animais de sangue

quente o seu principal *habitat*. A maioria das cepas de *E. coli* são consideradas inofensivas, porém algumas causam doenças que podem ser transmitidas por alimentos. As principais infecções causadas por *E. coli* estão relacionadas a 5 sorogrupos: *E. coli enteropatogênica* (EPEC) que tem capacidade de colonizar o intestino onde causa lesões nas microvilosidades, *E. coli enterotoxigenica* (ETEC) sendo a maior responsável por diarreias em crianças, com capacidade de produzir toxinas, *E. coli enteroinvasiva* (EIEC) podendo se desenvolver na mucosa do cólon, invadindo as células epiteliais, multiplicando-se e causando uma úlcera no intestino, *E. coli enterohemorrágica* (EHEC) pode colonizar o trato intestinal e produzir verotoxinas, que são ativadas no cólon, podendo originar casos graves com diarreia hemorrágica e *E. coli enteroagregativa* (EaggEC). *E. coli* pode ser considerada um indicador higiênico-sanitário dentro do processamento de alimentos devido a sua origem intestinal, sendo indício de contaminação fecal direta ou indireta (LIU et al., 2020; FRANCO et al., 2010; CAVALIN et al., 2018).

### **2.1.3 *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* é amplamente encontrada na natureza, está presente no solo, água, vegetais e animais. É uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, pertencente à família *Listeriaceae* e as células têm a forma de pequenos bastonetes e a sua mobilidade é conferida por flagelos. Podendo formar biofilmes e sobreviver a condições adversas, apresentam viabilidade em uma ampla faixa de temperatura, incluindo a de refrigeração. Porém, são inativadas pelo processo de pasteurização. Os alimentos mais propícios a contaminação são carnes, queijos macios, leite cru, produtos lácteos, água, vegetais crus, peixes e frutos do mar (JORDAN et al., 2018).

A listeriose é a infecção causada por *Listeria monocytogenes*, podendo apresentar sintomas leves como vômito, diarreia, dores de cabeça, em casos mais graves podem causar meningite aguda infecciosa, principalmente em pessoas imunodeprimidas, gestantes e idosos, com alto índice de mortalidade nestes grupos de risco. Estas bactérias tendem a atingir o fígado e o baço (JORDAN et al., 2018).

## **2.2 Óleos essenciais, atividade antimicrobiana e aplicabilidade em produtos cárneos**

Os óleos essenciais (OEs) são compostos presentes nas plantas aromáticas e medicinais, sendo voláteis e líquidos incolores em temperatura ambiente. São originados do metabolismo especializado de plantas, sendo capazes de serem sintetizados em flores, brotos, sementes, caules e frutos, praticamente quase todos os órgãos, e armazenados em células epidérmicas, cavidades e células secretoras. Geralmente os OEs equivalem a uma fração pequena da composição total da planta, aproximadamente menos de 5% de matéria seca. Desde sua descoberta, os óleos essenciais são amplamente utilizados em várias áreas, como na área de cosméticos, na agricultura, nos produtos de limpeza, na aromaterapia, na indústria de alimentos, entre outros. Isso se dá pelo fato de que os OEs exibem uma ampla gama de atividades biológicas, abrangendo propriedades antibacteriana, antiviral, antifúngica, antioxidante, antimicótica, antiparasitária e inseticida. Além de possuírem vários componentes químicos bioativos, como terpeno, terpenoides e fenólicos, responsáveis pelos odores e aromas específicos que as plantas aromáticas emitem (BHAVANIRAMYA et al.,2019; FALLEH et al.,2020).

Os óleos essenciais são altamente solúveis em compostos voláteis como álcool, éter, solventes orgânicos e óleos fixos, porém pouco solúveis em água, além de possuírem índice de refração variável e uma boa atividade óptica. Os OEs são responsáveis também por algumas funções importantes nas plantas, como proteger de pragas e microrganismos e atrair insetos e polinizadores benéficos, bem como, proteger a planta de estresse causado pelo ambiente externo. Os principais constituintes dos OEs são os terpenos, que são formados pela condensação de duas ou mais unidades de isopreno, e os hidrocarbonetos, que são compostos de dois elementos básicos, átomos de carbono e hidrogênio. Os hidrocarbonetos simples são conhecidos como não terpenoides, sendo os compostos fenólicos moléculas responsáveis pelos efeitos antimicrobianos nos OEs. Encontra-se um total de mais de 3 mil tipos de OEs identificados, sendo que apenas 300 contêm importância para indústria de alimentos, os métodos mais usados para extração de OEs são hidrodestilação e a destilação a vapor (BHAVANIRAMYA et al.,2019; FALLEH et al.,2020).

O mecanismo de ação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais não está relacionado a um mecanismo específico, isso pela diversidade de compostos químicos presentes nos OEs. De modo geral, pode-se dizer que a atividade antimicrobiana está ligada a natureza hidrofóbica do OEs, que move os lipídios presentes na membrana celular das bactérias, rompendo assim a estrutura da parede celular, tornando-a mais permeável. Esta mudança na permeabilidade da membrana acaba levando ao vazamento dos materiais celulares, e a morte da célula. Porém, existem diferentes tipos de mecanismos de atividade dos OEs nos microrganismos, sendo eles, destruição da parede celular; danos nas proteínas da membrana; coagulação do citoplasma; redução da força motriz do próton; danificação da membrana citoplasmática; aumento da permeabilidade com vazamento do conteúdo da célula; através da hidrólise de ATP e diminuição na síntese de ATP, levando a redução do *pool* de ATP intracelular (BHAVANIRAMYA et al.,2019; FALLEH et al.,2020).

As bactérias Gram-positivas são mais sensíveis a ação dos OEs do que as Gram-negativas, isso devido a presença de uma camada de peptidoglicanos que fica na membrana celular das bactérias Gram-positivas que facilitam a penetração dos compostos hidrofóbicos dos OEs, já nas bactérias Gram-negativas a membrana externa que envolve a parede celular é composta por uma camada dupla de fosfolipídios, ligada a uma membrana interna de lipossacarídeos, que dificulta a penetração dos compostos dos OEs. A atividade antimicrobiana dos OEs está geralmente associada a compostos como eugenol, timol, alicina, carvacrol e substâncias como o linalol, sabineno, mentol, mirceno e camphene. Esses princípios ativos têm como alvo a proteína, grupos amina e hidroxilamina na membrana bacteriana, para alterar sua permeabilidade, levando à morte da bactéria (BHAVANIRAMYA et al.,2019; FALLEH et al., 2020).

Alguns fatores podem influenciar a atividade antimicrobiana dos OEs em sistemas alimentares, tais como, a microbiota contaminante (concentração e a estrutura bacteriana), a composição química e a atividade biológica dos OEs (espécie vegetal, parte da planta, tempo de colheita, condições climáticas, método de extração, secagem e armazenamento), as propriedades intrínsecas do alimento (pH, teor de proteínas, lipídios e água) e a interação dos constituintes

do OEs com os constituintes do alimento (FALLEH et al.,2020; DA SILVA et al.,2021).

Alguns estudos propuseram a incorporação de OEs como conservantes em carnes inibindo e até mesmo eliminando algumas bactérias patogênicas, OEs de cravo, coentro, tomilho ou orégano foram suficientes para inibir *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* e flora de deterioração autóctone em alguns produtos cárneos (FALLEH et al.,2020; DA SILVA et al.,2021).

Vários estudos relataram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais em carnes e produtos cárneos com resultados promissores. Ghaderighahfarokhi et al., 2017 em seu estudo aplicaram óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum L.*) diretamente e em nanocápsulas com quitosana em hambúrgueres e verificaram uma redução da população microbiana frente a *S. aureus*, aeróbios viáveis totais mesófilos, *Enterobacteriaceae*, leveduras e bolores e bactérias lácticas com maior eficiência do óleo nanoencapsulado, quando comparado ao não nanoencapsulado. Já Šojić et al. (2019) avaliaram a adição de óleo essencial de coentro (*Coriandrum sativum*) em salsichas de carne suína e, em todas as concentrações testadas, contribuíram para uma diminuição na contagem total microrganismos em placas. No estudo de Radünz et al. (2019) o óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) mostrou um efeito inibitório e bactericida *in vitro* contra *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*.

### **2.2.1 Óleo essencial de Tomilho (*Thymus vulgaris*)**

*Thymus vulgaris* é uma planta aromática, medicinal, pertencente à família Lamiaceae, e à classe das dicotiledôneas, nativas dos países da bacia do Mediterrâneo ocidental, porém, atualmente é amplamente distribuída devido a sua grande variedade de uso culinário e como ervas medicinais, promovendo assim seu cultivo em diferentes regiões do mundo, usualmente, conhecida como tomilho comum. O óleo essencial de tomilho é fonte de compostos bioativos, os principais compostos fenólicos são carvacrol, timol, hidrocarbonetos monoterpeno  $\rho$ -cimeno e  $\gamma$ -terpineno. Os isômeros timol e carvacrol são os

principais constituintes presentes no óleo, são responsáveis pelos efeitos antibacteriano, antifúngico e anti-helmínticos (NIETO, 2020; SILVA et al.,2021).

A utilização de óleo essencial de tomilho em alimentos como conservantes vem sendo explorada por muitos autores, devido ao seu potencial antioxidante e antimicrobiano. A adição direta de OEs de tomilho pode inibir o desenvolvimento de processo oxidativo em diversos alimentos. Alguns fatores podem influenciar na bioatividade do OEs de tomilho quando adicionados ao um determinado alimento, tais fatores incluem as condições de armazenamento do alimento, a composição e o tipo de microrganismo que pode contaminá-lo. O principal aspecto limitante para o uso de OE de tomilho nos alimentos é o desenvolvimento de características sensoriais negativas, contribuindo para um odor e sabor desagradável. Sendo de extrema importância empregar novas estratégias que visam diminuir estas limitações sensoriais, como o uso de baixas concentrações ou o preparo na forma de cápsulas ou inclusão em outros sistemas nanoestruturados (NIETO, 2020; SILVA et al.,2021).

### **2.3 Nanotecnologia**

A nanotecnologia é uma tecnologia que permite medir, controlar e manipular materiais com dimensões em nanômetro (nm), de modo a alterar suas propriedades e funções. Consiste na caracterização, fabricação e manipulação de estrutura biológica menor que 100 nm. Na indústria de alimentos uma das principais aplicação seria no desenvolvimento de novos sistemas de liberação de compostos bioativos na nanoescala, podendo assim melhorar a biodisponibilidade, solubilidade e até mesmo os aspectos sensoriais dos compostos. Existem vários tipos de abordagens na nanotecnologia, como a preparação de nanopartículas poliméricas e lipídicas, microemulsões (MEs), nanoemulsões (NEs), nanotubos de carbono, conjugado de polímeros, entre outros (PAVONI et al., 2020; GARAVAND et al., 2021; FELÍCIO,2020).

As nanoemulsões-NEs consistem na dispersão de dois líquidos imiscíveis, sendo um deles a fase contínua e o outro a dispersa conforme a figura 1. Existem dois tipos de sistema em emulsões, sistemas de água em óleo (a/o) em que a fase contínua é lipofílica e a dispersa hidrofílica e os sistemas de óleo em água (o/a) em que a fase contínua é hidrofílica e a dispersa lipofílica. Esta

dispersão ocorre somente na presença de moléculas anfifílicas, capazes de reduzir a tensão interfacial, chamadas de surfactantes. As gotículas nas NEs são compostas por um núcleo cercado por uma mono camada de surfactantes, com as caudas apolares em direção a fase lipofílica (óleo) e as cabeças polares em direção a fase aquosa. A utilização de NEs são adequados na presença de compostos lipídicos ou pouco solúveis em água, como os óleos essenciais, que requerem a dispersão em meio aquoso, assim, aumentando a biodisponibilidade e as aplicações (PAVONI et al., 2020; GARAVAND et al., 2021).

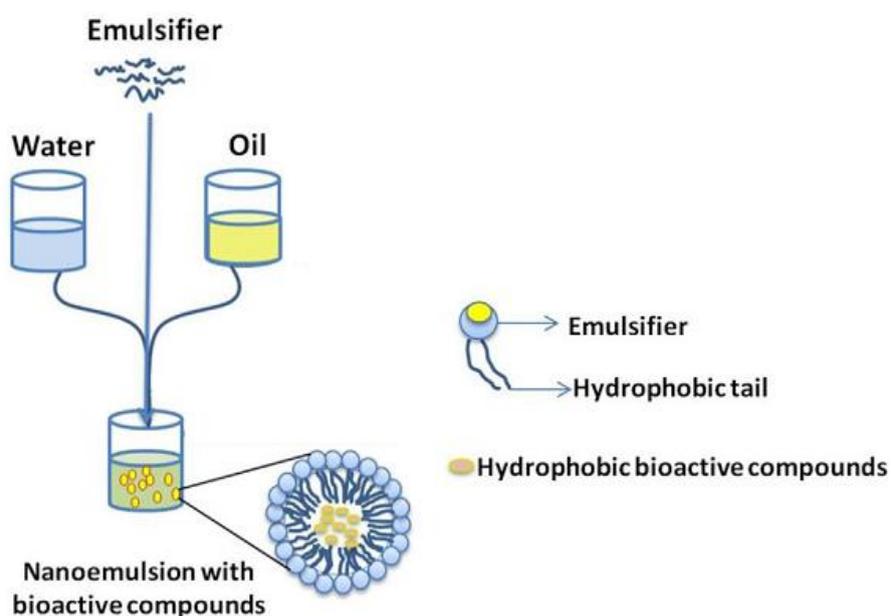


Figura 1- Sistema de nanoemulsão.  
Fonte: DAS et al.,2020 com modificações.

As nanoemulsões são sistema que necessitam de energia externa para sua formação, pois as fases separadas possuem menor energia livre em comparação ao sistema coloidal, o emprego de energia externa permite ultrapassar o *gap* de energia entre as fases separadas e o sistema coloidal. Sendo consideradas cineticamente estáveis e termicamente instáveis. NEs apresentem gotículas esféricas que são formadas como resultado da redução da área interfacial, apresentam uma boa estabilidade e resistência à agregação de gotas e separação de fase gravitacional ou formação de creme (PAVONI et al., 2020; GARAVAND et al., 2021).

Existem duas técnicas para obtenção das NEs, os métodos de alta energia de emulsificação e métodos de baixa energia de emulsificação. Os

métodos de alta energia são os mais utilizados neste sistema, são baseados na produção de energia por meio de alta pressão de cisalhamento, através de métodos como homogeneização de alta pressão, sonicação, microfluidização, utilização de ultrassom ou potencial químico dos componentes. Por outro lado, os métodos de baixa energia ocorrem a partir da inversão espontânea na curvatura do tensoativo para promover a formação dos glóbulos menores (PAVONI et al., 2020; GARAVAND et al., 2021; FELÍCIO,2020) .

Os OEs são ótimas opções para obtenção de NEs, por apresentarem baixa viscosidade, baixa tensão interfacial e alta polaridade. A utilização de óleos de baixa viscosidade na formulação facilita o processo de redução de tamanho, por necessitar de um período mais curto para sua formação, utilizando menor energia externa e gerando menores gotícula. As NEs são capazes de carregar maior quantidade de fase dispersa na presença de menor quantidade de surfactante, está baixa quantidade de surfactante garante um melhor perfil toxicológico/segurança, além de poder ser formulado com uma variedade maior de surfactantes. Os tensoativos mais utilizados para obtenção de sistemas coloidais são os polissorbatos Tween 80 e Tween 20, fornecendo suspensões estáveis sem a necessidade de um co-surfactante (PAVONI et al., 2020; GARAVAND et al., 2021).

### **2.3.1 Estabilidade das nanoemulsões**

Os principais fenômenos de instabilidade que podem levar à separação de fases são: formação de creme ou sedimentação, floculação, coalescência e amadurecimento de Oswald. A estabilidade a longo prazo pode ser influenciada pelos diferentes estados de energia livre que os sistemas de NEs contêm, dependendo da altura das barreiras de energia entre o sistema coloidal e as fases separadas, quanto mais baixas foram estas barreiras, mais rápido ocorrerá perda da estabilidade do sistema (PAVONI et al., 2020; GARAVAND et al., 2021).

O amadurecimento de Ostwald é um fenômeno que consiste na condensação e agregação de gotículas menores em gotículas maiores e energeticamente favorecidas, que com o tempo acaba causando a separação de fases, sendo impulsionado pela difusão molecular do óleo através da fase

contínua. Para retardar o amadurecimento é necessário a adição de substâncias apolares e de grande volume molar, como triglicerídeos de cadeia média ou longa (PAVONI et al., 2020; GARAVAND et al., 2021).

Além disso, o tamanho da gota tem um papel fundamental na estabilidade, quanto menores as gotas formadas em uma ampla proporção de superfície, maior a absorção. O potencial zeta é um parâmetro eletrostático que pode indicar a estabilidade física das emulsões (PAVONI et al., 2020; GARAVAND et al., 2021).

## **2.4 Extrato de beterraba**

As principais causas de perda de qualidade em produtos cárneos, são deteriorações químicas e microbiológicas. A oxidação lipídica é uma das reações químicas que mais ocorrem em produtos cárneos, diminuindo a vida útil e o valor nutricional, além de refletir diretamente na descoloração do produto. Os produtos secundários formados a partir desta reação são considerados citotóxicos. Essa descoloração ocorre na superfície, é acelerada em produtos moídos ou triturados, por estarem mais expostos ao ar e à ação de microrganismos. A cor é responsável pelo primeiro estímulo de aceitação pelo consumidor, por serem atraídos pela sua coloração e considerada a característica sensorial mais importante. A utilização de corantes naturais vem sendo amplamente utilizada na indústria de alimentos (GONÇALVES, 2018; CHHIKARA et al., 2019; NOWACKA et al., 2019).

A beterraba, cujo nome científico *Beta vulgaris L.* pertence à família Quenopodiaceae sendo originária de regiões europeias e norte-africanas de clima temperado. No Brasil, é cultivada principalmente nas regiões sudeste e sul e sua parte comestível é uma raiz tuberosa de formato globular e sabor acentuadamente doce. É fonte de vitaminas A, C e do complexo B, podendo ser considerada um alimento de alto teor vitamínico e possui nutrientes como, potássio, sódio, ferro, cobre e zinco. A beterraba é um vegetal rico em carboidratos, gorduras e lipídios, pigmentos solúveis em água e vem ganhando popularidade devido a sua atividade biológica e sua possível utilidade como alimento funcional (GONÇALVES, 2018; CHHIKARA et al., 2019; NOWACKA et al., 2019).

As betalaínas são os pigmentos nitrogenados presentes na beterraba, hidrossolúveis, derivadas no ácido betalâmico, sendo consideradas antioxidantes naturais por possuírem radicais livres. As betalaínas são divididas em betacianinas (coloração vermelho-violeta) e betaxantinas (coloração vermelho-alaranjado), porém em menor proporção (GONÇALVES, 2018; CHHIKARA et al.,2019; NOWACKA et al.,2019).

Para extração de pigmentos é necessário aplicação de detergentes, solventes ou tratamento térmico para que ocorra o rompimento da membrana. Porém a utilização de tratamento térmico em betalaínas não é recomendado por serem altamente sensíveis a altas temperaturas. Além disso outros fatores como, pH, temperatura, atividade de água, luz e metais também afetam a estabilidade do pigmento (GONÇALVES, 2018; CHHIKARA et al.,2019; NOWACKA et al.,2019).

## **2.5 Análise Sensorial de Alimentos**

A análise sensorial é uma ciência que evoca, mede, analisa e interpreta as reações humanas frente às características dos alimentos e materiais, percebidas pelos cinco sentidos: paladar, olfato, tato, visão e audição (ABNT, 1993). Podendo ser dividida em dois grupos os testes analíticos, que destinam-se a descrever e agregar produtos, e os testes afetivos, que se destinam a avaliar o grau de aceitação de um determinado produto. Para realização dos testes sensoriais é necessário elaborar documentos para que cada provador possa responder de forma clara e específica as perguntas que lhe for colocada (SÁNCHEZ e ALBARRACÍN, 2010).

A Análise sensorial é uma ferramenta indispensável para elaboração de novos produtos, uma vez que os alimentos se destacam pelas suas características organolépticas, sendo determinantes para aceitação e compra destes alimentos. Nos testes afetivos os provadores correspondem ao consumidor não treinado na descrição de preferências, do qual sua avaliação é baseada no gosto pessoal do provador, focando apenas na decisão de compra e aceitação geral (RUIZ-CAPILLAS et al.,2021).

A utilização de método hedônico proporciona uma avaliação sobre o gosto do produto que está sendo testado, fazendo o uso de uma escala hedônica. Nesta escala, os provadores têm que escolher a expressão que se encaixa melhor a sua percepção e aceitação sobre o produto, permitindo assim transformar uma resposta num valor numérico fornecendo informações rápidas sobre a potencial do novo produto desenvolvido (RUIZ-CAPILLAS et al.,2021).

