

ELISÂNGELA RAMIERES GOMES

**CINÉTICA DO CRESCIMENTO DE *Salmonella* spp. NA PRESENÇA DE  
CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE CARVACROL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

G633c  
2017

Gomes, Elisângela Ramieres, 1988-  
Cinética do crescimento de *Salmonella spp.* na presença de  
concentrações subinibitórias de carvacrol / Elisângela Ramieres  
Gomes. – Viçosa, MG, 2017.  
ix, 56f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Salmonela. 3. Bactérias.  
4. Alimentos - Microbiologia. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Ciências e Tecnologia de Alimentos. Programa de  
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

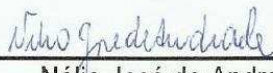
CDD 22 ed. 664

ELISÂNGELA RAMIERES GOMES

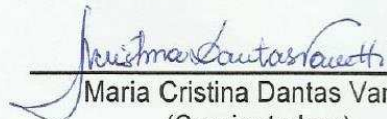
**CINÉTICA DO CRESCIMENTO DE *Salmonella* spp. NA PRESENÇA DE  
CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE CARVACROL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de julho de 2017.



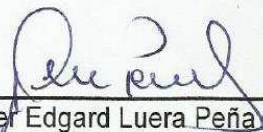
Nélio José de Andrade  
(Coorientador)



Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Coorientadora)



Luís César da Silva



Wilmer Edgard Luera Peña  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir concretizar mais um sonho e dar mais um passo em minha caminhada.

Ao meu orientador Wilmer Edgard, e aos meus coorientadores, Profa. Dra Maria Cristina e Prof. Dr. Nélio, pelos ensinamentos, paciência, dedicação, incentivo e, sobretudo, exemplos de profissionalismo e competência. Obrigada pela contribuição nesta etapa da minha formação.

Ao Prof. Dr. Luís César, por me ajudar na modelagem estocástica, pelo apoio, incentivo e disponibilidade em contribuir com esse trabalho.

Ao meu marido Fabio, pela dedicação, carinho, atenção, paciência e incentivo para realização desse trabalho.

Aos meus pais, Aparecida Ilma e José Maria, aos meus irmãos, aos meus avós em especial a Vanda Rodrigues e Gentil Gomes, pelo exemplo de vida, amor e apoio incondicional para minha formação.

A Universidade Federal de Viçosa, pelas oportunidades concedidas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, especialmente a Adeline, Camila, Miriam, Luiza e Paulo César, por toda ajuda, compreensão, incentivo e amizade.

A todos os meus amigos, que fizeram parte da minha caminhada, tornando meus dias mais leves e agradáveis.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

Enfim, agradeço imensamente a todos que me ajudaram a concluir mais uma etapa da minha vida!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
3.1. Patógenos em alimentos .....	4
3.1.1. <i>Salmonella</i> .....	4
3.1.2. Métodos de controle da incidência de <i>Salmonella</i> em alimentos ..	7
3.2. Compostos antimicrobianos.....	7
3.2.1. Modo de ação dos óleos essenciais .....	8
3.2.2. Carvacrol: definição e legislação .....	8
3.2.3. Aplicações de carvacrol em alimentos.....	9
3.3. Microbiologia preditiva .....	10
3.3.1. Modelos segundo a categoria do evento microbiológico .....	12
3.3.2. Modelos de acordo com o nível da variável estudada .....	12
3.3.3. Modelagem estocástica .....	14
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
4.1. Delineamento experimental .....	16
4.2. Preparo do inóculo .....	16
4.3. Preparo da solução do carvacrol .....	17
4.4. Ensaio antimicrobiano.....	17

4.5. Modelos primário e secundário .....	18
4.6. Modelo estocástico .....	19
5. Resultados e Discussão.....	21
5.1. Efeito do carvacrol no comportamento cinético dos sorotipos de <i>Salmonella</i> .....	21
5.2. Modelagem secundária .....	30
5.3. Modelagem estocástica .....	32
5.3.1. Modelo estocástico I .....	32
5.3.2. Simulação de Monte Carlo para estimativa do efeito de carvacrol em <i>Salmonella</i> spp. (Modelo II).....	34
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química do carvacrol ..... 9
- Figura 2.** Curvas de crescimento de *Salmonella* Heidelberg para concentrações de carvacrol 0, 0,056 e 0,113  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  sob as temperaturas de 10 °C (A), 15 °C (B) 25 °C (C) e 35 °C (D), em função do tempo..... 22
- Figura 3.** Curvas de crescimento de *Salmonella* Schwarzengrund para concentrações de carvacrol 0, 0,056 e 0,113  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  sob as temperaturas de 10 °C (A), 15 °C (B) 25 °C (C) e 35 °C (D), em função do tempo..... 23
- Figura 4.** Curvas de crescimento de *Salmonella* Infantis 1 para concentrações de carvacrol 0, 0,056 e 0,113  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  sob as temperaturas de 10 °C (A), 15 °C (B) 25 °C (C) e 35 °C (D), em função do tempo..... 24
- Figura 5.** Curvas de crescimento de *Salmonella* Infantis 2 para concentrações de carvacrol 0, 0,056 e 0,113  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  sob as temperaturas de 10 °C (A), 15 °C (B) 25 °C (C) e 35 °C (D), em função do tempo..... 25