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivos gerais**

Avaliar o efeito da utilização conjunta de nanoemulsões com óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba em embutidos cárneos para manutenção das características sensoriais e microbiológicas e para redução parcial ou total do uso de nitrato e nitrito de sódio.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Obter e avaliar físico-quimicamente o extrato de beterraba;
- Desenvolver nanoemulsões o/a com óleo essencial de tomilho;
- Desenvolver embutidos cárneos adicionados de nanoemulsão de Óleo essencial de tomilho e de extrato de beterraba, com redução total ou parcial de nitrato e nitrito de sódio;
- Avaliar o efeito da adição de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e de extrato de beterraba nas características microbiológicas e físico-químicas de embutidos carneos durante o armazenamento a temperatura de 7°C.
- Avaliar a aceitabilidade sob o ponto de vista sensorial dos produtos elaborados.

#### 4 Hipóteses

A adição conjunta de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho com extrato de beterraba em embutidos cárneos inibe o desenvolvimento de *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, Aeróbios mesófilos e *Listeria monocytogenes* e proporciona cor adequada aos produtos, permitindo assim a redução parcial ou total de nitrito e nitrato de sódio.

O emprego do óleo essencial de tomilho na forma de uma nanoemulsões de o/a poderá mascarar o sabor e aroma intensos do óleo essencial, minimizando alterações nas características sensoriais dos embutidos elaborados.

## **5 Materiais e métodos**

### **5.1 Material**

Será utilizado o óleo essencial de tomilho branco (*Thymus vulgaris* L.), obtido comercialmente da empresa Ferquima, Indústria e Comércio de Óleos Essenciais, acondicionado em frasco âmbar, lacrados, com volume total de 100 mL. As beterrabas e os demais ingredientes para formulação dos embutidos cárneos serão obtidos em estabelecimentos comerciais da cidade de Pelotas, RS.

### **5.2 Obtenção do extrato de beterraba**

A obtenção do extrato de beterraba será de acordo com a metodologia utilizada por Lages et al. (2019), o suco de beterraba será extraído em extratora de suco (Juicer Compact Philips Walita, Brasil) e posteriormente liofilizado (Liotop L-101 – Liobras, Brasil) para obtenção do concentrado em pó.

#### **5.2.1 Avaliação do concentrado em pó**

##### **5.2.1.1 Umidade**

A determinação do teor de umidade será através de secagem em estufa a 105 °C, A técnica consiste em pesar de 2 a 10 gramas de amostra em cápsula de porcelana (com peso conhecido e previamente seca em estufa) e levar a estufa para aquecimento a 105 °C. Após aproximadamente 3 horas, retirar da estufa e resfriar em dessecador e pesar (AOAC, 2016).

##### **5.2.1.2 Teor de açúcar (reduzores e totais)**

A determinação de açúcares reduzores (AR) e açúcares totais (AT) será realizada pelo método de Lane-Eynon, que se baseia na redução dos íons de cobre em óxido cuproso pelos grupos reduzores de açúcares em meio alcalino, a partir de solução de Fehling. Segundo descrição das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

##### **5.2.1.3 Sólidos solúveis**

O pó liofilizado de extrato de beterraba será reintegrado, após homogeneizado para realização das análises de sólidos solúveis totais (°Brix) a leitura será realizada em refratômetro de bancada do tipo Abbé (Quimis model Q-109B, Brasil), corrigido para 20°C (AOAC, 2016).

#### 5.2.1.4 Cor

Para determinação de cor será utilizado um calorímetro Minolta CR 400, através do sistema de leitura CIELAB (*ComissionInternatinal de E'clairage*), representado pelos seguintes parâmetros: coordenada L\* expressa o grau de luminosidade da cor medida (L\* = 100 = branco; L\* = 0 = preto), a coordenada a\* expressa o grau de variação entre o vermelho (+60) e o verde (-60) e a coordenada b\* expressa o grau de variação entre o azul (-60) e o amarelo (+60). O Chroma é o índice de saturação e descreve a intensidade de uma cor, é calculado através da equação  $C^* = \sqrt{(a^*{}^2 + b^*{}^2)}$ . O ângulo Hue é o ângulo de tonalidade, indica a posição de amostra no diagrama de cromaticidade, é calculado através da equação  $H^* = \tan^{-1} \left( \frac{b^*}{a^*} \right)$  (BELLUCCI, 2018).

#### 5.2.1.5 pH

O pó liofilizado de extrato de beterraba será reintegrado com água destilada, após homogeneizado, para realização das análises de pH em potenciômetro (Digimed pHmetro DM-20) (AOAC, 2016).

### 5.3 Preparo da nanoemulsão de óleo essencial de tomilho

A fase oleosa da nanoemulsão será o óleo essencial de tomilho, enquanto a fase aquosa será água Milli-Q, como surfactante, será utilizado Tween 80. Pretende-se utilizar uma composição em que a fase oleosa seja de 10% (m/m), dispersa na fase aquosa 90%, da qual 1% (m/m) corresponderá ao emulsificante.

A fase oleosa será dispersa na fase aquosa e efetuada homogeneização em Ultra Turrax (Modelo IKA T10 Basic) a 21.100 rpm por 3 min, seguida de Ultrassom (Modelo QSonica-Q700) a 40% de amplitude por 5 min. A metodologia utilizada seguirá as recomendações de Guo et al. (2020) e Yang et al. (2022), com modificações.

### 5.3.1 Análise do tamanho de gota, índice de polidispersidade e potencial zeta

Nas nanoemulsões resultantes, serão efetuadas análises com relação ao tamanho das gotas, índice de polidispersidade e potencial zeta ( $\zeta$ ), 24 h após a homogeneização. As emulsões serão avaliadas por espalhamento de luz dinâmica, utilizando o equipamento Litesizer 500 (Anton Paar, Brasil) conforme Wan et al. (2019).

### 5.4 Preparação do embutido cárneo

Os embutidos cárneos serão elaborados no laboratório de Processamento de Alimentos de Origem Animal do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, de acordo com a formulação apresentada na Tabela 1. Além dos ingredientes utilizados na formulação controle, as formulações serão adicionadas de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba na proporção de 0,5% e 1,5%, respectivamente.

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

Tabela1. Ingredientes utilizados na formulação do embutido cárneo com três formulações diferentes.

<b>Ingredientes/aditivos</b>	<b>Controle (%)</b>	<b>F1 (%)</b>	<b>F2 (%)</b>
Carne suína magra	77,43	76,33	76,73
Toucinho	12,13	12,13	12,13
Água gelada/ gelo	7,76	7,26	7,26
Sal (NaCl)	1,18	1,18	1,18
Sal de cura (Nitrito e nitrato de sódio)	0,28	0,14	-
Estabilizante (polifosfato)	0,26	0,13	-
Fixador de cor (eritorbato de sódio)	0,26	0,13	-

Condimento comercial para embutido toscana	0,52	0,52	0,52
Açúcar	0,18	0,18	0,18
Nanoemulsão de óleo essencial de tomilho	-	0,5	0,5
Extrato de beterraba	-	1,5	1,5

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

## 5.5 Avaliação físico-química

Os produtos elaborados de acordo com cada tratamento serão avaliados em triplicata.

### 5.5.1 Índice de acidez (IA)

A determinação do IA será verificada de acordo com AOCS Ca 5a-40 (2003). Aproximadamente 2 g de amostra serão colocadas em erlenmeyer de 125 mL, adicionando 25 mL de solução éter:álcool (2:1, v/v) e agitando. Após, 2 gotas de fenolftaleína serão adicionadas, agitando novamente. Será realizado a titulação utilizando uma solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,1N até coloração mudar para rósea. O cálculo do IA será feito de acordo com a Equação 1:

$$IA (\%) = \frac{[V \times F \times 56,1]}{P} \quad (1)$$

Em que, V é o volume (mL) de KOH gasto na titulação; F é o fator de correção do KOH; 56,1 é o peso molecular do KOH e P é o peso (g) da amostra.

### 5.5.2 Índice de peróxido (IP)

A determinação do IP será verificada de acordo com AOCS Cd 8-53 (2003). Aproximadamente 5 g de amostra serão pesadas em erlenmeyer de 250 mL com tampa esmerilhada, será adicionado 30 mL da mistura de ácido acético:clorofórmio (3:2, v/v) e agitando. Em seguida será adicionado 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio, deixando a amostra no escuro e

agitando ocasionalmente, aguardando exatamente 1 minuto. Após, adicionara 30 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de iodo 1%. Por fim, tiosulfato de sódio 0,1N será utilizado para titular até a percepção da perda de cor azul. Uma amostra em branco será realizada. O cálculo do IP será realizado de acordo com a Equação 2:

$$IP \text{ (meq/kg amostra)} = \frac{(A-B) \times N \times F \times 1000}{P} \quad (2)$$

Em que, A é o volume (mL) de tiosulfato gasto na amostra; B é o volume (mL) de tiosulfato do branco; N é a normalidade do tiosulfato; P é o peso (g) de amostra; F é o fator de correção do tiosulfato.

### **5.5.3 Análise de substâncias reativas ao ácido-2-tiobarbitúrico (TBARS)**

Para a determinação de compostos secundários da oxidação, será utilizado o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo indicações de Vyncke (1970), com modificações. Pesar 2,5 g de amostra, homogeneizar com 12,5 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 7,5% (p/v), por 1 min em vórtex e após, filtrar em algodão. Em 2 mL do filtrado adicionar 0,5 mL da solução de TCA 7,5% e 2,5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,02 mol.L<sup>-1</sup>. A amostra deve ser colocada em banho-maria a 100 °C por 40 min. Após, as amostras são resfriadas a temperatura ambiente e levadas a banho ultrassônico por 5 min, para eliminação dos gases. A absorbância das amostras deve ser medida no comprimento de 538 nm em espectrofotômetro (JENWAY, 6705 UV/Vis, Espanha). Os resultados são expressos em mg de malonaldeído.kg<sup>-1</sup> de amostra, usando uma curva elaborada com padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP).

### **5.5.4 Análise de cor**

Será conforme descrito no item 5.2.1.4

### **5.5.5 Análise de umidade**

A umidade será realizada por meio do determinador rápido (Marte, ID50, Brasil), utilizando 10 g de amostra e temperatura constante (105 °C), sendo o

final da análise determinado pela manutenção do peso por 30 segundos. O resultado foi expresso em %.

## **5.6 Avaliação microbiológica**

Os produtos após elaborados de acordo com os tratamentos serão mantidos em temperatura de refrigeração (<7 °C) por até dez dias. A partir de cada um dos produtos será retirada uma amostra de 25 g em quatro tempos, logo após a elaboração do produto, três dias após a elaboração dos produtos, sete dias após a elaboração e dez dias após a elaboração. Estas amostras serão submetidas a avaliação frente aos microrganismos preconizados pela IN nº 60, que são *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Microrganismos aeróbios mesófilos* e *Listeria monocytogenes*.

### **5.6.1 *Salmonella* spp**

A amostra será homogeneizada retirando a alíquota de 25 g da amostra e diluindo em 225 mL de água peptonada tamponada. Após isso será incubada a 37 °C, por 24 horas. Após será realizada a etapa de enriquecimento, que consiste em transferir 1 mL de caldo de pré-enriquecimento para um tubo contendo 10 mL de caldo tetracionato e 0,1 mL para um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis. Depois será incubado o primeiro a 35 °C e o segundo a 42 °C (em banho-maria) por 24 horas. Após a incubação serão semeadas de cada cultura do enriquecimento placas de ágar XLD, ágar Bismuto Sulfito e ágar Hektoen-enteric (HE), de modo a obter colônias isoladas que serão incubados a 35 °C por 24 horas e depois serão realizados teste de identificação bioquímica.

Para identificação bioquímica, a partir das colônias suspeitas, tocar com a agulha no centro da colônia suspeita e semear em tubo contendo ágar tríplice açúcar ferro (TSI), inclinado, ágar lisina ferro (LIA) e ágar urease (UA), nesta ordem e utilizando a mesma picada após incubada a 37 °C por 24 horas. Os resultados serão expressos como "ausência" ou "presença" de *Salmonella* spp em 25 g de alimento (ISO 6579-1, 2017).

### **5.6.2 *Escherichia coli***

A amostra será homogeneizada retirando a alíquota de 25 g da amostra e diluindo em 225 mL de água peptonada 0,1%. Depois serão realizadas diluições seriadas decimais (1 mL da diluição  $10^{-1}$  adicionados a 9 mL de diluente, e assim por diante até diluição  $10^{-3}$ ). De cada diluição do alimento, serão transferidos 1 mL para 3 tubos contendo o meio Lauryl Sulfato Triptose (LST), e serão incubados a 35 °C durante 48 horas. Decorrido o tempo de incubação serão identificados e separados os tubos positivos (com gás no interior do tubo de Durham), os demais serão dispensados. Será transferida uma alçada de cada tubo positivo de caldo LST para outro tubo contendo caldo *Escherichia coli* (caldo EC) e incubado a 44,5 °C durante 24 horas, após serão selecionados tubos positivos.

Para identificação de *E. coli*, a partir dos tubos positivos no caldo EC serão semeados com alça de platina através de estrias na superfície do ágar Levine Eosina Azul de Metileno (EMB) e incubadas a 35 °C durante 24 h. As colônias características de *E. coli* serão isoladas e submetidas a provas bioquímicas do IMVIC (Indol, Metil Red, Voges-Proskauer e Citrato). Os resultados serão expressos utilizando a tabela NMP para calcular o "Número Mais Provável" de coliformes termotolerantes por grama de alimento (ISO 7251, 2005).

### **5.6.3 *Microrganismos aeróbios mesófilos***

Novamente a amostra será homogeneizada retirando a alíquota de 25 g da amostra e diluindo em 225 mL de água peptonada 0,1%. Depois serão realizadas diluições seriadas decimais (1 mL da diluição  $10^{-1}$  adicionados a 9 mL de diluente, e assim por diante até diluição  $10^{-3}$ ). Após a diluição serão transferidos 1 mL de cada diluição para placas de Petri contendo ágar PCA (Plate Count Agar), que serão incubadas invertidas a 37 °C durante 48 horas. Decorrido o tempo de incubação, serão selecionadas placas contendo de 25 a 250 colônias e contadas com o auxílio de contador. Será calculado o número de unidades formadoras de colônias de bactérias aeróbias mesófilas por grama de amostra (UFC.g<sup>-1</sup>). Os resultados serão expressos em "Unidades Formadoras de Colônias" por grama de alimento (UFC/g) (ISO 4833, 2013).

#### **5.6.4 *Listeria monocytogenes***

Serão homogeneizadas 25 g da amostra com 225 mL de caldo de enriquecimento para listeria (LEB) e na sequência incubado a 30 °C por 24 horas. Após será transferido 0,1 mL do LEB para um tubo contendo 10 mL de caldo Fraser, que será incubado a 35 °C por 24 a 48 horas. Após isso serão transferidas alçadas dos tubos escurecidos para placas de ágar PALCAM e ágar Oxford e estas serão incubadas a 35 °C por 24-48 horas.

Para identificação de *Listeria monocytogenes*, as colônias suspeitas serão semeadas em tubos de ágar soja triptona com extrato de levedura (TSA-YE) e após se procederá a incubação a 35 °C por 24 horas. A partir destas culturas, serão realizados os testes bioquímicos (Catalase, motilidade, B-hemólise e fermentação de carboidratos). Os resultados serão fundamentados no aparecimento e identificação bioquímica de colônias características e expressos como "ausência" ou "presença" de *Listeria monocytogenes* em 25g de alimento (ISO 11290-1, 2017).

#### **5.7 Análise Sensorial**

O teste de aceitação e de intenção de compra será realizado nas formulações dos embutidos que serão submetidos a cocção. Análise sensorial dos embutidos será realizado no Laboratório de Análise Sensorial, na Universidade Federal de Pelotas. Os participantes que aceitarem participar do estudo irão assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina na Universidade Federal de Pelotas.

O teste de Aceitação será aplicado com no mínimo 50 (cinquenta) avaliadores, utilizando-se escala hedônica de 9 pontos, variando de “desgostei muitíssimo” (1) à “gostei muitíssimo” (9), com os atributos de impressão global, sabor, odor e cor. Serão servidas porções de 10 g em pratos de porcelana branca e codificadas com três dígitos aleatórios (GULARTE, 2009).

O teste de intenção de compra será realizado utilizando-se escala estruturada de cinco pontos, variando de “certamente não compraria” ( nota 1) a “certamente compraria” (nota 5). As amostras serão servidas em cabines

individuais sob luz branca, em pratos de porcelana, com codificação de três dígitos aleatórios. A ordem de apresentação será inteiramente casualizada (GULARTE, 2009).

### **5.8 Análise Estatística**

Será aplicada uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Fisher de Mínima Diferença Significativa (*LSD test*) para verificar se existirão diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as formulações utilizadas em relação a inibição microbiana, e para avaliar as diferenças nas características físico-químicas e sensoriais, será aplicado o teste de Tukey, ao nível ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa Statistix 10.

## 6 Orçamento do projeto

O projeto será realizado com recursos do PROAP-CAPES e via aprovação de custeio em editais provenientes de órgãos de fomento à pesquisa e com materiais já adquiridos pelo comitê de orientação. A lista completa de reagentes que serão utilizados no presente projeto está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Lista de reagentes que serão utilizados no projeto com a respectiva cotação.

<b>Produto</b>	<b>Valor (R\$)</b>
Ácido acético 1L	34,65
Ácido clorídrico 1L	80,00
Ácido clorofórmio 1L	68,40
Ácido tiobarbitúrico 1L	582,13
Ácido tricloroacético 1L	289,00
Ágar Bismuto Sulfito (BS) 500g	482,73
Ágar Hektoen-enteric 500g	754,50
Ágar Levine eosina azul de metileno (EBM) 500g	355,99
Ágar lisina ferro (LIA) 500g	459,20
Ágar Oxford 500g	425,44
Ágar palcam 500g	379,27
Ágar plate count (PCA) 500g	485,00
Ágar sangue de cavalo 500g	503,94
Ágar soja triptona (TSA) 500g	404,01
Ágar tríplice açúcar ferro (TSI) 500g	353,64
Ágar urease (UA) 500g	428,15
Ágar XLD 500g	384,22
Água peptonada tamponada 500g	147,77
Álcool etílico 1L	15,80
Caldo de enriquecimento para listeria (LEB) 500g	581,50
Caldo EC 500g	598,21
Caldo fraser 500g	293,52
Caldo lactosado bile verde brilhante (VBBL) 500g	656,80
Caldo lauril sulfato triptose (LST) 500g	490,21

---

Caldo Rappaport-Vassiliadis 500g	202,20
Caldo tetrionato 500g	497,73
Éter de petróleo 1L	122,41
Fenolftaleina 500mL	31,57
Hidróxido de potássio 1L	37,50
Hidróxido de sódio 1kg	18,00
Iodeto de potássio 100g	183,58
Solução de iodo 1L	228,70
Solução verde brilhante 500g	473,12
Sulfato de cobre pentahidratado 500g	45,90
Tartarato duplo de sódio e potássio 1 500g	190,73
Tiosulfato de sódio 1kg	69,00
<b>Total</b>	<b>11.355,02</b>

---

## **7 Resultados e impactos esperados**

Espera-se com este estudo que a utilização conjunta da nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e de extrato de beterraba apresente efeito antimicrobiano frente as bactérias *Salmonella*, *Escherichia coli*, Aeróbios mesófilos e *Listeria monocytogenes* e evite a perda da coloração causada pela redução de nitrito, mantendo ou até melhorando a coloração do produto, sem afetar a estabilidade físico-química. Também, que estes resultados sejam uma alternativa promissora para substituição de conservantes químicos artificiais em embutidos cárneos, diminuindo riscos à saúde e atendendo as necessidades e expectativas dos consumidores.

## **8 Contribuições científicas**

Como resultado vislumbra-se o aumento do conhecimento em relação a temática da conservação e da segurança de alimentos. Contribuindo para a ampliação e aprofundamento do conhecimento na linha de aplicação de substâncias bioativas naturais.

As ações previstas envolverão também a divulgação dos resultados do projeto através da publicação de trabalhos em congressos, elaboração de uma dissertação de mestrado e de artigos científicos.

## 9 Cronograma do Projeto

O projeto está dividido conforme apresentação na Tabela 3. A revisão bibliográfica será realizada de forma contínua, visando dar consistência à discussão dos resultados obtidos no presente projeto.

Tabela 3. Cronograma resumido de atividades do projeto

<b>Tarefa</b>	<b>2021/2</b>	<b>2022/1</b>	<b>2022/2</b>	<b>2023/1</b>
Revisão bibliográfica	X	X	X	
Aprimoramento do projeto	X	X	X	
Obtenção do extrato de beterraba e avaliação físico-química		X	X	
Obtenção e avaliação de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho em água (o/a)		X	X	
Elaboração e aplicação de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho (o/a) e extrato de beterraba em embutido cárneo			X	X
Armazenamento e avaliação microbiológica			X	X
Análise estatística			X	X
Análise dos resultados			X	X
Redação da dissertação				X
Elaboração do artigo				X
Defesa da dissertação				X

## 10 Referências Bibliográficas

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

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 20<sup>a</sup> ed. Washington. 2016.

AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS: Champaign, 2003.

BELLUCCI, Elisa Rafaela Bonadio. **Influência da adição de betalaína em embutido Toscana com diferentes níveis de nitrito de sódio sobre as propriedades tecnológicas e sensoriais**.81f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) -Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto-SP, 2018.

BHAVANIRAMYA, S.; VISHNUPRIYA, S.; AL-ABOODY, M. S.; VIJAYAKUMAR, R.; BASKARAN, D. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. **Grain & oil science and technology**, v. 2, n. 2, p. 49-55, 2019.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa n. 60, de 23 de dezembro de 2019**. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília 26/12/2019, Seção 1, p. 133, 2019.

BRASIL. Ministério da saúde . **Resolução da Diretoria Colegiada n. 272, de 14 de março de 2019**. Estabelece os aditivos autorizados para uso em carnes e produtos cárneos. Diário Oficial da União, Brasília 18/03/2019, Ed. 52, Seção 1, p. 194, 2019.

CAVALIN, P. B. B.; SARMIENTO, J. J. P.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G.; OCAÑA, A. N.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Detection of Salmonella spp. and diarrheagenic Escherichia coli in fresh pork sausages. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 4, p. 1533-1545, 2018.

CHHIKARA, N.; KUSHWAHA, K.; SHARMA, P.; GAT, Y.; PANGHAL, A. Bioactive compounds of beetroot and utilization in food processing industry: A critical review. **Food chemistry**, v. 272, p. 192-200, 2019.

DA SILVA, B.D.; BERNARDES, P.C.; PINHEIRO, P.F.; FANTUZZI, E.; ROBERTO, C.D. Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. **Meat Science**, v. 176, p. 108463, 2021.

EHUWA, O; JAISWAL, A. K.; JAISWAL, S. Salmonella, food safety and food handling practices. **Foods**, v. 10, n. 5, p. 907, 2021.

FALLEH, H.; JEMAA, M. B.; SAADA, M.; KSOURI, R. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. **Food chemistry**, v. 330, p. 127268, 2020.

FELÍCIO, Isabela Motta. **Desenvolvimento de sistema nanoemulsionado contendo óleo de carvacrol como aditivo alimentar antimicrobiano**. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência Farmacêuticas) - Centro de Ciências Biológicas e da saúde, Universidade estadual da Paraíba, Capina Grande, Paraíba, 2020.

FLORES, Mónica; TOLDRÁ, Fidel. Chemistry, safety, and regulatory considerations in the use of nitrite and nitrate from natural origin in meat products- Invited review. **Meat Science**, v. 171, p. 108272, 2021.

FRANCO, R. M.; MANTILLA, S. P. S.; DE OLIVEIRA, L. A. T. Checking the viability of Escherichia coli pathogens in fresh pork sausage. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 3, p. 319-325, 2010.

FRAQUEZA, M. J.; LARANJO, M.; ELIAS, M.; PATARATA, L. Antibacterial and antibiofilm activities of thyme oil against foodborne multiple antibiotics-

resistant *Enterococcus faecalis*. **Current Opinion in Food Science**, v. 38, p. 32-39, 2021.

GARAVAND, F.; JALAI-JIVAN, M.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Encapsulation of phenolic compounds within nano/microemulsion systems: A review. **Food Chemistry**, v. 364, p. 130376, 2021.

GHADERI-GHAHFAROKHI, M.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M. A.; GAVLIGHI, H. A.; GARDINI, F. Chitosan-cinnamon essential oil nano-formulation: Application as a novel additive for controlled release and shelf life extension of beef patties. **International journal of biological macromolecules**, v. 102, p. 19-28, 2017.

GONÇALVES, Bárbara Sofia Gomes. **Pigmentos naturais de origem vegetal: Betaláínas**. 54f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de ciências e tecnologias, Universidade de Algarve, Faro, Portugal, 2018.

GULARTE, M. A. **Análise sensorial**. Pelotas: Ed. Universitária, 2009. 66p.

GUO, M.; ZHANG, L.; HE, Q.; ARABI, S. A.; ZHAO, H.; CHEN, W.; YE, X.; LIU, D. Synergistic antibacterial effects of ultrasound and thyme essential oils nanoemulsion against *Escherichia coli* O157: H7. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 66, p. 104988, 2020.

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

ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp - Part 1: Detection Method.

ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colonycount at 30 degrees C by the pour plate technique.

ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration and Serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp.

ISO 7251:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli*. Most probable number technique.

JORDAN, K.; HUNT, K.; LOURENCO, A.; PENNONE, V. *Listeria monocytogenes* in the food processing environment. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 5, n. 2, p. 106-119, 2018.

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

LIU, F.; JIN, P.; GONG, H.; SUN, Z.; DU, L.; WANG, D. Antibacterial and antibiofilm activities of thyme oil against foodborne multiple antibiotics-resistant *Enterococcus faecalis*. **Poultry Science**, v. 99, n. 10, p. 5127-5136, 2020.

MANESSIS, G.; KALOGIANNI, A. I.; LAZOU, T.; MOSCHOVAS, M.; BOSSIS, I.; GELASAKIS, A. I. Plant-derived natural antioxidants in meat and meat products. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1215, 2020.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Projeção do Agronegócios no Brasil 2020/21 a 2030/31. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio>. Acessado em: Março 2022.

MEIRELES, B. R. L. D. A.; VITOR, R. C. L.; MORAIS, S. K. Q.; BARBOSA, T. C. M.; COSTA, S. D. S.; FONSECA, S. B. D. Evaluation of the potential coloring and antioxidant of betalains (*Beta vulgaris*, L.) in chicken mortadella. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, e237973995, 2020.

NIETO, Gema. A review on applications and uses of thymus in the food industry. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 961, 2020.

NOWACKA, M.; TAPPI, S.; WIKTOR, A.; RYBAK, K.; MISZCZYKOWSKA, A.; CZYZEWSKI, J.; DROZDZAL, K.; WITROWA-RAJCHERT, D.; TYLEWICZ,

U. The impact of pulsed electric field on the extraction of bioactive compounds from beetroot. **Foods**, v. 8, n. 7, p. 244, 2019.

PAPADOCHRISTOPOULOS, A.; KERRY, J. P.; FEGAN, N.; BURGESS, C. M.; DUFFY, G. Natural anti-microbials for enhanced microbial safety and shelf-life of processed packaged meat. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1598, 2021.

PAVELQUESI S. L. S.; DE JESUS GOMES, B. I. B.; FRANCA, S. R.; DA SILVA, I. C. R.; ORSI, D. C. Qualidade microbiológica de embutidos de frango do tipo frescal comercializadas no Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, v. 15, n. 2, p. 9, 2021.

PAVONI, L.; PERINELLI, D. R.; BONACUCINA, G.; CESPI, M.; PALMIERI, G. F. An overview of micro-and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. **Nanomaterials**, v. 10, n. 1, p. 135, 2020.

RADI, M.; AKHAVAN-DARABI, S.; AKHAVAN, H. R.; AMIRI, S. The use of orange peel essential oil microemulsion and nanoemulsion in pectin-based coating to extend the shelf life of fresh-cut orange. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 2, p. e13441, 2018.

RADÜNZ, M.; DA TRINDADE, M. L. M.; CAMARGO, T. M.; RADÜNZ, A. L.; BORGES, C. D., GANDRA, E. A.; HELBIG, E. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. **Food chemistry**, v. 276, p. 180-186, 2019.

RUIZ-CAPILLAS, C.; HERRERO, A.M.; PINTADO, T.; DELGADO-PANDO, G. Sensory analysis and consumer research in new meat products development. **Foods**, v. 10, n. 2, p. 429, 2021.

SÁNCHEZ, Iván C.; ALBARRACÍN, William. Análise sensorial da carne. **Revista Colombiana de Ciências Pecuarias**, v. 23, n. 2, p. 227-239, 2010.

SANTOS, Cláudia Destro dos. **Extração, clarificação e estabilização de betalaínas provenientes de talos de beterraba vermelha (*Beta vulgaris*)**

L.).165f. Tese (Doutorado em engenharia) -Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre-RS,2017.

SOARES, V. M.; PADILHA, M. B.; GUERRA, M. E. D. M.; SCHNEIDER, F. A.; GASPARETTO, R.; SANTOS, E. A. R. D.; TADIELO, L. E.; BRUM, M. C. S.; TRAESEL, C. K.; PEREIRA, J. G. Identification of Salmonella spp., Listeria monocytogenes, and indicator microorganisms in commercialized raw meats and fresh sausages from Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v. 51, 2021.

ŠOJIĆ, B.; PAVLIĆ, B.; IKONIĆ, P.; TOMOVIĆ, V.; IKONIĆ, B.; ZEKOVIĆ, Z.; TANACKOV S. L.; JOKANOVIĆ, M.; ŠKALJAC S.; IVIĆ, M. Coriander essential oil as natural food additive improves quality and safety of cooked pork sausages with different nitrite levels. **Meat science**, v. 157, p. 107879, 2019.

VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in thricloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v. 72, n.12, p.1084-1087, 1970.

WAN, J.; ZHONG, S.; SCHWARZ, P.; CHEN, B.; RAO, J. Enhancement of antifungal and mycotoxin inhibitory activities of food-grade thyme oil nanoemulsions with natural emulsifiers. **Food Control**, v. 106, p. 106709, 2019.

WANG, M.; QAZI, I.H.; WANG, L.; ZHOU, G.; HAN, H. Mengyao. Salmonella virulence and immune escape. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 407, 2020.

YANG, Z.; HE, Q.; ISMAIL, B. B.; HU, Y.; GUO, M. Ultrasonication induced nano-emulsification of thyme essential oil: Optimization and antibacterial mechanism against Escherichia coli. **Food Control**, v. 133, p. 108609, 2022.

## 6. Relatório de campo

Não foi realizada a determinação do teor de açúcares na beterraba, optando-se por fazer apenas sólidos solúveis, sendo mais adequado ao objetivo do estudo.

Acrescentou-se a análise de atividade antimicrobiana das nanoemulsões para avaliar de forma mais específica o efeito antibacteriano destas.

Nos ingredientes, a carne suína foi substituída pela carne bovina, em razão da matéria-prima ser mais acessível e para avaliar melhor o efeito das nanoemulsões e do extrato de beterraba, diminuindo a variabilidade das matérias-primas.

Não foi realizada a determinação do índice de peróxidos, pois estes produtos seriam pesquisados apenas na fração lipídica dos embutidos, considerando que este componente estava em baixo percentual, muita amostra seria requerida para análise, fato que inviabilizou sua realização. Para avaliar a presença de produtos de oxidação, optou pela avaliação do coeficiente de extinção específica  $K_{232nm}$  e  $K_{270nm}$ .

A análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), foi substituída pela determinação do índice de p-anisidina, considerando a disponibilidade de reagentes para esta última determinação e similaridade das informações obtidas.

No teste relacionado a análise sensorial, optou-se por ordenação múltipla ao invés de teste de aceitação, considerando que este seria mais adequado aos objetivos do estudo.

## 7. Artigo

## **Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando nanoemulsão de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e extrato de beterraba (*Beta vulgaris* L.)**

### **Resumo**

O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) tem sido amplamente utilizado na área alimentícia por possuir forte atividade inibitória contra patógenos de origem alimentar ou bactérias deteriorantes. No entanto, sua aplicação em alimentos é limitada devido a sua alta volatilidade, baixa solubilidade em água e forte transferência de sabor e odor. Desta maneira, sua encapsulação torna-se uma alternativa, dentre os métodos destacam-se as nanoemulsões, comumente usadas como sistemas de entrega para incorporar compostos bioativos lipofílicos, como óleos essenciais. Diante disso o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da utilização conjunta de nanoemulsões com óleo essencial de tomilho (NEOT) e extrato de beterraba em embutidos cárneos para manutenção das características sensoriais e microbiológicas e para redução parcial ou total do uso de nitrato e nitrito de sódio. Primeiramente, elaboram-se as nanoemulsões de óleo essencial de tomilho (NEOT), e testou-se a atividade antimicrobiana, também foi elaborado um extrato de beterraba e analisado, posteriormente foram elaborados embutidos cárneos com NEOT 5% e extrato de beterraba por meio de três formulações (Com mix de conservantes, redução de 50% do mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado e sem mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado) que foram avaliadas em relação a presença de bactérias, análises físicas e sensorialmente. Foi possível observar que a nanoemulsão de óleo essencial de tomilho 5% apresentou atividade antimicrobiana frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Houve aumento no teor de umidade e acidez dos embutidos durante o armazenamento para as formulações com NEOT e extrato de beterraba em pó. Os embutidos com adição de NEOT e extrato de beterraba apresentaram baixos níveis de produtos de oxidação primária e a secundária durante o armazenamento e a adição do extrato de beterraba intensificou a coloração do embutido frescal. Na análise sensorial, no teste de ordenação múltipla, as amostras não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) e os embutidos tiveram uma boa aceitação. Assim, observou-se que o uso conjunto de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba em pó manteve estáveis as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do produto, tendo potencial para substituição de nitrato e nitrito em embutidos cárneos.

Palavras-chave: Produtos cárneos; nanotecnologia; nanopartículas; Oxidação lipídica; betalaínas.

## Abstract

Thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) has been widely used in the food industry because it has strong inhibitory activity against foodborne pathogens or spoilage bacteria. However, its application in food is limited due to its high volatility, low water solubility and strong flavor and odor transfer. In this way, its encapsulation becomes an alternative, among the methods, nanoemulsions stand out, commonly used as delivery systems to incorporate lipophilic bioactive compounds, such as essential oils. In view of this, the objective of the study was to evaluate the effect of the joint use of nanoemulsions with thyme essential oil (NEOT) and beet extract in meat sausages to maintain the sensorial and microbiological characteristics and to partially or totally reduce the use of nitrate and nitrite of sodium. First, nanoemulsions of essential oil of thyme (NEOT) are prepared, and the antimicrobial activity is tested, a beet extract was also prepared and analyzed, later meat sausages with NEOT 5% and beet extract were prepared through three formulations (with a mix of preservatives, a 50% reduction in the mix of preservatives and the addition of NEOT and dried beetroot extract and without a mix of preservatives and the addition of NEOT and dried beetroot extract) that were evaluated for the presence of bacteria, physical and sensory analyses. It was possible to observe that the 5% thyme essential oil nanoemulsion showed antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. There was an increase in the moisture content and acidity of sausages during storage for formulations with NEOT and powdered beet extract. Sausages with the addition of NEOT and beet extract showed low levels of primary and secondary oxidation products during storage and the addition of beet extract intensified the color of the fresh sausage. In the sensory analysis, in the multiple ordering test, the samples did not show significant differences ( $p < 0.05$ ) and the sausages were well accepted. Thus, it was observed that the joint use of thyme essential oil nanoemulsion and powdered beet extract maintained the microbiological, physical-chemical and sensory characteristics of the product stable, having the potential to replace nitrate and nitrite in meat sausages.

Keywords: Meat products; nanotechnology; nanoparticles; Lipid oxidation; betalains.

## 1. Introdução

Os embutidos cárneos são alimentos perecíveis devido as suas características intrínsecas sofrendo em determinadas situações rápida deterioração, sendo o crescimento microbiano e a oxidação lipídica os principais fatores que causam deterioração destes produtos. Além do problema de perecibilidade nestes produtos, o uso de conservantes químicos sintéticos tende a ser diminuído, devido a crescente conscientização do consumidor sobre efeitos potencialmente nocivos, relacionados ao uso de substâncias como nitratos e nitritos de sódio. Diante disso, o uso de novos ingredientes naturais para formulação e produção de produtos sem adição de conservantes químicos sintéticos e com propriedades funcionais tem sido uma das prioridades do setor de pesquisa e desenvolvimento nesta área (AMINZARE et al., 2022; ŠOJIC et al., 2018).

Os óleos essenciais são compostos derivados de plantas aromáticas que são comumente empregadas na preparação de alimentos. São considerados antimicrobianos naturais com ação contra bactérias, vírus e fungos. Sendo reconhecidos como seguros para consumo humano como aditivos alimentares na União Europeia (FAO, 2012). O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) tem sido foco de estudos na área alimentícia, por possuir forte atividade inibitória contra patógenos de origem alimentar ou bactérias deteriorantes, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Typhimurium*. Os efeitos antibacterianos do óleo estão relacionados a presença de alto teor de timol na sua composição, que atua na membrana citoplasmática causando danos a célula bacteriana (HUSSEIN et al., 2021; ALMASI et al., 2021).

No entanto, sua aplicação em alimentos é limitada devido a sua alta volatilidade, baixa solubilidade em água e transferência de forte sabor e odor ao produto alimentício. Diante disso, o uso de novas técnicas para carreamento e introdução dos óleos essenciais em produtos alimentícios, como nanoemulsões, tem chamado atenção a fim de superar estes desafios (ALMASI et al., 2021). Diversos autores reportam o uso de nanoemulsão como alternativa para

umentar a biodisponibilidade de óleos essenciais (HE et al., 2021; HE et al., 2022; HOJATI et al., 2022; SNOUSSI et al. 2022).

As nanoemulsões são sistemas cineticamente estáveis, formado por dois líquidos imiscíveis que quando dispersos formam glóbulos, de tamanho de partícula muito pequenos (20-500 nm). Sendo comumente usadas como sistemas de entrega para incorporar compostos bioativos lipofílicos, como óleos essenciais. Apresentam fácil preparo, por meio de métodos de alta energia como homogeneização de alta pressão, sonicação e microfluidização, além de utilizarem uma baixa concentração de surfactantes para sua preparação. As nanoemulsões podem ser facilmente incorporadas em matrizes alimentares, podendo ser empregadas no processamento de carnes, podendo ser utilizados como revestimento ou como ingrediente no preparo de embutidos cárneos (ALMASI et al., 2021; GARAVAND et al., 2021; OJEDA-PIEDRA et al., 2022).

A perda de cor durante o armazenamento dos produtos cárneos é um dos fatores que levam a utilização de substâncias promotoras da formação de pigmento na formulação destes produtos, porém sua utilização pode apresentar efeitos negativos na saúde humana, podendo causar alergias e em alguns estudos têm sido verificadas respostas carcinogênicas em consumo prolongado. Em vista disso, a utilização de corantes naturais vem crescendo nas indústrias, dentre os corantes naturais destaca-se o presente na beterraba. Na indústria a beterraba ou extrato de beterraba já é utilizado para melhorar a cor vermelha de pastas de tomate, sopas, molhos, sobremesas, compotas, geleias, doces, sorvetes e cereais matinais (CHHIKARA et al., 2019; MEIRELES et al., 2020). O extrato de beterraba é uma boa alternativa para utilização em produtos cárneos, considerando a tonalidade semelhante a encontrada em carnes, sendo que as betalainas são pigmentos nitrogenados encontrados em abundância nesta hortaliça (BELLUCCI, 2018).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da utilização conjunta de nanoemulsões com óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba em embutidos cárneos frescos para manutenção das características sensoriais e microbiológicas e para redução parcial ou total do uso de nitrato e nitrito de sódio.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Materiais**

Foi utilizado o óleo essencial de tomilho branco (*Thymus vulgaris* L.), obtido comercialmente da empresa Ferquima, Indústria e Comércio de Óleos Essenciais, acondicionado em frasco âmbar, lacrados, com volume total de 100 mL. As beterrabas e os demais ingredientes para formulação dos embutidos cárneos foram obtidos em estabelecimentos comerciais da cidade de Pelotas, RS, Brasil.

### **2.2 Obtenção do extrato de beterraba**

O extrato de beterraba foi obtido seguindo a metodologia utilizada por Lages et al. (2021), onde o suco de beterraba foi extraído em extratora de suco (Juicer Compact Philips Walita, Brasil) e posteriormente liofilizado (Liotop L-101 – Liobras, Brasil) por 48 horas para obtenção do concentrado desidratado. Após foi acondicionado em um frasco de vidro hermeticamente fechado e armazenado em ultra freezer a temperatura de – 81 °C, até o momento da análise.

#### **2.2.1 Avaliação do concentrado líquido e desidratado**

##### **2.2.1.1 Umidade**

A determinação do teor de umidade foi realizada no concentrado líquido e desidratado através de secagem em estufa a 105 °C, a técnica consiste em pesar de 2 a 10 gramas de amostra em cápsula de porcelana (com peso conhecido e previamente seca em estufa) e levar a estufa para aquecimento a 105 °C. Após aproximadamente 4 horas, retirar da estufa e resfriar em dessecador e pesar até peso constante (AOAC, 2016).

##### **2.2.1.2 Sólidos solúveis**

A análise de sólidos solúveis totais foi realizada apenas no extrato de beterraba líquido, utilizando refratômetro de bancada do tipo Abbé (Quimis model Q-109B, Brasil), corrigido para 20°C (AOAC, 2016).

##### **2.2.1.3 Cor**

Para determinação de cor no concentrado líquido e desidratado foi utilizado um colorímetro Minolta CR 400, através do sistema de leitura CIELAB

(ComissionInternationale de E'clairage), representado pelos seguintes parâmetros: coordenada L\* expressa o grau de luminosidade da cor medida (L\* = 100 = branco; L\* = 0 = preto), a coordenada a\* expressa o grau de variação entre o vermelho (+60) e o verde (-60) e a coordenada b\* expressa o grau de variação entre o azul (-60) e o amarelo (+60). O Chroma é o índice de saturação e descreve a intensidade de uma cor, é calculado através da equação  $C^* = \sqrt{(a^*^2 + b^*^2)}$ . O ângulo Hue é o ângulo de tonalidade, indica a posição de amostra no diagrama de cromotividade, é calculado através da equação  $H^* = \tan^{-1} \left( \frac{b^*}{a^*} \right)$  (BELLUCCI, 2018).