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Médias das taxas de crescimento  $\log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$  de sorotipos de *Salmonella* submetidos a diferentes temperaturas e concentrações de carvacrol ..... **26**
- Tabela 2.** Médias dos tempos de fase lag (h) dos sorotipos de *Salmonella* submetidos a diferentes temperaturas e concentrações de carvacrol. . **29**
- Tabela 3.** Valores dos índices estatísticos (bias e exatidão) calculados para os modelos secundários de taxa de crescimento e tempo de fase lag. **32**
- Tabela 4.** Parâmetros de distribuições de probabilidade no modelo terciário I dos sorotipos isolados de carne de frango. .... **36**
- Tabela 5.** Parâmetros de distribuições de probabilidade no modelo terciário I dos sorotipos isolados de carne de suína..... **37**
- Tabela 6.** Valores máximos de taxa de crescimento ( $\log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$ ), tempo de fase lag (h) e aumento do logarítmico da população ( $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) os sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de frango ao nível de probabilidade acumulada de 95%..... **38**
- Tabela 7.** Valores máximos da taxa de crescimento ( $\log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$ ), tempo de fase lag (h) e aumento do logarítmico da população ( $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) apresentados pelos sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de frango para o nível de probabilidade acumulada de 95% ..... **39**
- Tabela 8.** Níveis de probabilidade acumulada dos valores de taxa de crescimento em  $\log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$  dos sorotipos de *Salmonella* sob diferentes concentrações de carvacrol e temperatura. .... **41**

## RESUMO

GOMES, Elisângela Ramieres, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Cinética do crescimento de *Salmonella* spp. na presença de concentrações subinibitórias de carvacrol.** Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña. Coorientadores: Maria Cristina Dantas Vanetti e Nélio José de Andrade.

Compostos naturais, como o carvacrol, podem ser utilizados para inibir ou diminuir o crescimento de bactérias patogênicas ou deterioradoras em alimentos. Para avaliar a eficácia deste tipo de composto é conveniente estudar a cinética de crescimento microbiana, levando em consideração a influência de outros fatores como a temperatura. Os modelos matemáticos são úteis nas previsões do comportamento microbiano. Desse modo, neste estudo foi avaliado a cinética de crescimento dos sorotipos de *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Schwarzengrund, *Salmonella* Infantis 1 e *Salmonella* Infantis 2 em função de diferentes concentrações de carvacrol (0, 0,056 e 0,113  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sob as temperaturas de 10, 15, 25 e 35 °C. O crescimento microbiano foi acompanhado utilizando microplacas de poliestireno de 96 poços, sendo realizadas leituras de densidade óptica ao longo do tempo até atingir a fase lag. Curvas de crescimento foram ajustadas empregando o modelo de Gompertz modificado, sendo determinados taxa de crescimento, tempo de fase lag, número inicial de micro-organismo e aumento logarítmico da população, posteriormente, foram ajustados os modelos de superfície de resposta, com o qual aprimorou a interação entre as variáveis estudadas. A partir dos resultados obtidos pelo modelo primário e secundário foram construídos dois modelos estocásticos. Para construção do primeiro modelo foi empregado os parâmetros ajustados por meio do modelo de Gompertz modificado, sendo considerada distribuições de probabilidade para taxa de crescimento e tempo de fase lag. O segundo modelo, foi construído com os coeficientes ajustado pelo modelo de superfície de resposta em que a interação entre concentração de carvacrol e temperatura foram levados em consideração. Por meio das análises realizadas, foi possível verificar que a combinação da concentração de carvacrol e a variação da temperatura

influenciaram na cinética de multiplicação de *Salmonella*, observando também variabilidade entre os sorotipos avaliados.

## ABSTRACT

GOMES, Elisângela Ramieres, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Kinetics of the growth of *Salmonella* spp. in the presence of concentrations subinibitory of carvacrol.** Adviser: Wilmer Edgard Luera Peña. Co-advisers: Maria Cristina Dantas Vanetti and Nélio José de Andrade.