#### 2.2.1.4 pH

A leitura de pH foi realizada apenas no extrato de beterraba líquido, utilizando um potenciômetro (Digimed pHmetro DM-20) (AOAC, 2016).

### 2.3 Preparação da nanoemulsão de óleo essencial de tomilho

As nanoemulsões foram preparadas no Laboratório de Microbiologia e Biosseparação da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Brasil. A fase oleosa da nanoemulsão foi composta por óleo essencial de tomilho e óleo de girassol, enquanto a fase aquosa foi água Milli-Q e Tween 20 como surfactante. Utilizou-se uma composição em que a fase oleosa seja de 10% (m/m), dispersa na fase aquosa 90%, da qual 1% (m/m) corresponderá ao emulsificante. Foram feitas 6 formulações preliminares apresentadas na Tabela 1, posteriormente foi feita a avaliação da atividade antimicrobiana destas nanoemulsões.

Tabela 1- Formulações das nanoemulsões de óleo essencial de tomilho.

Formulações	Composição (% m/m)				Processamento (Minutos)	
	Óleo de tomilho	Óleo de girassol	Água mili-q	Tween 20	Ultra turrax	Ultrassom
<b>F1</b>	1	9	89	1	3	-
<b>F2</b>	5	5	89	1	3	-
<b>F3</b>	1	9	89	1	3	1
<b>F4</b>	5	5	89	1	3	1
<b>F5</b>	0	10	89	1	3	-

<b>F6</b>	0	10	89	1	3	1
-----------	---	----	----	---	---	---

Primeiramente, foi preparada a fase aquosa por meio da homogeneização de tween 20 e água mili-Q, com auxílio de um agitador magnético por 5 min, em seguida foi pesada a fase oleosa e após dispersa na fase aquosa e efetuada homogeneização em Ultra Turrax (Modelo IKA T10 Basic) a 21.100 rpm por 3 min, seguida de Ultrassom (Modelo QSonica-Q700) a 40% de amplitude por 1 min. A metodologia utilizada seguiu as recomendações de GUO et al. (2020) e YANG et al. (2022), com modificações.

### **2.3.1 Análise de tamanho de gota, índice de polidispersibilidade e potencial Zeta**

Foram efetuadas análises com relação ao tamanho das gotas, índice de polidispersividade e potencial zeta ( $\zeta$ ), 24 h após a homogeneização. As emulsões foram avaliadas por espalhamento de luz dinâmica, utilizando o equipamento Litesizer 500 (Anton Paar, Brasil) conforme WAN et al., 2019.

### **2.4 Atividade antimicrobiana das nanoemulsões de óleo essencial de tomilho**

A avaliação do efeito antimicrobiano foi realizada por meio de três metodologias fenotípicas: difusão em ágar, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima. Foram testados os efeitos antimicrobianos da nanoemulsão de óleo essencial de tomilho frente as cepas padrão das espécies de bactérias *Escherichia coli* (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832).

#### **2.4.1 Reativação dos microrganismos**

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

bacteriano nas placas de Petri, foi extraída uma alçada e ressuspensa em solução salina (NaCl 0,85%), a qual foi padronizada na concentração 0,5 na escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ).

#### **2.4.2 Difusão em ágar**

A análise de difusão em ágar foi realizada de acordo com protocolo proposto pelo *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute* CLSI (2012a) com pequenas modificações. A solução salina contendo o inóculo foi semeada com auxílio de um swab estéril na superfície de placas com ágar Muller-Hinton. Em seguida foram feitos poços com aproximadamente 6 mm de diâmetro. Após adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  do composto (nanoemulsão com óleo essencial de tomilho) no poço e as placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. Logo após este período foi efetuada a medição dos halos de inibição, sendo os resultados expressos em centímetros.

#### **2.4.3 Concentração inibitória mínima (CIM)**

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com protocolo proposto pelo *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute* CLSI (2012b) com pequenas modificações. Para isto foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, onde foram acrescentadas em cada poço 100  $\mu\text{L}$  de caldo BHI, 100  $\mu\text{L}$  de inóculo (80  $\mu\text{L}$  de caldo BHI e 20  $\mu\text{L}$  de água salina com crescimento bacteriano) e o composto (nanoemulsão com óleo essencial de tomilho) em cinco diferentes concentrações (100  $\mu\text{L}$  de composto puro); 1:5 (20  $\mu\text{L}$  de composto e 80  $\mu\text{L}$  de caldo BHI); 1:1 (50  $\mu\text{L}$  do composto e 50  $\mu\text{L}$  de BHI); 1:10 (10  $\mu\text{L}$  de composto e 90  $\mu\text{L}$  de BHI); 1:100 (1  $\mu\text{L}$  de composto e 99  $\mu\text{L}$  de BHI). Após o preparo da amostra, as placas de microtitulação foram lidas em espectrofômetro (Biochrom EZ Read 400) em 620 nm. Em seguida, foram incubadas por 24 h a 37 °C, e após, foi realizada nova leitura em espectrofotômetro. A CIM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura.

#### **2.4.4 Concentração bacteriana mínima (CBM)**

Após a realização da CIM, foram retirados 15  $\mu\text{L}$  dos poços das amostras que tiveram inibição e estriados em placas de Petri com ágar soja triptona (TSA) e

incubados por 24 h a 37 °C. Foi considerada a mínima concentração bactericida as placas onde não houve crescimento bacteriano.

## **2.5 Preparação do embutido cárneo frescal adicionado de nanoemulsão do óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba**

Os embutidos cárneos foram elaborados no laboratório de Processamento de Alimentos de Origem Animal do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, Brasil, de acordo com as formulações apresentadas na Tabela 2. Na formulação controle foi adicionado um mix de conservantes para embutidos contendo sal iodado, açúcar, especiarias: cebola, alho e pimenta preta, estabilizante: tripolifosfato de sódio (INS451i), antioxidante: eritorbato de sódio (INS 316), aromatizante sintético idêntico ao natural, conservante: nitrito de sódio (INS 250) e corante natural: carmim cochonilha(INS 120) e corante idêntico ao natural: caramelo (INS 150 A) e foi seguido a dosagem recomendada pelo fabricante de utilizar 4kg para 100kg de embutido frescal. Além dos ingredientes utilizados na formulação controle, as formulações foram adicionadas de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba na proporção de 0,5% e 1,5%, respectivamente, usando como referência os valores utilizados por Lages et al. (2021).

Primeiramente todos materiais e utensílios a serem utilizados foram previamente limpos e sanitizados com álcool 70%. A carne utilizada foi adquirida moída, todos os ingredientes e aditivos foram previamente pesados e misturados formando uma massa cárnea. Em seguida a massa resultante foi embutida em tripas naturais suínas, em embutidora elétrica, após foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, identificadas e armazenadas a 7°C.

Tabela 2. Ingredientes utilizados na elaboração do embutido cárneo frescal em três formulações diferentes.

<b>Ingredientes/aditivos</b>	<b>Controle (%)</b>	<b>F1 (%)</b>	<b>F2 (%)</b>
<b>Carne magra</b>	75,2	74,9	75,9
<b>Gordura animal</b>	11,8	11,9	12,0
<b>Água gelada/ gelo</b>	7,5	7,1	7,2

<b>Mix de conservantes para embutidos</b>	3,9	2,0	-
<b>Sal</b>	-	0,5	1,2
<b>Açúcar</b>	-	0,1	0,2
<b>Pimenta do reino</b>	0,1	0,1	0,1
<b>Alho desidratado</b>	0,6	0,6	0,6
<b>Cebola desidratada</b>	0,8	0,8	0,8
<b>Nanoemulsão de óleo essencial de tomilho</b>	-	0,5	0,5
<b>Extrato de beterraba</b>	-	1,5	1,5

\*Controle: Formulação contendo mix de conservantes; F1: Formulação com redução de 50% do mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado; F2: Formulação sem mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado.

### **2.5.1 Avaliação da adição de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba desidratado em embutido cárneo**

#### **2.5.1.1 Avaliação microbiológica**

Os produtos foram elaborados de acordo com os tratamentos (formulações), foram mantidos em temperatura de refrigeração ( $\leq 7$  °C) por até catorze dias. Foi retirada uma amostra de 25 g em três tempos: logo após a elaboração do produto, sete dias após a elaboração do produto e catorze dias após a elaboração. Estas amostras foram submetidas a avaliação frente aos microrganismos preconizados pela Instrução Normativa n° 161 de 1° de julho de 2022, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vinculada ao Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2022), que são *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, Microrganismos aeróbios mesófilos e *Listeria monocytogenes*.

##### **2.5.1.1.1 *Salmonella spp***

A amostra foi homogeneizada retirando uma alíquota de 25 g, diluindo em 225 mL de água peptonada tamponada (pré-enriquecimento) e incubando a 37 °C, por 24 horas. Após foi realizada a etapa de enriquecimento, transferiu-se 1 mL de caldo de pré-enriquecimento para um tubo contendo 10 mL de caldo tetracionato e 0,1 mL para um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-

Vassiliadis. Após foi incubado o primeiro a 35 °C e o segundo a 42 °C (em banho-maria) por 24 horas. Após a incubação foram semeadas de cada cultura do enriquecimento placas de ágar XLD, ágar Bismuto Sulfito e ágar Hektoen-enteric (HE), de modo a obter colônias isoladas que foram incubados a 35 °C por 24 horas e após foram realizados teste de identificação bioquímica. Para identificação bioquímica, foram transferidas as colônias suspeitas para tubos contendo ágar tríplice açúcar ferro (TSI), inclinado, ágar lisina ferro (LIA) e ágar urease (UA), nesta ordem e utilizando a mesma picada, após foi realizada a incubação a 37 °C por 24 horas. Os resultados foram expressos como "ausência" ou "presença" de *Salmonella* spp em 25 g de alimento (ISO 6579-1, 2017).

#### **2.5.1.1.2 *Escherichia coli***

A amostra foi homogeneizada retirando a alíquota de 25 g da amostra, diluindo em 225 mL de água peptonada 0,1% e foram realizadas diluições seriadas decimais até a diluição  $10^{-3}$ . De cada diluição foram transferidos 1 mL para 3 tubos de ensaio contendo o meio Lauryl Sulfato Triptose (LST) e um tubo de Durham invertido, e foram incubados a 35 °C durante 48 horas. Decorrido o tempo de incubação foram identificados e separados os tubos positivos (com gás no interior do tubo de Durham), os demais foram dispensados. Foi transferida uma alçada de cada tubo positivo de caldo LST para outro tubo contendo caldo *Escherichia coli* (caldo EC) e incubado a 44,5 °C durante 24 horas, após foram selecionados os tubos positivos. Para identificação de *E. coli*, foram semeados com alça de níquel cromo através de estrias na superfície do ágar Levine Eosina Azul de Metileno (EMB) e incubadas a 35 °C durante 24 h. As colônias características de *E. coli* foram isoladas e submetidas a provas bioquímicas do IMVIC (Indol, Metil Red, Voges-Proskauer e Citrato). Os resultados foram expressos utilizando a tabela NMP para calcular o "Número Mais Provável" de coliformes termotolerantes por grama de alimento (ISO 7251, 2005).

#### **2.5.1.1.3 Microrganismos aeróbios mesófilos**

Novamente as amostras foram homogeneizadas retirando a alíquota de 25 g da amostra, diluindo em 225 mL de água peptonada 0,1% e realizadas diluições seriadas decimais até diluição  $10^{-3}$ . Após a diluição foi transferido 1 mL de cada diluição para placas de Petri contendo ágar PCA (*Plate Count Agar*), que foram incubadas invertidas a 37 °C durante 48 horas. Decorrido o tempo de incubação,

foi calculado o número de unidades formadoras de colônias de bactérias aeróbias mesófilas por grama de amostra (UFC.g<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em "Unidades Formadoras de Colônias" por grama de alimento (UFC.g<sup>-1</sup>) (ISO 4833, 2013).

#### **2.5.1.1.4 *Listeria monocytogenes***

Foram homogeneizadas 25 g da amostra com 225 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB) e na sequência incubado a 30 °C por 24 horas. Após foi transferido 0,1 mL do LEB para um tubo contendo 10 mL de caldo Fraser, que foi incubado a 35 °C por 24 a 48 horas. Após isso foram transferidas alçadas dos tubos escurecidos para placas de ágar PALCAM e ágar Oxford e incubadas a 35 °C por 24-48 horas. Para identificação de *Listeria monocytogenes*, as colônias suspeitas foram semeadas em tubos de ágar soja triptona com extrato de levedura (TSA-YE) e foram incubadas a 35 °C por 24 horas. A partir destas culturas, foram realizados os testes bioquímicos (Catalase, motilidade, B-hemólise e fermentação de carboidratos). Os resultados foram fundamentados no aparecimento e identificação bioquímica de colônias características e expressos como "ausência" ou "presença" de *Listeria monocytogenes* em 25 g de alimento (ISO 11290-1, 2017).

#### **2.5.1.2 Avaliação físico-química**

Conforme já descrito anteriormente os embutidos foram produzidos e armazenados sob refrigeração ( $\leq 7$  °C ) durante 14 dias, nos quais foram feitas as análises em três tempo: tempo 1 (0 dias); tempo 2 (7 dias) e tempo 3 (14 dias). Os produtos elaborados de acordo com cada tratamento (formulação) foram avaliados em triplicata.

##### **2.5.1.2.1 Análise de cor**

Foi realizado conforme descrito no item 2.2.1.3

##### **2.5.1.2.2 Análise de umidade**

Foi realizado conforme descrito no item 2.2.1.1

##### **2.5.1.2.3 Extração da gordura**

Foi feita a extração de gordura presente no embutido para posteriores análises, através do método de Bligh e Dyer, seguindo a metodologia proposta

por Brum et al. (2019), com modificações. Foram pesados aproximadamente 15 g de amostra em um erlenmeyer dotado de tampa, com uma mistura de solvente consistindo em 15 mL de clorofórmio e 30 mL de metanol, homogeneizou-se em mesa agitadora por 6 minutos, após completar a homogeneização adicionou-se 15 mL de clorofórmio e novamente foi agitado por mais 2 minutos. Em seguida filtrou-se a mistura, e o resíduo foi re-homogeneizado com 15 mL de clorofórmio e agitado por 4 minutos e filtrado novamente. Os filtrados foram combinados e adicionou-se 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5% e agitou-se por mais 2 minutos. A mistura foi transferida para um funil de decantação, deixando separar as camadas de forma natural, foi coletado a camada superior e adicionou-se 1 g de sulfato de sódio anidro e agitou-se por 2 minutos para remoção de traços de água, após filtrou-se em um funil com papel filtro. O filtrado foi colocado numa estufa a 80 °C até evaporar o solvente, a gordura foi armazenada até realização das próximas análises.

#### **2.5.1.2.4 Índice de acidez (IA)**

A determinação do IA foi realizada de acordo com a *American Oil Chemists Society* (AOCS) Ca 5a-40 (2003). Aproximadamente 2 g de amostra foram colocadas em *erlenmeyer* de 125 mL, adicionando 25 mL de solução éter:álcool (2:1, v/v) e agitou-se. Após, 2 gotas de fenolftaleína foram adicionadas, agitando-se novamente. Foi realizada a titulação utilizando uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,01 mol.L<sup>-1</sup> até coloração mudar para rósea, sendo os resultados expressos em % de ácido oleico, de acordo com a Equação 1:

$$IA (\%) = \frac{[V \times F \times 10 \times 0,0282]}{m}$$

Em que, V é o volume (mL) de NaOH gasto na titulação; F é o fator de correção do NaOH 0,01 mol.L<sup>-1</sup>; m é a massa (g) da amostra.

#### **2.5.1.2.5 Determinação de quantidade de aldeído por p-anisidina**

A quantidade de aldeídos por p-anisidina foi determinada de acordo com a AOCS Cd 18-90 (1989). Os resultados foram obtidos conforme a equação 2:

$$Ip - A = \frac{25 * (1,2As - Ab)}{g}$$

Onde:  $I_p - A$  = quantidades de aldeído por p-anisidina;  $A_s$  = Absorbância da solução de óleo após a reação com p-anisidina;  $A_b$  = Absorbância da solução de óleo em iso-octano.

#### **2.5.1.2.6 Determinação de coeficiente de extinção específica $K_{232}$ e $K_{270}$**

Pesou-se 0,25 g de gordura em balão volumétrico de 25 mL, completou-se o balão com iso-octano grau HPLC. Executou-se a leitura da solução em espectrofotômetro a 232 e 270 nm (IOOC, 2008).

#### **2.5.1.3 Avaliação sensorial**

A avaliação sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Brasil, com a participação de 55 julgadores não treinados, de ambos os sexos, pertencentes a comunidade acadêmica da UFPel. A ficha sensorial (anexo 1) foi elaborada através de formulário no Google Forms. Os embutidos foram preparados um dia antes da realização dos testes e mantidos sob refrigeração por cerca de 24 horas, posteriormente foram assados em forno elétrico à 200 °C por 30 minutos e servidos em pratos descartáveis. Foram avaliados os seguintes atributos: odor, cor, sabor e impressão global por meio uma escala estruturada de 7 pontos, em que o valor 1 correspondia a descrição “muito inferior” e o valor 7 a “muito melhor”. Foi realizado um teste de ordenação múltipla em que se utilizou uma formulação padrão como referência e as formulações F1 e F2 como amostras codificadas. Os avaliadores compararam as amostras codificadas e avaliaram se era superior, igual ou inferior a amostra padrão. Foi solicitado também aos julgadores que expressassem sua intenção de compra pelas amostras, utilizando uma escala estruturada de 5 pontos, indo de (1) “certamente não compraria” e (5) “certamente compraria”. O presente estudo, antes de ser realizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pelotas, Brasil, código CAAE: 29744220.3.0000.5317.

### **2.6 Análise Estatística**

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Fisher de Mínima Diferença Significativa (LSD test) para verificar se existiam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as formulações utilizadas em relação a inibição

microbiana. Para avaliar as diferenças nas características físico-químicas e sensoriais, foram aplicados o teste de Tukey, ao nível ( $p < 0,05$ ) e o teste de Dunnett bilateral, utilizando o programa Statistix 10.

### **3. Resultados e discussões**

#### **3.1 Atividade antimicrobiana das nanoemulsões de óleo essencial de tomilho**

Os resultados de difusão em ágar, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bacteriana mínima (CBM) estão expostos na Tabela 3. Através da técnica de difusão em ágar verificou-se que apenas o óleo essencial de tomilho apresentou ação antimicrobiana contra as duas bactérias, segundo Rota et al. (2008) quando os halos de inibição são maiores que 20 mm indicam forte atividade antimicrobiana, já as nanoemulsões não apresentaram ação antimicrobiana, pois não foi possível observar a formação de um halo de inibição ao redor do poço. Uma provável explicação para este resultado é que concentração utilizada de nanoemulsão não foi suficiente para exercer ação no meio. No estudo de El-Sayed & El-Sayed (2021) os resultados de atividade antimicrobiana indicaram que o óleo essencial de tomilho apresentou diferentes diâmetros de halo de inibição contra os distintos patógenos testados. O maior efeito inibitório foi observado contra *B. cereus* (halos variando entre 19 e 36 mm), seguido por *E. coli* (halos entre 16 e 32 mm) e *S. aureus* (entre 13 e 33 mm). Além disso, foi constatado que houve um aumento do efeito inibitório com o aumento da concentração de óleo essencial de tomilho.

Já na técnica de CIM as formulações F2, F3, F4 e F6 apresentaram ação inibitória frente as duas bactérias, sendo a formulação F2 e F4 as que apresentaram a menor concentração inibitória de  $0,0002 \mu\text{L} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Para a técnica de CBM apenas a formulação F4 apresentou ação bactericida, que foi de  $0,0083 \mu\text{L} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  para *E. coli* e  $0,0002 \mu\text{L} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  para *S. aureus* (Tabela 3). Diante disso a formulação F4 que contém 5% de óleo essencial de tomilho na sua formulação foi selecionada para dar seguimento ao estudo, uma vez que foi a nanoemulsão que apresentou melhor ação antibacteriana para as duas bactérias investigadas.

Tabela 3 – Atividade antimicrobiana de óleo essencial de tomilho puro e em nanoemulsões por meio da técnica de difusão em ágar, CMI e CBM.

Formulações	Difusão em ágar (mm)		CMI ( $\mu\text{L}.\mu\text{L}^{-1}$ )		CBM( $\mu\text{L}.\mu\text{L}^{-1}$ )	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<b>Óleo de tomilho</b>	31,1 ± 0,89	33,6 ± 0,59	0,003	0,003	0,003	0,003
<b>F1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>F2</b>	ND	ND	0,0002	0,0002	ND	ND
<b>F3</b>	ND	ND	0,0003	0,00003	ND	ND
<b>F4</b>	ND	ND	0,0002	0,0002	0,0083	0,0002
<b>F5</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>F6</b>	ND	ND	0,33	0,167	ND	ND

\*ND – Não detectado. F1- formulação com 1% de óleo de tomilho; F2- formulação com 5% de óleo de tomilho; F3- formulação com 1% de óleo de tomilho e tratamento com ultrassom; F4- formulação com 5% de óleo de tomilho e tratamento com ultrassom; F5- formulação sem óleo de tomilho; F6- formulação sem óleo de tomilho e tratamento com ultrassom.