The evaluation of growth kinetics of four *Salmonella* serotypes was analyzed as a function of the carvacrol concentrations of 0, 0.056 and 0.113  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  under the temperatures of 10, 15, 25 and 35  $^{\circ}\text{C}$ . Microbial growth was monitored using 96-well polystyrene microplates and optical density readings were performed over time until the medium reached microbial stability. The growth curves were adjusted by the modified Gompertz model, in which the growth rate and lag time data were generated, after the response surface models were adjusted, which the interaction between the variables was studied. With results obtained by the primary and secondary models, two stochastic models were constructed. The first model was constructed with the data generated by the Gompertz model, only the growth rate and lag time data were considered as a function of analysis time, carvacrol concentration and temperature. While the other model was constructed with the coefficients adjusted by the response surface model in which interaction between carvacrol concentration and temperature were taken into account. By means of these analyzes, it was possible to verify that the combination of the carvacrol concentration and the temperature variation influenced the kinetics of *Salmonella* multiplication, being also observed variability among the evaluated serotypes

## 1. INTRODUÇÃO

Salmonelose é uma doença causada pela bactéria *Salmonella* spp., com casos recorrentes em todo o mundo. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde no período entre 2007 a 2014, foram notificados 450 surtos causados por bactéria do gênero *Salmonella* com um total de 13.165 pessoas acometidas. A União Europeia (UE) registrou 43.183 casos de surtos de origem alimentar, sendo 22,5 % desse total provocados pela bactéria *Salmonella* spp. Geralmente a causa de salmoneloses está associada ao consumo de alimentos contaminados como carnes de frango, bovina e suína, alimentos frescos e ovos.

Técnicas de higiene e conservação são necessárias para evitar o crescimento de bactérias patogênicas como *Salmonella* spp. nos alimentos. Exemplos dessas técnicas são os cuidados com a limpeza e sanitização dos equipamentos e do ambiente de processamento de alimentos, além de técnicas de conservação como a refrigeração, pasteurização, apertização e adição de conservantes. Pesquisas atuais apontam novas técnicas de conservação com utilização de antimicrobianos naturais como alternativa inovadora para auxiliar no controle microbiano.

Os antimicrobianos naturais geralmente são compostos provenientes de plantas medicinais, condimentos ou bactérias que são capazes de inibir ou inativar micro-organismos. Um exemplo desses antimicrobianos são os óleos essenciais extraídos de plantas. Esses óleos podem conter substâncias antimicrobianas. Dentre essas substâncias se destaca o carvacrol, um composto majoritário presente em vários óleos essenciais como os de orégano (*Origanum minutiflorum*, *Origanum onites*) e tomilho preto (*Thymbra spicata*). O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) é um fenol monoterpênico, que possui sabor picante, odor característico e possui ação antimicrobiana contra diversas bactérias patogênicas encontradas em alimentos.

Estudos mostram diferentes formas de utilização do carvacrol em alimentos, como em filmes de revestimento ou conservante em carnes,

frutas e molhos. Desse modo, o carvacrol pode ser utilizado em alimentos para evitar o crescimento de bactérias patogênicas ou deterioradoras e, conseqüentemente, prolongar a vida de prateleira dos produtos.

Uma ferramenta empregada para avaliação da eficácia de substâncias antimicrobianas é a microbiologia preditiva. A microbiologia preditiva é utilizada também para auxiliar no processo de gestão e garantia de qualidade. Essa ferramenta utiliza modelos matemáticos para descrever o comportamento microbiano, em diferentes situações, como crescimento, sobrevivência e inativação. Essas situações são influenciadas por fatores como, pH, atividade de água ( $A_w$ ), temperatura e tempo de estocagem. Os principais modelos matemáticos empregados em microbiologia preditiva podem ser determinísticos e estocásticos. Os modelos determinísticos descrevem o desenvolvimento de populações microbianas apresentando estimativas pontuais. Entretanto, em razão de variações das características que influenciam a cinética de multiplicação microbiana, os modelos determinísticos tornam-se inapropriados para análises de risco. Nesse caso dá-se preferência aos modelos estocásticos, que utilizam distribuições de probabilidade para descrever o comportamento microbiano.

A avaliação de antimicrobianos naturais com o uso da ferramenta da microbiologia preditiva é importante para o conhecimento sobre o comportamento microbiano. Dessa forma, torna-se possível propor medidas de controle do crescimento, sobrevivência e inativação de micro-organismos em alimentos com o uso de produtos naturais.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Estudar a cinética de multiplicação microbiana de *Salmonella* utilizando modelagem determinística e estocástica.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a multiplicação microbiana de quatro sorotipos de *Salmonella entérica* para diferentes níveis de temperatura e concentração de carvacrol;
- Determinar o tempo de fase lag e taxa de crescimento dos quatro sorotipos nas diferentes condições testadas, utilizando modelo de Gompertz modificado;
- Modelar a taxa de crescimento e tempo de fase lag em função temperatura e concentração de carvacrol utilizando modelo de superfície de resposta;
- Simular a taxa de crescimento e tempo de fase lag, utilizando modelagem estocástica, para diferentes níveis de temperatura e concentração de carvacrol.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Patógenos em alimentos