Assim como ocorreu neste estudo, a estratégia de utilizar o óleo essencial de tomilho na forma de nanoemulsão aumentou a efetividade do efeito inibitório deste óleo essencial, conforme verificado nos estudos de Guo et al. (2020) e de Zhang et al. (2020). Um estudo realizado por Guo et al. (2020) avaliou o efeito antimicrobiano sinérgicos de ultrassom e nanoemulsão de óleo essencial de tomilho contra *Escherichia coli* O157:H7, os resultados mostraram uma redução da população de *E. coli* em até 7,72 logs, a nanoemulsão com ultrassom aumentou notavelmente a permeabilidade da membrana celular, alterando a morfologia e a microestrutura das células, resultando em mais vazamento de constituintes internos. Segundo o estudo realizado por Zhang et al. (2020) que avaliaram as propriedades de automontagem do caseinato de sódio para preparar nanoemulsões com caseinato e óleo de tomilho, observou-se que a nanoemulsão melhorou a atividade antimicrobiana do óleo de tomilho contra *E. coli* O157:H7 e *S. aureus*.

Bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa composta por lipolissacarídeos, que atuam como uma barreira contra a difusão do óleo essencial, protegendo a membrana citoplasmática, sendo mais resistente que a bactérias Gram-positivas (SILVA et al., 2021; MANTZOURANI et al., 2022). É

possível observar neste estudo que a concentração bactericida mínima foi maior para *E. coli* (Tabela1, F4), podendo ser pelo fato de se tratar de uma bactéria Gram-negativa.

### **3.2 Caracterização da Nanoemulsão**

Após as análises preliminares a formulação F4, que contém 5% de óleo essencial de tomilho foi selecionada para dar seguimento os estudos. O valor do potencial Zeta é utilizado como indicativo de estabilidade das gotículas de óleo contra agregação e coalescência. Observou-se que a nanoemulsão apontou um valor de -27,42 mV, apresentando assim forças eletrostáticas e alta estabilidade. Diversos autores relatam que valores absolutos próximos a 30 mV estão relacionadas com a força de repulsão eletrostática e alta estabilidade físico-química (LIU & LIU, 2020; MIRSHARIFI et al., 2023; SILVA et al., 2022). A carga elétrica do tipo de surfactante usado, o pH e forças iônicas da solução são fatores que pode influenciar o potencial zeta. A utilização de tensoativos não iônicos pode conferir estabilidade por meio da formação de um filme interfacial ao redor da gotícula, capaz de proporcionar repulsões estéricas (SILVA et al., 2022). Segundo o estudo exposto por Mirsharifi et al. (2023) no qual foram avaliadas nanoemulsões com óleo essencial de tomilho com concentrações de 2% e 4%, foram encontrados valores de potencial Zeta de -37,4 e - 37,1 mV, respectivamente, indicando uma forte repulsão eletrostática.

Foi possível observar (Figura 1) que a nanoemulsão apresentou estreita distribuição de tamanho de gotículas, sendo observado apenas um pico de intensidade, indicando que as gotículas da nanoemulsão ficaram dentro desta faixa de dimensão. O diâmetro médio, apresentado foi de 201,7 nm, demonstrando a estrutura adequada da nanoemulsão . Pequenas dimensões de gotículas podem significar que as nanoemulsões apresentam uma boa estabilidade física, contra separação gravitacional, floculação e coalescência (CHANG et al., 2015).

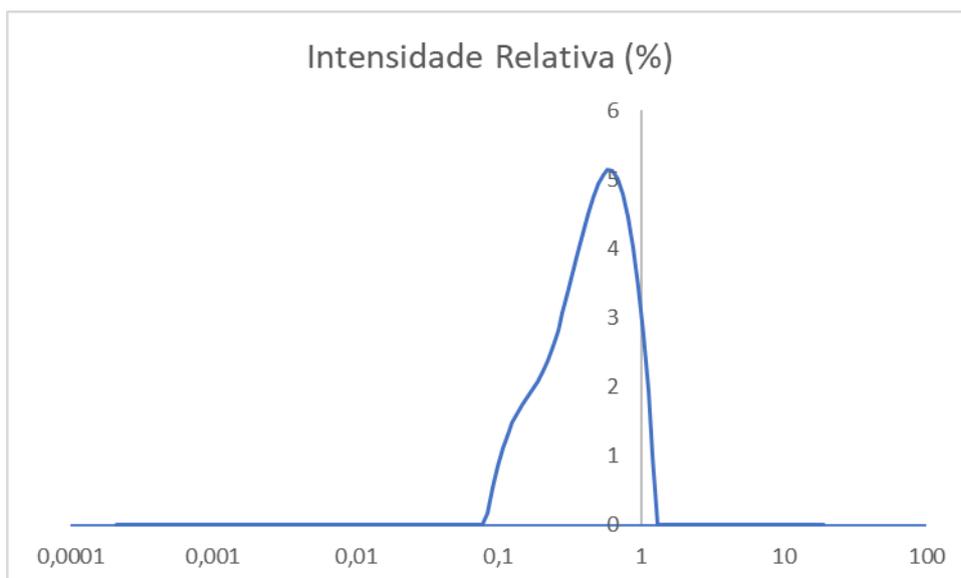


Figura 1 - Intensidade relativa por diâmetro de partícula da nanoemulsão de óleo essencial de tomilho.

O índice de polidispersão (PDI) representa a homogeneidade do tamanho da gota na nanoemulsão, na amostra em estudo foi possível observar um valor de 0,2719. Indicando que há uniformidade nos tamanhos das gotas da nanoemulsão. Um pequeno valor de PDI (<0,08) indica partículas quase monodispersas, enquanto um grande valor de PDI (>0,7) mostra uma ampla distribuição de tamanho de partícula (MIRSHARIFI et al., 2023). Segundo o estudo realizado por El-Sayed & El-Sayed (2021) no qual também foi produzida uma nanoemulsão com óleo essencial de tomilho, o diâmetro médio foi de cerca de 52 nm e o índice de polidispersão foi de 0,15, valores que diferem dos encontrados no presente estudo.

### 3.3 Extrato de beterraba líquido e desidratado

Estão apresentados nas Tabela 5 os resultados obtidos nas avaliações físico-químicas do extrato de beterraba líquido e desidratado.

Tabela 4: Análises físico-químicas do extrato de beterraba líquido e desidratado.

	Extrato de beterraba Líquido	Extrato de beterraba desidratado
Sólidos solúveis (° Brix)	11,70 ± 0,0	-
pH	5,89 ± 0,1	-

<b>Umidade (%)</b>	89,82 ± 0,0	21,12 ± 3,6
<b>Cor L*</b>	14,61 ± 0,4	8,06 ± 0,0
a*	-0,57 ± 0,0	0,89 ± 0,1
b*	3,11 ± 0,2	4,07 ± 0,0

O resultado obtido na determinação de umidade para o extrato de beterraba líquido mostrou um alto conteúdo de água (89,82%), sendo o valor próximo ao reportado por outros autores como Lages et al. (2021) e Kale et al. (2018), que encontraram para o suco de beterraba 89,46% e 87,4%, respectivamente. Após a liofilização, ocorreu uma diminuição do teor de umidade para 21,12%, consequentemente aumentando o teor de matéria seca. De acordo com Lages et al. (2021) esta redução é benéfica, uma vez que está diretamente relacionada com a vida útil do produto, já que os microrganismos necessitam de água para seu desenvolvimento e multiplicação.

O teor de sólidos solúveis encontrado no estudo foi de 11,7 °Brix, sendo superior ao encontrado por outros autores como Lages et al. (2021) e Kale et al. (2018) que obtiveram teores de 10,6 e 9,0 °Brix, respectivamente. Šlosár et al. (2020) verificaram que o teor de sólidos solúveis variou de 7,0 a 10,8 °Brix em polpas de beterraba de diferentes cultivares. A variação no teor de sólidos solúveis, está associada a cultivar da beterraba, além de que estes valores podem ser afetados por fatores externos como o sistema de crescimento, estresse hidrofílico, fatores climáticos, maturação e até mesmo o processamento após a colheita (ŠLOSÁR et al., 2020). Em relação a análise de pH o valor encontrado foi de 5,89, valor próximo ao encontrado por outros autores. Kale et al. (2018) reportam o valor de 6,3 para o pH do suco de beterraba, e para Lages et al. (2021) de 6,62.

Quanto aos parâmetros de cor, foi possível observar a que a luminosidade tende ao escuro, tanto no extrato de beterraba líquido como no desidratado (14,61± 0,4 e 8,06± 0, respectivamente), pois este parâmetro varia de 100 (branco) a 0 (preto). Também é possível observar que o extrato de beterraba em desidratado tem uma tendência mais acentuada ao escuro, devido a concentração da matéria seca após a liofilização. Já para os valores de cromaticidade, o parâmetro a\* foi de -0,57 ± 0 para o extrato líquido e 0,89 ± 0,1

para o desidratado, considerando que a coordenada  $a^*$  expressa o grau de variação entre o vermelho (+60) e o verde (-60), pode-se notar que houve um aumento do parâmetro após a liofilização, indicando a intensificação da tendência ao vermelho. O parâmetro  $b^*$ , com valor de  $3,11 \pm 0,2$  para o extrato líquido e  $4,07 \pm 0$  para o desidratado, também mostrou aumento, considerando que as coordenadas  $b^*$  variam entre o azul (-60) e o amarelo (+60), observa-se ligeira tendência a intensificação de componentes amarelos no desidratado. A variação das cores do vermelho ao amarelo para o extrato de beterraba está dentro do esperado, considerando os pigmentos presentes, que são as betalaínas.

### 3.4 Avaliação da adição de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba desidratada no embutido cárneo.

#### 3.4.1 Análise microbiológica

O perfil microbiológico do embutido frescal bovino adicionado de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba durante 14 dias de armazenamento sob refrigeração ( $\leq 7^{\circ}\text{C}$ ) encontra-se descrito na Tabelas 6 e na Figura 2 a seguir.

Tabela 5: Médias das contagens de bactérias mesófilas aeróbias em três formulações de embutidos frescos bovinos em diferentes tempos de armazenamento a  $7^{\circ}\text{C}$ .

Formulações	TEMPO (Dias)		
	0 (Log.UFC.g <sup>-1</sup> )	7 (Log.UFC.g <sup>-1</sup> )	14 (Log.UFC.g <sup>-1</sup> )
<b>F0</b>	0,4 ± 0,7aA	0,3 ± 0,3aA	1,0 ± 1,2aA
<b>F1</b>	0,7 ± 1,1aA	0,6 ± 0,2aA	0,7 ± 0,6aA
<b>F2</b>	0,6 ± 1,0aA	0,6 ± 0,3aA	1,3 ± 0,7aA

Letras minúsculas iguais nas linhas e letras maiúsculas iguais nas colunas indicam que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) pelo teste Tukey, F0: Formulação contendo mix de conservantes; F1: Formulação com redução de 50% do mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado; F2: Formulação sem mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado.

Na contagem de bactérias mesófilas aeróbicas para as três formulações verificou-se que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao decorrer do tempo de armazenamento. Observou-se que não foi significativo a diferença entre as formulações apresentadas, isso quer dizer que a formulação com uso de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho 5% teve um comportamento estaticamente igual a formulação com uso de conservantes químicos.

Observando a figura 3 é possível observar que a formulação F1 que contém 50% de conservante e NEOT 5% apresentaram uma linha mais linear mantendo a concentração bacteriana final igual a inicial, isso mostra uma sinergia entre o uso de nitratos e nitritos associados a utilização da NEOT. Enquanto as formulações F0 (100% de conservante) e a formulação F2 (100% NEOT) apresentaram um aumento da população bacteriana após o período de 14 dias de armazenamento, porém estas variações não são estatisticamente significativas. A diminuição da contagem microbiana era esperada, uma vez que óleo essencial de tomilho apresenta princípios ativos que são conhecidos por inibir o desenvolvimento de organismos patogênicos e deteriorantes (SHARMA et al., 2017).

Autores vêm estudando o efeito sobre o perfil microbiológico do óleo essencial de tomilho em matrizes alimentares. No Estudo realizado por Agrimonti et al. (2019) em que foram produzidas almofadas celulósicas enriquecidas com emulsão de óleo essencial de tomilho e orégano verificou-se atividade antimicrobiana contra microbiota psicrófila da carne moída e alguns patógenos alimentares comuns. Já Radünz et al. (2020) avaliaram o potencial antioxidante e antimicrobiano *in vitro* e *in situ* de encapsulado de óleo essencial de tomilho em produto cárneo tipo hambúrguer, verificaram que o encapsulado apresentou potencial para atuar como conservante em hambúrgueres. Vafania et al. (2019) avaliaram a utilização de nanofibras contendo óleo essencial de tomilho para reduzir nitrito em salsichas, os resultados mostraram que o óleo essencial de tomilho encapsulado nas nanofibras não apresentou diferença significativa na atividade antimicrobiana contra *C. perfringens* em comparação as salsichas com nitrito, concluíram que o óleo essencial de tomilho nanoencapsulado (nanofibras) pode ser uma alternativa adequada ao nitrito em produtos cárneos.

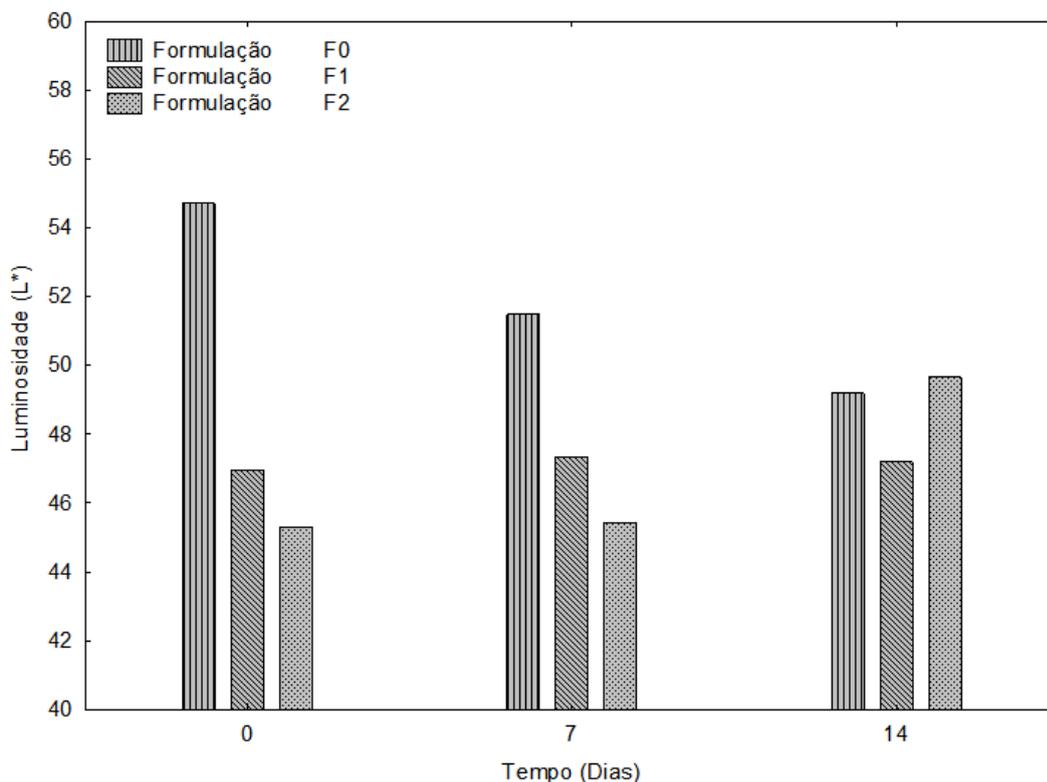


Figura 2: Médias das concentrações de bactérias mesófilas aeróbias (Log.UFC.g<sup>-1</sup>) em embutidos cárneos em diferentes formulações e tempos de armazenamento. F0: Formulação contendo mix de conservantes; F1: Formulação com redução de 50% do mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado; F2: Formulação sem mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado.

Três bactérias patogênicas de origem alimentar analisadas (*Salmonella spp.*, *E. coli*, *L. monocytogenes*) não foram detectadas nas amostras, em nenhuma das formulações, indicando boas condições higiênico-sanitárias das matérias primas utilizadas e dos produtos acabados.

Combinações de extratos derivados de plantas e óleos essenciais têm demonstrado potencial para substituir conservantes sintéticos, que são amplamente utilizados na preservação de carnes e produtos cárneos como antimicrobianos e antioxidantes (MANTZOURANI et al., 2022). Diante disso, a utilização da nanoemulsão de óleo essencial de tomilho 5% combinado com extrato de beterraba desidratado com metade da concentração recomendada de conservante é um resultado promissor, tendo grande importância em razão dos nitritos poderem formar nitrosaminas em determinadas situações, que podem apresentar potencial cancerígeno, assim a substituição parcial deste por

nanoemulsão de óleo essencial de tomilho se torna uma alternativa viável e desejável.

### **3.4.2 Análise físico-químicas**

A avaliação físico-química da adição da nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e do extrato de beterraba desidratado em embutido cárneo foi realizada em 3 tempos distintos (0, 7 e 14 dias).

O teor de umidade dos embutidos frescos bovinos adicionados de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba variou entre 57,87% e 50,39% (Figura 3), estando todas dentro do que a legislação preconiza (máx. 70%) para embutidos frescos (Brasil, 2000). Houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no teor de umidade das formulações F0 (100% de conservantes) e F1 (50% de conservantes) ao longo do período de armazenamento. Foi possível observar que a formulação composta por apenas NEOT e extrato de beterraba apresentou os maiores teores de umidade (54,96%; 56,08% e 57,87%), porém esta diferença só foi significativa no tempo 0, após as formulações não apresentaram diferenças com significância estatística ( $p > 0,05$ ). Isso mostra que o produto absorveu umidade do ambiente em que estava armazenado.

Nossos resultados se assemelham aos encontrados por outros autores como Huang et al. (2021), Sharma et al. (2017) e Vafania et al. (2019), que encontraram teores de umidade próximos ao relatado neste estudo, reportaram que a incorporação de óleo essencial em produtos cárneos não tem efeito significativo no teor de umidade. Pode-se assim inferir que o aumento encontrado de umidade neste estudo não está relacionado à inclusão de NEOT e sim a outros fatores, como por exemplo a baixa concentração de gordura no embutido.

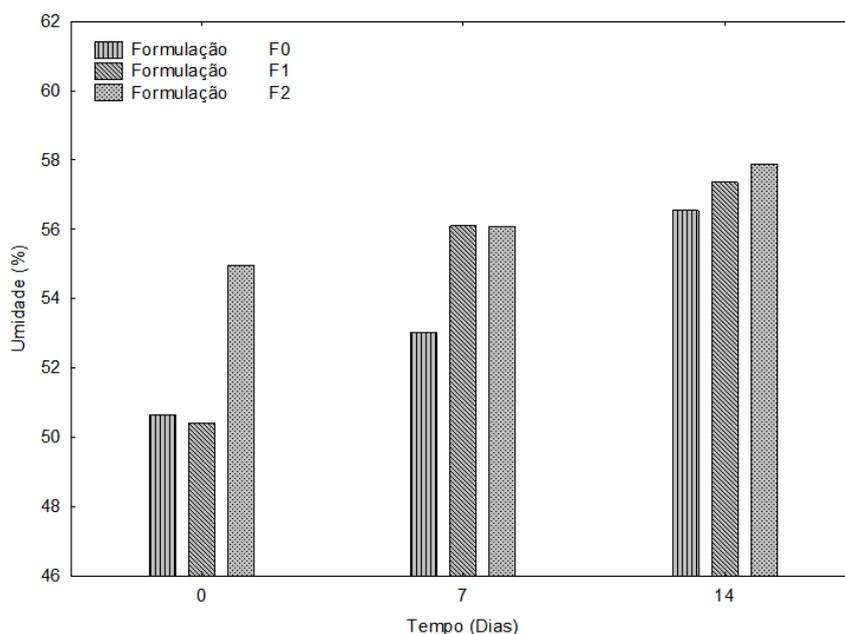


Figura 3: Médias de umidade das diferentes formulações do embutido cárneo ao longo do tempo de armazenamento. F0: Formulação contendo mix de conservantes; F1: Formulação com redução de 50% do mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado; F2: Formulação sem mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado.

A extração da gordura dos embutidos foi realizada para avaliar o índice de acidez, determinação de p-anisidina e coeficiente de extinção específica  $k_{232}$  e  $k_{270}$ , uma vez que estas análises correspondem a oxidação lipídica, afins de diminuir as possíveis interferências dos outros componentes do embutido.

O índice de acidez representa a proporção de ácidos graxos livres em um sistema e pode ser usado como uma estimativa da estabilidade da gordura (GUERRERO et al., 2018). O índice de acidez das gorduras extraídas dos embutidos frescos bovinos com adição de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba desidratado variou entre 0,62% e 3,01% de ácido oleico (Figura 4), houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no índice de acidez de todas as formulações durante o período de armazenamento, isso sugere que ocorreram reações de hidrólise nas gorduras, liberando ácidos graxos livres no meio. Segundo a instituição normativa internacional - Codex Alimentarius, estabelece que a banha pode apresentar valores de IA de até 1,3 mg KOH/ g de gordura (0,65% de ácido oleico), os valores reportados estão acima do limite estabelecido. Foi possível observar que a formulação com adição NEOT e

extrato de beterraba teve um valor de acidez (3,01% ácido oleico) maior que as demais formulações no tempo 14 dias.

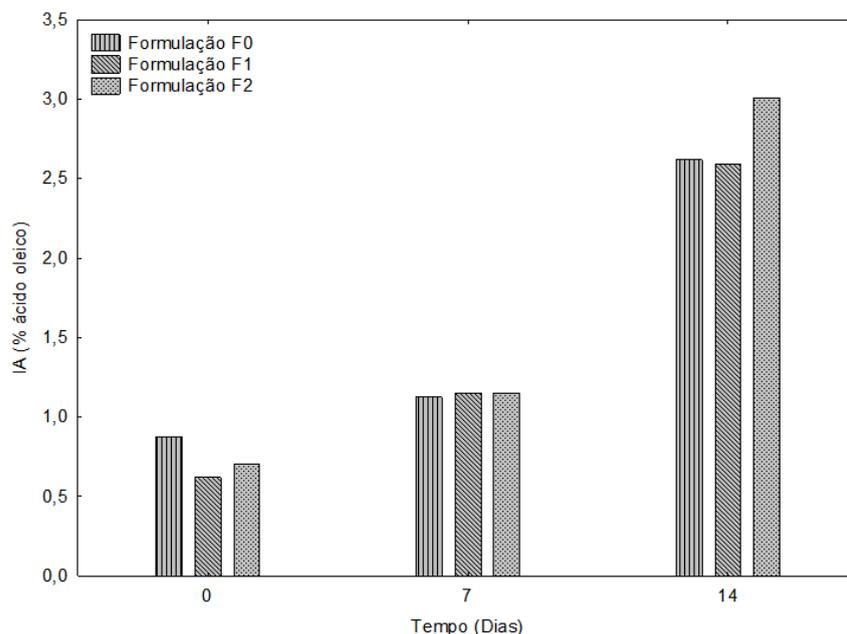


Figura 4: Médias do índice de acidez das diferentes formulações do embutido cárneo ao longo do tempo de armazenamento. F0: Formulação contendo mix de conservantes; F1: Formulação com redução de 50% do mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado; F2: Formulação sem mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado.

O índice de p-anisidina e o coeficiente de extinção específica são parâmetros utilizados para avaliar o grau de oxidação dos óleos. Não houve significância ( $p < 0,05$ ) nos valores de p-anisidina nas formulações no decorrer do tempo de armazenamento, os valores de índice de p-anisidina foram de 0,10 a 0,74 (Figura 5). A legislação não estabelece limites para este parâmetro, contudo, considera-se que valores inferiores a 10, indicam que a amostra lipídica não apresenta teor expressivo de compostos secundários de oxidação (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

O coeficiente de extinção  $K_{232}$  se relaciona com os produtos de oxidação primários, como os peróxidos. Já o  $K_{270}$  se relaciona com os produtos de oxidação secundários, como aldeídos e cetonas. Houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos coeficientes de extinção  $K_{232}$  e  $K_{270}$  no decorrer do tempo de armazenamento para todas as formulações, mesmo com este

aumento, os valores continuam baixos, indicando que há poucos compostos primários e secundários de oxidação.

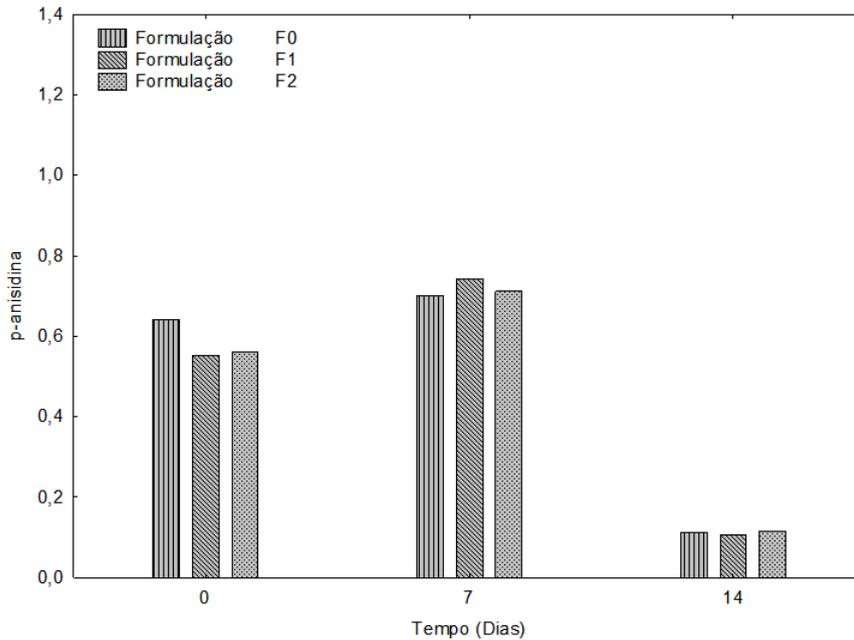


Figura 5: Médias do índice de p-anisidina das diferentes formulações do embutido carne ao longo do tempo de armazenamento; F0: Formulação contendo mix de conservantes; F1: Formulação com redução de 50% do mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado; F2: Formulação sem mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado.

A oxidação lipídica é considerada como um dos parâmetros de deterioração de produtos cárneos frescos. Sendo reportado que a presença de luz, oxigênio, alta temperatura de armazenamento, aumentam a oxidação lipídica (HUSSEIN et al., 2021).

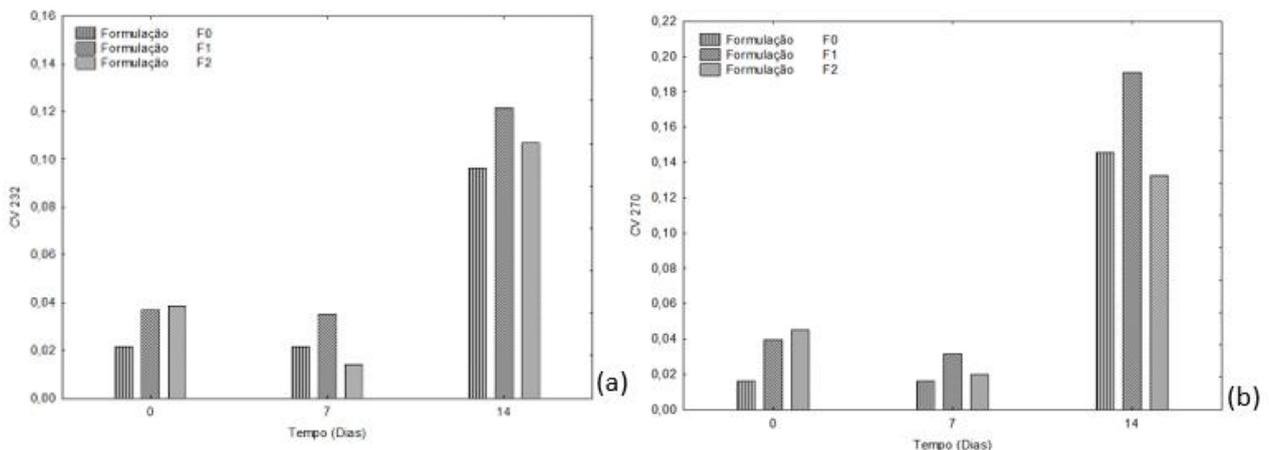


Figura 6: Coeficiente de extinção específica das diferentes formulações do embutido cárneo ao longo do tempo de armazenamento; (a) 232mm; (b) 270 mm; F0: Formulação contendo mix de conservantes; F1: Formulação com redução de 50% do mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado; F2: Formulação sem mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado.

que a adição de óleos essenciais (cássia, manjeriço, cravo e tomilho) em embutidos frescos teve um efeito protetivo contra a oxidação lipídica após 45 dias de armazenamento congelado. Os efeitos antioxidantes dos óleos essenciais podem ser alcançados por meio da eliminação de radicais livres, inibição da peroxidação lipídica e quelação de íons de metais de transição (ŠOJIC et al., 2018). Diante disso, os resultados deste estudo podem indicar que a adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado nos embutidos frescos bovinos tiveram efeitos similares ao uso de conservantes químicos, sendo as baixas taxas de oxidação lipídica relatadas coerentes com a atividade antioxidante reportada no óleo essencial de tomilho.

A cor é uma das propriedades físicas mais importantes para determinar a aceitabilidade de embutidos para os consumidores. As leituras das amostras de cor foram feitas em três locais diferentes do embutido inteiro. Verificam-se os resultados dos parâmetros  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  (vermelhidão) e  $b^*$  (amarelecimento) do embutido fresco adicionado de NEOT e extrato de beterraba desidratado. Houve uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da luminosidade na formulação com 100% de conservante, já na formulação com NEOT e extrato de beterraba desidratado houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na luminosidade, enquanto a formulação com 50% de conservantes mais NEOT e o extrato de beterraba desidratado não apresentou alterações significativas ao longo do período de armazenamento. Sendo possível observar (Figura 7) que os valores de luminosidade para F0 (49,19), F1 (47,19) e F2 (47,65) no tempo 14 dias diferem, porém não apresentam significância estatística.

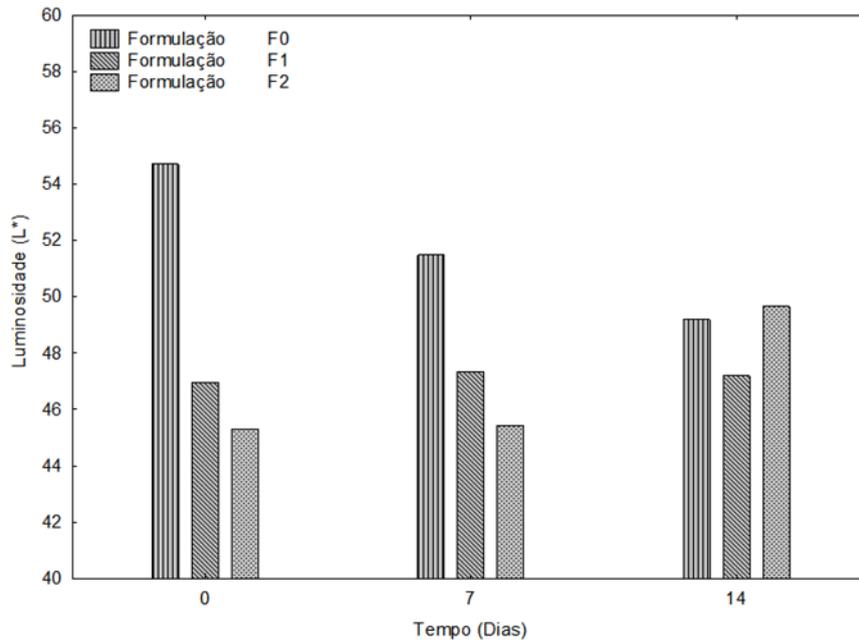


Figura 7: Médias de luminosidade das diferentes formulações do embutido cárneo ao longo do tempo de armazenamento; F0: Formulação contendo mix de conservantes; F1: Formulação com redução de 50% do mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado; F2: Formulação sem mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado.

O parâmetro de cor mais importante para produtos cárneos é o que expressa a tendência ao vermelho ( $a^*$ ). Os valores de cromaticidade foram positivos, todas formulações tiveram uma tendência para o vermelho, através da Figura 8 é possível observar que as formulações F0 (100% de conservantes) e F1 (50% de conservantes mais NEOT e extrato de beterraba desidratado) tiveram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na intensidade da cor vermelha ao longo do período de armazenamento. As formulações F1 (26,75) e F2 (23,62) tiveram os maiores valores de  $a^*$  no tempo 14 dias, este aumento da intensidade da coloração vermelha pode ter sido influenciado pelo extrato de beterraba, que atuou como corante e intensificou a coloração do embutido. Em relação a coordenada de cor  $b^*$ , todas as formulações tiveram uma tendência para o amarelo (Figura 8), pode-se observar que a F0 e F1 no primeiro período tiveram um aumento do valor  $b^*$  e no segundo período tiveram uma diminuição do valor  $b^*$ , enquanto a formulação F2 teve um comportamento inverso. Ao fim dos 14 dias de armazenamento as formulações apresentaram valores de 11,44 (F0), 10,20 (F1) e 13,09 (F2), sendo estatisticamente iguais.

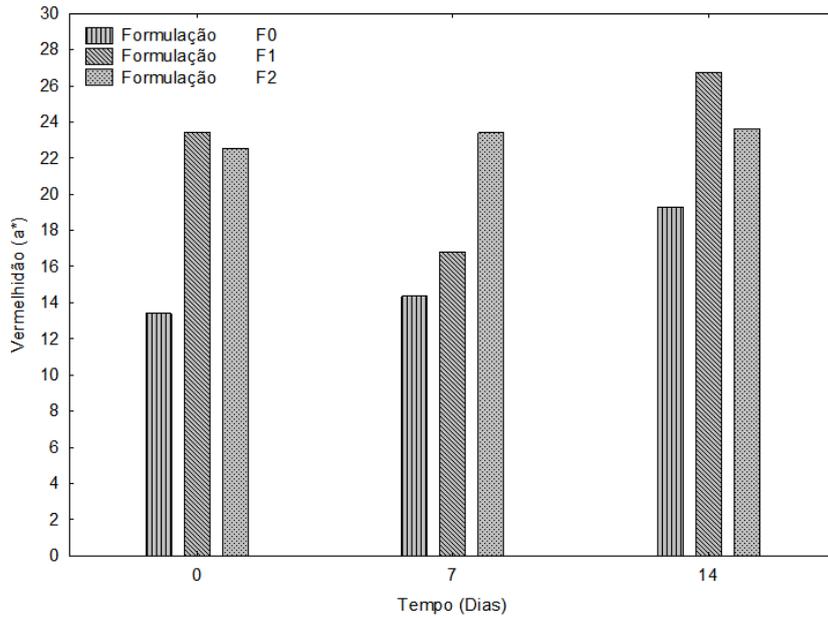


Figura 8: Medias da coordenada de cor a\* das diferentes formulações do embutido cárneo ao longo do tempo de armazenamento; F0: Formulação contendo mix de conservantes; F1: Formulação com redução de 50% do mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado; F2: Formulação sem mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado.

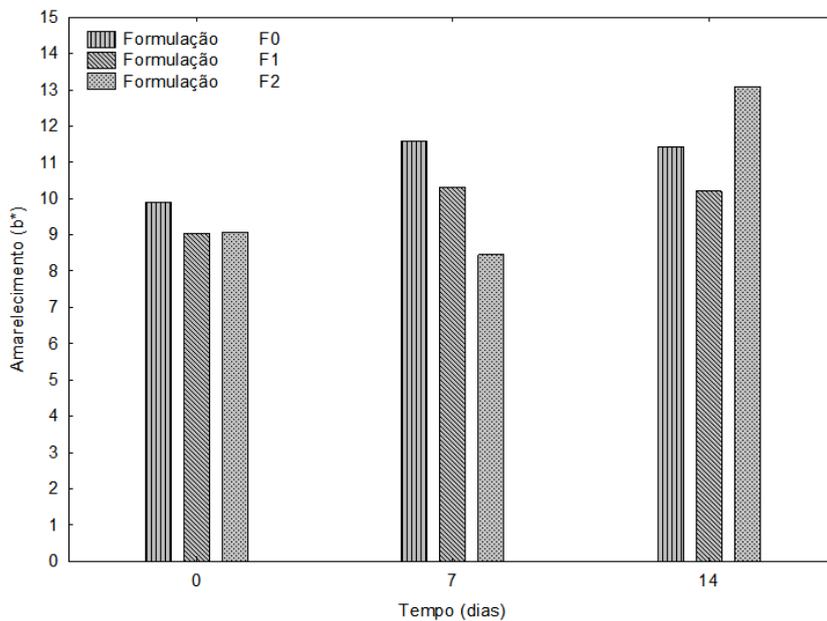


Figura 9: Medias da coordenada de cor b\* das diferentes formulações ao longo do tempo de armazenamento; F0: Formulação contendo mix de conservantes; F1: Formulação com redução de 50% do mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado; F2: Formulação sem mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado.

É possível observar que as formulações que contêm NEOT e extrato de beterraba apresentaram maior valores para coordenada  $a^*$  ao longo do armazenamento, evidenciando a influência do extrato de beterraba adicionado no embutido frescal bovino. Com isso pode-se inferir que a adição de NEOT e extrato de beterraba teve um efeito positivo no embutido frescal, melhorando seus parâmetros de coloração. Schopfer et al. (2022) reportaram que a utilização de extrato de beterraba vermelha teve um impacto considerável na coloração das salsichas, afirmando que pigmentos trazidos pelo extrato de beterraba se sobrepuseram completamente e mascararam as propriedades de cor características de uma massa de salsicha tipo emulsão.

### **3.4.3 Análise sensorial**

Participaram do estudo cinquenta e cinco (55) avaliadores não treinados. Destes, 87,3% tinham idade entre 18-45 anos, 9,1% com idade entre 46-56 anos e 3,6% mais de 57 anos, além disso 78,2% eram do sexo feminino e 21,8% do sexo masculino. Com relação ao grau de escolaridade, 50,9% eram estudantes de pós-graduação, 43,6% do ensino superior, 3,6% do ensino médio e 1,8% do ensino fundamental. Quanto as perguntas relacionadas com frequência de consumo de carnes e tomilho, 100% dos avaliadores indicaram consumir produtos cárneos, sendo que 65,5% na frequência de 4 a 6 vezes por mês, 32,7% de 2 a 3 vezes por mês e somente 1,8% reportaram uma vez por mês. Pode-se observar um alto consumo de produtos cárneos entre os avaliadores. Em relação ao consumo de tomilho, 50,9% dos avaliadores mencionaram que não costumam consumir e 49,1% que costumam, quanto a frequência 53,8% marcaram que raramente, 20,5% de 4 a 6 vezes no mês, 17,9% uma vez no mês e 7,7% de 2 a 3 vezes por mês.

Para o teste de ordenação múltipla foram encontrados os valores de “F calculado” e comparado com “F tabelado”, para verificar se as amostras apresentavam ou não diferença significativa estatisticamente.

Tabela 6: Resultado da análise de variância e do teste de ordenação múltipla dos embutidos frescais bovinos.

<b>Atributos</b>	<b>GL da amostra</b>	<b>GL do resíduo</b>	<b>F calculado</b>
<b>Odor</b>	1	108	2,01
<b>Cor</b>	1	108	0,96
<b>Sabor</b>	1	108	0,0
<b>Impressão Global</b>	1	108	0,06

\*GL= graus de liberdade

Utilizou-se a tabela de limites unilaterais a 5% de significância considerando o  $n_1 = 1$  e o  $n_2 = 120$ .

Os resultados demonstraram que os graus de liberdade de todos os atributos avaliados foram menores que o grau de liberdade do resíduo tabelado (igual a 3,92), infere-se assim que as amostras não apresentaram diferenças significativas a 5% de significância. Em vista disso, a substituição parcial ou total dos conservantes se torna viável do ponto de vista sensorial.

É possível observar que no gráfico da distribuição de frequência da escala hedônica (Figura 9), a intenção de compra das amostras com redução de 50% dos conservantes e adicionado de NEOT e extrato de beterraba desidratado e a formulação apenas com NEOT e extrato de beterraba desidratado foram similares, sendo que 80% das respostas ficaram entre as descrições “certamente compraria” e “talvez compraria”, estes resultados apontam para uma boa aceitação pelos consumidores do produto contendo a combinação de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba desidratado, mostrando que o produto poderia ser adquirido, caso estivesse disponível para a comercialização, inclusive sem a adição dos sais de cura.

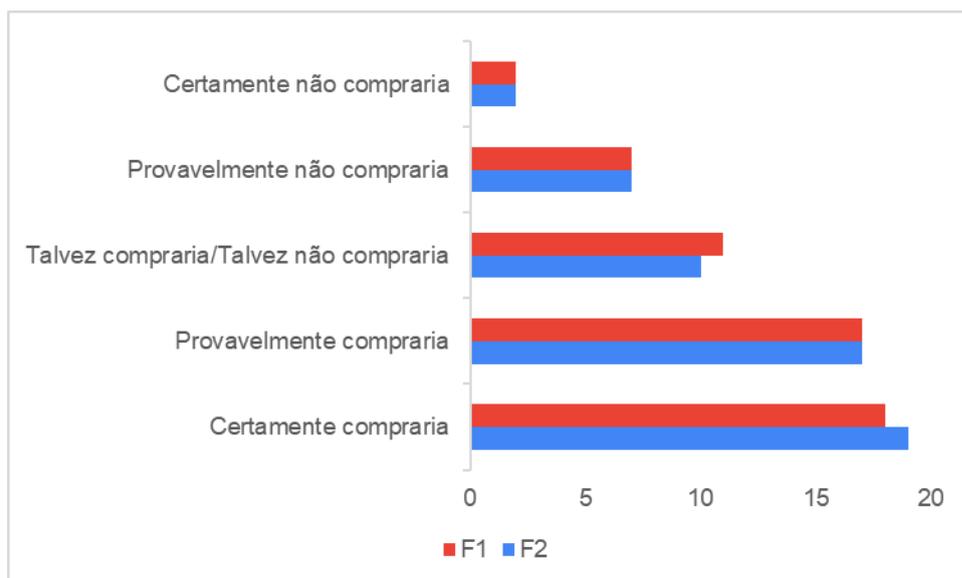


Figura 10. Distribuição de frequência do teste de intenção de compra para embutidos frescos bovino com adição de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba. F1: Formulação com redução de 50% do mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado; F2: Formulação sem mix de conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado.

Mesmo que 50,8% dos avaliadores tenham respondido não gostar ou não consumir tomilho, a intenção de compra pelo produto contendo este componente foi alta. Diante disso pode-se afirmar que nanoemulsão mascarou o sabor e odor acentuado do tomilho, não sendo perceptível pelos julgadores durante a avaliação. Resultados semelhantes foram reportados por Lages et al. (2021) quando avaliaram a aceitabilidade de embutidos cárneos adicionados de óleo essencial de tomilho numa concentração que variou de 0,0095% a 0,00095%, tendo os resultados apontado uma boa aceitação pelos consumidores dos produtos.

Os estudos realizados apontam para o efeito antimicrobiano de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho, sem mencionar a sua aceitabilidade pelos consumidores (HE et al., 2022; LIU & LIU, 2020; MIRSHARIFI et al., 2023; OZOGUL et al., 2020; WANG et al., 2022) e poucos são os estudos que avaliaram a aceitação de alimentos adicionados de nanoemulsão (EL-SAYED & EL-SAYED, 2021; SAGAR et al., 2022).

#### 4. Conclusões

Com base nos resultados do presente estudo, pode-se concluir que a nanoemulsão de óleo essencial de tomilho apresentou forte atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* testadas *in vitro*. A utilização conjunta da nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba em embutidos frescos produziu efeitos similares do ponto de vista microbiológico e físico-químico em relação às amostras com uso de conservantes químicos sintéticos, durante o período de armazenamento refrigerado. Além disso, os embutidos frescos bovinos apresentaram boa aceitação sensorial. Assim o uso conjunto de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba desidratado manteve estáveis as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do produto tendo potencial para substituição de nitrato e nitrito em embutidos cárneos.

## 5. Referências

AGRIMONTI, C.; WHITE, J. C.; TONETTI, S.; MARMIROLI, N. Antimicrobial activity of cellulosic pads amended with emulsions of essential oils of oregano, thyme and cinnamon against microorganisms in minced beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 305, 2019.

ALMASI, L.; RADİ, M.; AMIRI, S.; TORRI, L. Fully dilutable *Thymus vulgaris* essential oil:acetic or propionic acid microemulsions are potent fruit disinfecting solutions. **Food Chemistry**, v. 343, 2021.

AMINZARE, M.; HASHEMI, M.; AFSHARI, A.; MOKHTARI, M. H.; NOORI, S. M. A. Impact of microencapsulated *Ziziphora tenuior* essential oil and orange fiber as natural-functional additives on chemical and microbial qualities of cooked beef sausage. **Food Science and Nutrition**, v. 10, n. 10, p. 3424–3435, 2022.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 20<sup>a</sup> ed. Washington. 2016.

AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS: Champaign, 2003.

BELLUCCI, Elisa Rafaela Bonadio. **Influência da adição de betalaína em embutido Toscana com diferentes níveis de nitrito de sódio sobre as propriedades tecnológicas e sensoriais**. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) -Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto-SP, 2018.

BRASIL. Instrução Normativa n° 161 de 1° de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Diário Oficial da União. 1 jul 2022.

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

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F. DE; REGITANO-D´ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849–854, 2009.

CHANG, Y.; MCLANDBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). **Food Chemistry**, v. 172, p. 298–304, 2015.

CHHIKARA, N.; KUSHWAHA, K.; SHARMA, P.; GAT, Y.; PANGHAL, A. Bioactive compounds of beetroot and utilization in food processing industry: A critical review. **Food Chemistry**, 30. jan. 2019.

CLSI. **M02-A11: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition**. 2012a.

CLSI. **M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition.** 2012b.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex standard for fats and oils from animal source.** CODEX STAN 211-1999. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/y2774e/y2774e05.htm>>. Acessado em: junho de 2023.

DEMIROK SONCU, E.; ÖZDEMİR, N.; ARSLAN, B.; KÜÇÜKKAYA, S.; SOYER, A. Contribution of surface application of chitosan–thyme and chitosan–rosemary essential oils to the volatile composition, microbial profile, and physicochemical and sensory quality of dry-fermented sausages during storage. **Meat Science**, v. 166, 2020.

EL-SAYED, S. M.; EL-SAYED, H. S. Antimicrobial nanoemulsion formulation based on thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil for UF labneh preservation. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 10, p. 1029–1041, 2021.

FAO. Commission Regulation (EU) No 432/2012 Establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children development and health. **Official Journal of the European Union.** 2012. Disponível em: <[https://www.legislation.gov.uk/eur/2012/432/pdfs/eur\\_20120432\\_2017-08-22\\_en.pdf](https://www.legislation.gov.uk/eur/2012/432/pdfs/eur_20120432_2017-08-22_en.pdf)>. Acessado em: maio de 2023.

FELÍCIO, Isabela Motta. **Desenvolvimento de sistema nanoemulsionado contendo óleo de carvacrol como aditivo alimentar antimicrobiano.** 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência Farmacêuticas) - Centro de Ciências Biológicas e da saúde, Universidade estadual da Paraíba, Capina Grande, Paraíba, 2020.

GARAVAND, F.; JALAI-JIVAN, M.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Encapsulation of phenolic compounds within nano/microemulsion systems: A review. **Food Chemistry**, 1. dez. 2021.

GUERRERO, M. C. G.; ALVAREZ MITRE, F. M.; TORO VAZQUEZ, J. F.; GUEVARA LARA, F.; JÁUREGUI RINCÓN, J. Modification of lard's thermal properties to improve its functionality: potential cocoa butter substitute. **Biotecnia**, v. 21, n. 1, p. 29–36, 2018.

GUO, M.; ZHANG, L.; HE, Q.; et al. Synergistic antibacterial effects of ultrasound and thyme essential oils nanoemulsion against *Escherichia coli* O157:H7. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 66, 2020.

HE, Q.; ZHANG, L.; SONG, L.; et al. Inactivation of *Staphylococcus aureus* using ultrasound in combination with thyme essential oil nanoemulsions and its synergistic mechanism. **LWT**, v. 147, 2021.

HE, Q.; ZHANG, L.; YANG, Z.; et al. Antibacterial mechanisms of thyme essential oil nanoemulsions against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*: Alterations in membrane compositions and characteristics. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 75, 2022.

HOJATI, N.; AMIRI, S.; RAD, M. Effect of cinnamaldehyde nanoemulsion on the microbiological property of sausage. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 16, n. 4, p. 2478–2485, 2022.

HUANG, L.; WANG, Y.; LI, R.; et al. Thyme essential oil and sausage diameter effects on biogenic amine formation and microbiological load in smoked horse meat sausage. **Food Bioscience**, v. 40, 2021.

HUSSEIN, M.; MAKRAM MOUSTAFA ALI, R.; ELSAYED THARWAT, A.; RIZK EL-GHAREEB, W.; ABDEL-MOEZ ISMAIL, H. **Quality parameters of buffalo meat sausage containing essential oils**. 2021.

INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL. **Spectrophotometric investigation in the ultraviolet**. COI/T.20/Doc. N°19, 2008.

ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and *Listeria spp* - Part 1: Detection Method.

ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colonycount at 30 degrees C by the pour plate technique.

ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration and Serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella spp*.

ISO 7251:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli*. Most probable number technique.

KALE, R. G.; SAWATE, A. R.; KSHIRSAGAR, R. B.; PATIL, B. M.; MANE, R. P. Studies on evaluation of physical and chemical composition of beetroot (*Beta vulgaris L.*) Kale RG, Sawate AR, Kshirsagar RB, Patil BM and Mane RP. **International Journal of Chemical Studies**, v. 6, n. 2, p. 2977–2979, 2018.

LAGES, L. Z.; RADÜNZ, M.; GONÇALVES, B. T.; et al. Microbiological and sensory evaluation of meat sausage using thyme (*Thymus vulgaris, L.*) essential oil and powdered beet juice (*Beta vulgaris L., Early Wonder cultivar*). **LWT**, v. 148, 2021.

LIU, F.; JIN, P.; GONG, H.; SUN, Z.; DU, L.; WANG, D. Antibacterial and antibiofilm activities of thyme oil against foodborne multiple antibiotics-resistant *Enterococcus faecalis*. **Poultry Science**, v. 99, n. 10, p. 5127–5136, 2020.

LIU, T.; LIU, L. Fabrication and characterization of chitosan nanoemulsions loading thymol or thyme essential oil for the preservation of refrigerated pork. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1509–1515, 2020.

MANESSIS, G.; KALOGIANNI, A. I.; LAZOU, T.; et al. Plant-derived natural antioxidants in meat and meat products. **Antioxidants**, 1. dez. 2020.

MANTZOURANI, I.; DAOUTIDOU, M.; DASENAKI, M.; et al. Plant Extract and Essential Oil Application against Food-Borne Pathogens in Raw Pork Meat. **Foods**, v. 11, n. 6, 2022.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Projeção do Agronegócios no Brasil 2020/21 a 2030/31. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio>. Acessado em: Maio 2023.

MEIRELES, B. R. L. DE A.; VITOR, R. C. L.; MORAIS, S. K. Q.; et al. Avaliação do potencial corante e antioxidante de betalaínas (*Beta vulgaris*, L.) em mortadela de frango. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e237973995, 2020.

MIRSHARIFI, S. M.; SAMI, M.; JAZAERI, M.; REZAEI, A. Production, characterization, and antimicrobial activity of almond gum/polyvinyl alcohol/chitosan composite films containing thyme essential oil nanoemulsion for extending the shelf-life of chicken breast fillets. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 227, p. 405–415, 2023.

OJEDA-PIEDRA, S. A.; ZAMBRANO-ZARAGOZA, M. L.; GONZÁLEZ-REZA, R. M.; et al. Nano-Encapsulated Essential Oils as a Preservation Strategy for Meat and Meat Products Storage. **Molecules**, 1. dez. 2022.

OZOGUL, Y.; KULEY BOĞA, E.; AKYOL, I.; et al. Antimicrobial activity of thyme essential oil nanoemulsions on spoilage bacteria of fish and food-borne pathogens. **Food Bioscience**, v. 36, 2020.

RADÜNZ, M.; DOS SANTOS HACKBART, H. C.; CAMARGO, T. M.; et al. Antimicrobial potential of spray drying encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on the conservation of hamburger-like meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 330, 2020.

ROTA, M. C.; HERRERA, A.; MARTÍNEZ, R. M.; SOTOMAYOR, J. A.; JORDÁN, M. J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v. 19, n. 7, p. 681–687, 2008.

SAGAR, N. A.; AGRAWAL, R. K.; SINGH, R.; et al. Quality and shelf life assessment of steam-cooked chicken fingers coated with essential oil nanoemulsions. **Food Bioscience**, v. 49, 2022.

SCHOPFER, B.; MITRENGA, S.; BOULAABA, A.; et al. Red beet and Swiss chard juice extract as natural nitrate sources for the production of alternatively-cured emulsion-type sausages. **Meat Science**, v. 188, 2022.

SHARMA, H.; MENDIRATTA, S. K.; AGRAWAL, R. K.; et al. Use of various essential oils as bio preservatives and their effect on the quality of vacuum packaged fresh chicken sausages under frozen conditions. **LWT**, v. 81, p. 118–127, 2017.

SILVA, F. A. M.; FERNANDA, M.; BORGES, M.; FERREIRA, M. A. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE. **Quím. Nova**, v.22(1), p. 94-103, 1999.

SILVA, B. D.; BERNARDES, P. C.; PINHEIRO, P. F.; FANTUZZI, E.; ROBERTO, C. D. Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. **Meat Science**, v. 176, p. 108463, 2021.

ŠLOSÁR, M.; KOPTA, T.; HEGEDUS, O.; et al. Yield parameters, antioxidant activity, polyphenol and total soluble solids content of beetroot cultivars with different flesh colours. **Folia Horticulturae**, v. 32, n. 2, p. 351–362, 2020.

SNOUSSI, A.; CHOUAIBI, M.; BEN HAJ KOUBAIEH, H.; BOUZOUITA, N. Encapsulation of Tunisian thyme essential oil in O/W nanoemulsions: Application for meat preservation. **Meat Science**, v. 188, 2022.

ŠOJIĆ, B.; PAVLIĆ, B.; ZEKOVIĆ, Z.; et al. The effect of essential oil and extract from sage (*Salvia officinalis* L.) herbal dust (food industry by-product) on the oxidative and microbiological stability of fresh pork sausages. **LWT**, v. 89, p. 749–755, 2018.

VAFANIA, B.; FATHI, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Nanoencapsulation of thyme essential oil in chitosan-gelatin nanofibers by nozzle-less electrospinning and their application to reduce nitrite in sausages. **Food and Bioprocess Technology**, v. 116, p. 240–248, 2019.

WAN, J.; ZHONG, S.; SCHWARZ, P.; CHEN, B.; RAO, J. Enhancement of antifungal and mycotoxin inhibitory activities of food-grade thyme oil nanoemulsions with natural emulsifiers. **Food Control**, v. 106, 2019.

WANG, L.; LIU, T.; LIU, L.; LIU, Y.; WU, X. Impacts of chitosan nanoemulsions with thymol or thyme essential oil on volatile compounds and microbial diversity of refrigerated pork meat. **Meat Science**, v. 185, 2022.

WANG, M.; QAZI, I. H.; WANG, L.; ZHOU, G.; HAN, H. Salmonella virulence and immune escape. **Microorganisms**, 1. mar. 2020.

YANG, Z.; HE, Q.; ISMAIL, B. B.; HU, Y.; GUO, M. Ultrasonication induced nano-emulsification of thyme essential oil: Optimization and antibacterial mechanism against *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 133, 2022.

ZHANG, Y.; ZHOU, L.; ZHANG, C.; et al. Preparation and characterization of curdlan/polyvinyl alcohol/ thyme essential oil blending film and its application to chilled meat preservation. **Carbohydrate Polymers**, v. 247, 2020.

## 8. Considerações finais

A nanoemulsão de óleo essencial de tomilho 5% (F4) foi a que apresentou os melhores resultados de atividade antimicrobiana, com concentração inibitória mínima de  $0,0002 \mu\text{L} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e concentração bacteriana mínima de  $0,0083 \mu\text{L} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  para *E. coli* e  $0,0002 \mu\text{L} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  para *S. aureus*. Além disso, a nanoemulsão de óleo essencial de tomilho 5% demonstrou alta estabilidade, evidenciada pelo elevado valor de potencial Zeta. O extrato de beterraba mostrou alto conteúdo de umidade e sólidos solúveis, além de pH próximo ao descrito por outros autores. A desidratação do extrato acentuou a coloração, devido a concentração da matéria seca após a liofilização. Com relação a contagem de bactérias mesófilas aeróbias nas três formulações de embutidos não se observaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no decorrer do tempo de armazenamento. Houve um aumento no teor de umidade e acidez dos embutidos durante o armazenamento para as formulações com nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba desidratado. Os embutidos formulados com adição de NEOT e extrato de beterraba apresentaram baixos níveis de produtos de oxidação primários e secundários durante o armazenamento e a adição do extrato de beterraba intensificou a coloração do embutido fresco. Na análise sensorial para o teste de ordenação múltipla as amostras não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), os embutidos tiveram uma boa aceitação do consumidor e elevada intensão de compra. Assim o uso conjunto de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba desidratado manteve estáveis as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do produto tendo potencial para substituição de nitrato e nitrito em embutidos cárneos.

## 9. Referências

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

AGRIMONTI, C.; WHITE, J. C.; TONETTI, S.; MARMIROLI, N. Antimicrobial activity of cellulosic pads amended with emulsions of essential oils of oregano, thyme and cinnamon against microorganisms in minced beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 305, 2019.

ALMASI, L.; RADİ, M.; AMIRI, S.; TORRI, L. Fully dilutable Thymus vulgaris essential oil:acetic or propionic acid microemulsions are potent fruit disinfecting solutions. **Food Chemistry**, v. 343, 2021.

AMINZARE, M.; HASHEMI, M.; AFSHARI, A.; MOKHTARI, M. H.; NOORI, S. M. A. Impact of microencapsulated Ziziphora tenuior essential oil and orange fiber as natural-functional additives on chemical and microbial qualities of cooked beef sausage. **Food Science and Nutrition**, v. 10, n. 10, p. 3424–3435, 2022.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 20<sup>a</sup> ed. Washington. 2016.

AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS: Champaign, 2003.

BELLUCCI, Elisa Rafaela Bonadio. **Influência da adição de betalaína em embutido Toscana com diferentes níveis de nitrito de sódio sobre as propriedades tecnológicas e sensoriais**.81f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) -Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto-SP, 2018.

BHAVANIRAMYA, S.; VISHNUPRIYA, S.; AL-ABOODY, M. S.; VIJAYAKUMAR, R.; BASKARAN, D. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 49–55, 2019.

BRASIL. Instrução Normativa n° 161 de 1° de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Diário Oficial da União. 1 jul 2022.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa n. 60, de 23 de dezembro de 2019**. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília 26/12/2019, Seção 1, p. 133, 2019.

BRASIL. Ministério da saúde. **Resolução da Diretoria Colegiada n. 272, de 14 de março de 2019**. Estabelece os aditivos autorizados para uso em carnes e produtos cárneos. Diário Oficial da União, Brasília 18/03/2019, Ed. 52, Seção 1, p. 194, 2019.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F. DE; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849–854, 2009.

CAVALIN, P. B. B.; SARMIENTO, J. J. P.; KOBAYASHI, R. K. T.; et al. Detection of Salmonella spp. and diarrheagenic Escherichia coli in fresh pork sausages. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 39, n. 4, p. 1533–1545, 2018.

CHANG, Y.; MCLANDSBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). **Food Chemistry**, v. 172, p. 298–304, 2015.

CHEN, X.; SHANG, S.; YAN, F.; et al. Antioxidant Activities of Essential Oils and Their Major Components in Scavenging Free Radicals, Inhibiting Lipid Oxidation and Reducing Cellular Oxidative Stress. **Molecules**, v. 28, n. 11, 2023.

CHHIKARA, N.; KUSHWAHA, K.; SHARMA, P.; GAT, Y.; PANGHAL, A. Bioactive compounds of beetroot and utilization in food processing industry: A critical review. **Food Chemistry**, 30. jan. 2019.

CLSI. **M02-A11: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition**. 2012a.

CLSI. **M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition**. 2012b.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex standard for fats and oils from animal source**. CODEX STAN 211-1999. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/y2774e/y2774e05.htm>>. Acessado em: junho de 2023.

DEMIROK SONCU, E.; ÖZDEMIR, N.; ARSLAN, B.; KÜÇÜKKAYA, S.; SOYER, A. Contribution of surface application of chitosan–thyme and chitosan–rosemary essential oils to the volatile composition, microbial profile, and physicochemical and sensory quality of dry-fermented sausages during storage. **Meat Science**, v. 166, 2020.

EHUWA, O.; JAISWAL, A. K.; JAISWAL, S. Salmonella, food safety and food handling practices. **Foods**, v. 10, n. 5, 2021.

EL-SAYED, S. M.; EL-SAYED, H. S. Antimicrobial nanoemulsion formulation based on thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil for UF labneh preservation. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 10, p. 1029–1041, 2021.

FAO. Commission Regulation (EU) No 432/2012 Establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children development and health. **Official Journal of the European Union**. 2012. Disponível em: <[https://www.legislation.gov.uk/eur/2012/432/pdfs/eur\\_20120432\\_2017-08-22\\_en.pdf](https://www.legislation.gov.uk/eur/2012/432/pdfs/eur_20120432_2017-08-22_en.pdf)>. Acessado em: maio de 2023.

FALLEH, H.; BEN JEMAA, M.; SAADA, M.; KSOURI, R. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. **Food Chemistry**, 15. nov. 2020.

FELÍCIO, Isabela Motta. **Desenvolvimento de sistema nanoemulsionado contendo óleo de carvacrol como aditivo alimentar antimicrobiano**. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência Farmacêuticas) - Centro de Ciências Biológicas e da saúde, Universidade estadual da Paraíba, Capina Grande, Paraíba, 2020.

FLORES, M.; TOLDRÁ, F. Chemistry, safety, and regulatory considerations in the use of nitrite and nitrate from natural origin in meat products. **Meat Science**, 1. jan. 2021.

FRANCO, R. M.; MANTILLA, S. P. S.; DE OLIVEIRA, L. A. T. Checking the viability of *Escherichia coli* pathogens in fresh pork sausage. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 3, p. 319-325, 2010.

FRAQUEZA, M. J.; LARANJO, M.; ELIAS, M.; PATARATA, L. Microbiological hazards associated with salt and nitrite reduction in cured meat products: control strategies based on antimicrobial effect of natural ingredients and protective microbiota. **Current Opinion in Food Science**, 1. abr. 2021.

GARAVAND, F.; JALAI-JIVAN, M.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Encapsulation of phenolic compounds within nano/microemulsion systems: A review. **Food Chemistry**, 1. dez. 2021.

GHADERI-GHAHFAROKHI, M.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M. A.; AHMADI GAVLIGHI, H.; GARDINI, F. Chitosan-cinnamon essential oil nano-formulation: Application as a novel additive for controlled release and shelf life extension of beef patties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 19–28, 2017.

GUERRERO, M. C. G.; ALVAREZ MITRE, F. M.; TORO VAZQUEZ, J. F.; GUEVARA LARA, F.; JÁUREGUI RINCÓN, J. Modification of lard's thermal properties to improve its functionality: potential cocoa butter substitute. **Biotechnia**, v. 21, n. 1, p. 29–36, 2018.

GONÇALVES, Bárbara Sofia Gomes. **Pigmentos naturais de origem vegetal: Betalaínas**. 54f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de ciências e tecnologias, Universidade de Algarve, Faro, Portugal, 2018.

GULARTE, M. A. **Análise sensorial**. Pelotas: Ed. Universitária, 2009. 66p.

GUO, M.; ZHANG, L.; HE, Q.; et al. Synergistic antibacterial effects of ultrasound and thyme essential oils nanoemulsion against *Escherichia coli* O157:H7. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 66, 2020.

HE, Q.; ZHANG, L.; SONG, L.; et al. Inactivation of *Staphylococcus aureus* using ultrasound in combination with thyme essential oil nanoemulsions and its synergistic mechanism. **LWT**, v. 147, 2021.

HE, Q.; ZHANG, L.; YANG, Z.; et al. Antibacterial mechanisms of thyme essential oil nanoemulsions against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*: Alterations in membrane compositions and characteristics. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 75, 2022.

HOJATI, N.; AMIRI, S.; RAD, M. Effect of cinnamaldehyde nanoemulsion on the microbiological property of sausage. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 16, n. 4, p. 2478–2485, 2022.

HUANG, L.; WANG, Y.; LI, R.; et al. Thyme essential oil and sausage diameter effects on biogenic amine formation and microbiological load in smoked horse meat sausage. **Food Bioscience**, v. 40, 2021.

HUSSEIN, M.; MAKRAM MOUSTAFA ALI, R.; ELSAYED THARWAT, A.; RIZK EL-GHAREEB, W.; ABDEL-MOEZ ISMAIL, H. **Quality parameters of buffalo meat sausage containing essential oils**. 2021

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

INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL. **Spectrophotometric investigation in the ultraviolet**. COI/T.20/Doc. N°19, 2008.

ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and *Listeria spp* - Part 1: Detection Method.

ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colonycount at 30 degrees C by the pour plate technique.

ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration and Serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella spp*.

ISO 7251:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli*. Most probable number technique.

JORDAN, K.; HUNT, K.; LOURENCO, A.; PENNONE, V. *Listeria monocytogenes* in the Food Processing Environment. **Current Clinical Microbiology Reports**, 1. jun. 2018.

KALE, R. G.; SAWATE, A. R.; KSHIRSAGAR, R. B.; PATIL, B. M.; MANE, R. P. Studies on evaluation of physical and chemical composition of beetroot (*Beta vulgaris L.*) Kale RG, Sawate AR, Kshirsagar RB, Patil BM and Mane RP. **International Journal of Chemical Studies**, v. 6, n. 2, p. 2977–2979, 2018.

LAGES, L. Z.; RADÜNZ, M.; GONÇALVES, B. T.; et al. Microbiological and sensory evaluation of meat sausage using thyme (*Thymus vulgaris, L.*) essential oil and powdered beet juice (*Beta vulgaris L., Early Wonder cultivar*). **LWT**, v. 148, 2021.

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

LIU, F.; JIN, P.; GONG, H.; SUN, Z.; DU, L.; WANG, D. Antibacterial and antibiofilm activities of thyme oil against foodborne multiple antibiotics-resistant *Enterococcus faecalis*. **Poultry Science**, v. 99, n. 10, p. 5127–5136, 2020.

LIU, T.; LIU, L. Fabrication and characterization of chitosan nanoemulsions loading thymol or thyme essential oil for the preservation of refrigerated pork. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1509–1515, 2020.

MANESSIS, G.; KALOGIANNI, A. I.; LAZOU, T.; et al. Plant-derived natural antioxidants in meat and meat products. **Antioxidants**, 1. dez. 2020.

MANTZOURANI, I.; DAOUTIDOU, M.; DASENAKI, M.; et al. Plant Extract and Essential Oil Application against Food-Borne Pathogens in Raw Pork Meat. **Foods**, v. 11, n. 6, 2022.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Projeção do Agronegócios no Brasil 2020/21 a 2030/31. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio>. Acessado em: Maio 2023.

MEIRELES, B. R. L. DE A.; VITOR, R. C. L.; MORAIS, S. K. Q.; et al. Avaliação do potencial corante e antioxidante de betalaínas (*Beta vulgaris*, L.) em mortadela de frango. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e237973995, 2020.

MIRSHARIFI, S. M.; SAMI, M.; JAZAERI, M.; REZAEI, A. Production, characterization, and antimicrobial activity of almond gum/polyvinyl alcohol/chitosan composite films containing thyme essential oil nanoemulsion for extending the shelf-life of chicken breast fillets. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 227, p. 405–415, 2023.

NIETO, G. A Review on Applications and Uses of Thymus in the Food Industry. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 961, 2020.

NOWACKA, M.; TAPPI, S.; WIKTOR, A.; RYBAK, K.; MISZCZYKOWSKA, A.; CZYZEWSKI, J.; DROZDZAL, K.; WITROWA-RAJCHERT, D.; TYLEWICZ, U. The impact of pulsed electric field on the extraction of bioactive compounds from beetroot. **Foods**, v. 8, n. 7, 2019.

OJEDA-PIEDRA, S. A.; ZAMBRANO-ZARAGOZA, M. L.; GONZÁLEZ-REZA, R. M.; et al. Nano-Encapsulated Essential Oils as a Preservation Strategy for Meat and Meat Products Storage. **Molecules**, 1. dez. 2022.

OZOGUL, Y.; KULEY BOĞA, E.; AKYOL, I.; et al. Antimicrobial activity of thyme essential oil nanoemulsions on spoilage bacteria of fish and food-borne pathogens. **Food Bioscience**, v. 36, 2020.

PAPADOCHRISTOPOULOS, A.; KERRY, J. P.; FEGAN, N.; BURGESS, C. M.; DUFFY, G. Natural anti-microbials for enhanced microbial safety and shelf-life of processed packaged meat. **Foods**, v. 10, n. 7, 2021.

PAVALQUESI, S. L. S.; GOMES, B. I. B. J.; FRANCA, S. R.; SILVA, I. C. R.; ORSI, D. C. Qualidade microbiológica de embutidos de frango do tipo frescal

comercializadas no Distrito Federal, Brasil. **Brazilian Journal of hygiene and animal sanity**, v. 15, n. 2, p. 1–12, 2021.

PAVONI, L.; PERINELLI, D. R.; BONACUCINA, G.; CESPI, M.; PALMIERI, G. F. An overview of micro-and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. **Nanomaterials**, 1. jan. 2020.

RADI, M.; AKHAVAN-DARABI, S.; AKHAVAN, H. R.; AMIRI, S. The use of orange peel essential oil microemulsion and nanoemulsion in pectin-based coating to extend the shelf life of fresh-cut orange. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 2, p. e13441, 2018.

RADÜNZ, M.; DOS SANTOS HACKBART, H. C.; CAMARGO, T. M.; et al. Antimicrobial potential of spray drying encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on the conservation of hamburger-like meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 330, 2020.

ROTA, M. C.; HERRERA, A.; MARTÍNEZ, R. M.; SOTOMAYOR, J. A.; JORDÁN, M. J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v. 19, n. 7, p. 681–687, 2008.

RUIZ-CAPILLAS, C.; HERRERO, A. M.; PINTADO, T.; DELGADO-PANDO, G. Sensory analysis and consumer research in new meat products development. **Foods**, 1. fev. 2021.

SAGAR, N. A.; AGRAWAL, R. K.; SINGH, R.; et al. Quality and shelf life assessment of steam-cooked chicken fingers coated with essential oil nanoemulsions. **Food Bioscience**, v. 49, 2022.

SAMPAIO, C. I.; BOURBON, A. I.; GONÇALVES, C.; et al. Low energy nanoemulsions as carriers of thyme and lemon balm essential oils. **LWT**, v. 154, 2022.

SÁNCHEZ, Iván C.; ALBARRACÍN, William. Análise sensorial da carne. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 23, n. 2, p. 227-239, 2010.

SANTOS, Cláudia Destro dos. **Extração, clarificação e estabilização de betalaínas provenientes de talos de beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.)**.165f. Tese (Doutorado em engenharia) -Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre-RS,2017.

SCHOPFER, B.; MITRENGA, S.; BOULAABA, A.; et al. Red beet and Swiss chard juice extract as natural nitrate sources for the production of alternatively-cured emulsion-type sausages. **Meat Science**, v. 188, 2022.

SHARMA, H.; MENDIRATTA, S. K.; AGRAWAL, R. K.; et al. Use of various essential oils as bio preservatives and their effect on the quality of vacuum packaged fresh chicken sausages under frozen conditions. **LWT**, v. 81, p. 118–127, 2017.

SILVA, F. A. M.; FERNANDA, M.; BORGES, M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Quím. Nova**, v.22(1), p. 94-103, 1999.

SILVA, B. D.; BERNARDES, P. C.; PINHEIRO, P. F.; FANTUZZI, E.; ROBERTO, C. D. Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. **Meat Science**, v. 176, p. 108463, 2021.

ŠLOSÁR, M.; KOPTA, T.; HEGEDUS, O.; et al. Yield parameters, antioxidant activity, polyphenol and total soluble solids content of beetroot cultivars with different flesh colours. **Folia Horticulturae**, v. 32, n. 2, p. 351–362, 2020.

SNOUSSI, A.; CHOUAIBI, M.; BEN HAJ KOUBAIER, H.; BOUZOUITA, N. Encapsulation of Tunisian thyme essential oil in O/W nanoemulsions: Application for meat preservation. **Meat Science**, v. 188, 2022.

SOARES, V. M.; PADILHA, M. B.; DE GUERRA, M. E. M.; et al. Identification of salmonella spp, listeria monocytogenes, and indicator microorganisms in commercialized raw meats and fresh sausages from Uruguiana, Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciencia Rural**, v. 51, n. 6, 2021.

ŠOJIĆ, B.; PAVLIĆ, B.; ZEKOVIĆ, Z.; et al. The effect of essential oil and extract from sage (*Salvia officinalis* L.) herbal dust (food industry by-product) on the oxidative and microbiological stability of fresh pork sausages. **LWT**, v. 89, p. 749–755, 2018.

VAFANIA, B.; FATHI, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Nanoencapsulation of thyme essential oil in chitosan-gelatin nanofibers by nozzle-less electrospinning and their application to reduce nitrite in sausages. **Food and Bioprocess Processing**, v. 116, p. 240–248, 2019.

VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v. 72, n.12, p.1084-1087, 1970.

WAN, J.; ZHONG, S.; SCHWARZ, P.; CHEN, B.; RAO, J. Enhancement of antifungal and mycotoxin inhibitory activities of food-grade thyme oil nanoemulsions with natural emulsifiers. **Food Control**, v. 106, 2019.

WANG, L.; LIU, T.; LIU, L.; LIU, Y.; WU, X. Impacts of chitosan nanoemulsions with thymol or thyme essential oil on volatile compounds and microbial diversity of refrigerated pork meat. **Meat Science**, v. 185, 2022.

WANG, M.; QAZI, I. H.; WANG, L.; ZHOU, G.; HAN, H. Salmonella virulence and immune escape. **Microorganisms**, 1. mar. 2020.

WANG, Q.; WANG, J.; DING, W.; et al. Alternatives to carcinogenic preservatives in Chinese Sausage - Sorbic acid-loaded chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 28–33, 2018.

YANG, Z.; HE, Q.; ISMAIL, B. B.; HU, Y.; GUO, M. Ultrasonication induced nano-emulsification of thyme essential oil: Optimization and antibacterial mechanism against Escherichia coli. **Food Control**, v. 133, 2022.

ZHANG, Y.; ZHOU, L.; ZHANG, C.; et al. Preparation and characterization of curdlan/polyvinyl alcohol/ thyme essential oil blending film and its application to chilled meat preservation. **Carbohydrate Polymers**, v. 247, 2020.

## **Anexos**

## Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pelo presente termo de consentimento livre e esclarecido, eu,

---

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

**Projeto:** Desenvolvimento de embutido cárneo utilizando nanoemulsão de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris L.*) e extrato de beterraba (*Beta vulgaris L.*)

**Objetivos:** Fui informado (a) de que o objetivo desta pesquisa é avaliar o efeito da utilização conjunta de nanoemulsões com óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba em embutidos cárneos para manutenção das características sensoriais e microbiológica e para redução parcial ou total do uso de nitrato e nitrito de sódio.

**Procedimentos:** Fui informado (a) de que receberei amostra de embutido cárneo adicionado de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) e extrato de beterraba (*Beta vulgaris L.*) para que eu avalie as características sensoriais do produto. Onde deverei olhá-lo, prová-lo e avaliar cuidadosamente os seguintes aspectos: cor, odor, sabor, impressão global e intenção de compra. Fui informado que a duração esperada para estes procedimentos é de aproximadamente 15 minutos, porém poderei utilizar o tempo que seja necessária para uma correta avaliação.

**Composição básica do embutido:** Carne bovina magra, toucinho, água gelada/gelo, sal (NaCl), sal de cura (nitrito e nitrato de sódio), estabilizante (polifosfato), fixador de cor (eritorbato de sódio), condimento comercial para embutido Toscana e açúcar.

**Riscos e possíveis reações:** Fui informado (a) de que não existem riscos físicos no estudo, e caso eu sinta qualquer desconforto poderei desistir de participar da pesquisa em qualquer momento.

**Risco de ingestão das amostras por pessoas com intolerâncias e/ou alergias:** o produto não apresenta riscos para intolerante ao glúten, lactose e ovo, pois não possui nenhum destes componentes na sua composição, além disso neste termo é mostrada a composição do produto, assim devo avaliar a composição do produto antes de aceitar participar da pesquisa, e confirmar que não possuo nenhuma intolerância ou alergia aos componentes do produto antes de aceitar participar do estudo. Caso não tenha certeza se tenho ou não

minimizar ou prevenir esse risco;

**Riscos Psicológicos:** Em relação aos riscos psicológicos, caso sinta qualquer desconforto em participar da pesquisa poderei suspende-la em qualquer momento.

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

**Participação voluntária:** A minha adesão à pesquisa ocorrerá de forma voluntária e nenhum tipo de penalidade será aplicado caso não seja do meu interesse participar. Cabe ressaltar que fui informado que não haverá remuneração associada à participação na pesquisa.

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

**Consentimento:** Ciente das informações citadas anteriormente, eu concordo em participar da avaliação sensorial dos produtos elaborados na pesquisa.

ASSINATURA DO PARTICIPANTE DE PESQUISA:

---

**Data:** \_\_/\_\_/202\_\_

Assinatura do Pesquisador (a) Responsável :

---

Telefone: (53) 991709231

Data: \_\_/\_\_/202\_\_.

**Assinado por:**

**Tamires Soares Schug**

**(Pesquisadora**

**responsável)**

Professor supervisor: Dr. Eliezer Avila Gandra - Universidade Federal de Pelotas

Endereço e telefone do grupo de pesquisa: Laboratório de Ciência dos Alimentos e Biologia Molecular (LACABIM), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Sala 53, Prédio 04 - Campus Capão do Leão, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Caixa Postal, 354, CEP 96010.900 - Pelotas - RS - Brasil. Fone: +55(53) 3275-7354 ou +55 (53) 3275-7405

Comitê de Ética em Pesquisa da UFPEL - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas, Av Duque de Caxias 250, Fragata, CEP. 96.030-000. Tel. (53)3301-1801. E-mail: cep.famed@gmail.com

## Anexo B – Ficha de Avaliação

### Ficha de Teste de Ordenação Múltipla

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Idade: ( ) menor de 18 ( ) 18-45 anos ( ) 45-56 anos ( ) mais 56 anos

Gênero: ( ) Feminino ( ) Masculino ( ) outros

Qual foi o curso mais elevado que estudou ou estuda? ( ) fundamental ( ) Ensino Médio ( ) Ensino superior ( ) Pós graduação

#### Frequência de consumo

Consome produtos cárneos: ( ) sim ( ) Não

Com que frequência? ( ) de 1 a 3 vezes por mês ( ) de 4 a 6 vezes por mês  
( ) uma vez por mês ( ) raramente

Gosta/consome tomilho? ( ) sim ( ) Não

Com que frequência? ( ) de 1 a 3 vezes por mês ( ) de 4 a 6 vezes por mês  
( ) uma vez por mês ( ) raramente

Instruções: Você está recebendo uma amostra de embutido frescal identificada com P (padrão) e duas codificadas. Compare cada amostra com a padrão e identifique se é melhor, igual ou inferior em relação aos seguintes atributos:

(7) Muito melhor	Amostra 629	Amostra 275
(6) moderadamente melhor	Odor_____	Odor_____
(5) ligeiramente melhor	Cor_____	Cor_____
(4) igual ao padrão	Sabor _____	Sabor _____
(3) ligeiramente inferior	Impressão Global_____	Impressão Global_____
(2) moderadamente inferior		
(1) muito inferior		

### **Ficha de Teste de Intenção de compra**

Após provar/ degustar a amostras 629, responda com sua intenção de compra.

- (5) Certamente compraria
- (4) Provavelmente compraria
- (3) Talvez compraria/ Talvez não compraria
- (2) Provavelmente não compraria
- (1) certamente não compraria

Após provar/ degustar a amostras 275, responda com sua intenção de compra.

- (5) Certamente compraria
- (4) Provavelmente compraria
- (3) Talvez compraria/ Talvez não compraria
- (2) Provavelmente não compraria
- (1) certamente não compraria

**Anexo C – Resultados das análises físicas da embutido frescal bovina adicionado de nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e extrato de beterraba**

Formulação	Tempo		
	T0	T1	T2
<b>Umidade (%)</b>			
F0	50,7 ± 1,03cB	53,0 ± 0,76bA	56,5 ± 0,56aA
F1	50,4 ± 0,78bB	56,1 ± 2,20aA	57,4 ± 0,49aA
F2	55,0 ± 0,54aA	56,1 ± 2,38aA	57,9 ± 0,50aA
<b>Acidez (% ácido oleico)</b>			
F0	0,87 ± 0,03cA	1,12 ± 0,02bA	2,62a ± 0,02aB
F1	0,62 ± 0,07cC	1,15 ± 0,0bA	2,59 ± 0,01aB
F2	0,70 ± 0,07cB	1,15 ± 0,06bA	3,01 ± 0,05aA
<b>p-anisidina</b>			
F0	0,64 ± 0,74aA	0,70 ± 0,01aB	0,11 ± 0,00aA
F1	0,55 ± 0,71aA	0,74 ± 0,02aA	0,10 ± 0,00aA
F2	0,56 ± 0,81aA	0,71 ± 0,02aAB	0,12 ± 0,10aA
<b>CV k<sub>232nm</sub></b>			
F0	0,02 ± 0,00bB	0,03 ± 0,00bAB	0,11 ± 0,02aA
F1	0,04 ± 0,00bA	0,04 ± 0,00bA	0,12 ± 0,00aA
F2	0,04 ± 0,00bA	0,01 ± 0,01cB	0,11 ± 0,00aA
<b>CV K<sub>270nm</sub></b>			
F0	0,016 ± 0,01bA	0,016 ± 0,01bA	0,146 ± 0,00aB
F1	0,040 ± 0,00bA	0,032 ± 0,01bA	0,191 ± 0,01aA
F2	0,045 ± 0,01bA	0,020 ± 0,01cA	0,133 ± 0,01aB
<b>Cor</b>			
<b>L*</b>			
F0	54,70 ± 1,3aA	51,48 ± 2,3abA	49,19 ± 1,5bA
F1	46,93 ± 2,0aB	47,33 ± 0,6aB	47,19 ± 3,6aA
F2	45,30 ± 1,2bB	45,42 ± 0,9bB	49,65 ± 1,6aA
<b>a*</b>			
F0	13,39 ± 0,3bB	14,36 ± 1,3bB	19,31 ± 0,8aB
F1	23,44 ± 0,6aA	16,81 ± 1,5bB	26,75 ± 3,1aA
F2	22,52 ± 1,8aA	23,41 ± 0,4aA	23,62 ± 1,2aAB
<b>b*</b>			
F0	9,89 ± 0,3bA	11,59 ± 0,9aA	11,44 ± 0,8aA
F1	9,03 ± 1,0bA	10,32 ± 0,4abA	10,20 ± 1,7aA
F2	9,07 ± 0,7bA	8,46 ± 0,2bB	13,09 ± 1,6aA

Letras minúsculas iguais nas linhas e letras maiúsculas iguais nas colunas indicam que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) pelo teste Tukey, F0: formulação padrão, com 100% de conservantes; F1: formulação com redução de 50% do conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado; F2: formulação com redução total dos conservantes e adição de NEOT e extrato de beterraba desidratado; T0: 0 dias de armazenamento; T1: 7 dias de armazenamento e T2: 14 dias de armazenamento.