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, cerca de 600 milhões de pessoas no mundo adoecem após a ingestão de alimentos contaminados por bactérias, vírus, parasitas ou substâncias químicas, cerca de 420 mil morrem todos os anos. Os patógenos mais comuns associados a essas doenças de origem alimentar são *Salmonella*, *Campylobacter* e *Escherichia coli* enterohemorrágica (WHO, 2015). Esses patógenos são capazes de evoluir e adquirir novas propriedades, proporcionando resistência microbiana, o que leva a novos desafios para a saúde pública (NEWELL et al., 2010). Dentre os patógenos mais comumente associados a doenças de origem alimentar, *Salmonella* spp. pode causar em humanos desde doenças simples como gastroenterite leve até infecções sistêmicas, potencialmente fatais como febre tifoide (ZOU et al., 2016).

##### 3.1.1. *Salmonella*

Bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família Enterobacteriaceae, são Gram-negativas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos. Geralmente são encontradas em vários alimentos como carnes de frango, suína, bovina e ovos (CHEMALY et al., 2009; GURAN; MANN; ALALI, 2017; MATHOLE et al., 2017). Alguns sorovares de *Salmonella*, mesmo em populações muito baixas, como cerca de até 10 células, são capazes de causar doenças de origem alimentar, como gastroenterites, denominada de salmonelose e a febre tifoide (KAPPERUD et al., 1990; NGUYEN et al., 2016). A salmonelose apresenta como principais sintomas diarreia, dores abdominais e vômito e os principais grupos de riscos para essas doenças incluem mulheres grávidas, crianças, idosos e pacientes com imunodeficiência ou com doença neoplásica (FARDSANEI et al., 2016).

A presença de *Salmonella* spp., geralmente, está associada a alimentos de origem animal, no entanto, nos últimos anos, há relatos de surtos em razão do consumo de alimentos de origem vegetal como alface, brotos de alfafa, melão, pimentão e tomates (TAUXE et al., 1997; SIVAPALASINGAM et al., 2004; CDC, 2008). A legislação brasileira estabelece a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de amostra do alimento (BRASIL, 2001).

*Salmonella* spp. está presente no solo, na água, em fezes de animais e nas superfícies de equipamentos (DE OLIVEIRA; SOARES; PICCOLI, 2013). Desse modo, pode ocorrer a contaminação cruzada, por meio do contato do alimento com utensílios e superfícies contaminados (YADAV et al., 2016). Outra forma de contaminação cruzada consiste no contato de alimentos frescos com o exsudado de carne (SZE-FAN TAN; RAHMAN; DYKES, 2016). Além disso, a falta de cuidados dos manipuladores de alimentos com as medidas de higiene, também possibilita que micro-organismos patogênicos entre em contato com o alimentos (WAMBUI et al., 2017).

Isolados de *Salmonella* de origem animal podem apresentar resistência a antibióticos como nitrofurantoína e ácido nalidíxico (FARDSANEI et al., 2016). Além disso, isolados de *Salmonella* proveniente de alimentos como carne de porco, aves, carne bovina, camarão e peixes de água doce também apresentaram resistência a antibióticos como tetraciclina, ampicilina, cloramfenicol e sulfametoxazol, sendo que alguns isolados apresentaram resistência a mais de três classes de antibióticos (NGUYEN et al., 2016). A resistência a antibióticos se deve a características genéticas de *Salmonella* como o perfil do plasmídeo (LAUDERDALE et al., 2006; RODRÍGUEZ et al., 2009).

O gênero *Salmonella* engloba vários sorotipos que são geneticamente semelhantes, mas que podem apresentar reações diferentes, devido à especificidade do hospedeiro (ZOU et al., 2016). Isolados de *S. enterica* de origem humana e bovina, pertencentes a vários sorotipos (Enteritidis, Typhimurium, Newport, Heidelberg, Montevideo, Infantis, Agona e

Seftenberg) apresentaram extensa variabilidade na resposta de tolerância ao ácido (LIANOU; NYCHAS; KOUTSOUMANIS, 2017).

Além disso, a variabilidade intra-espécie pode alterar a cinética de crescimento, como mostrou o estudo de Lianou e Koutsoumanis (2011a). Os autores avaliaram 60 isolados de *S. enterica* provenientes de animais e humanos, e verificaram que existe variabilidade na taxa de crescimento em função de alterações de pH e *A<sub>w</sub>*. Ainda é possível, em condições extremas de pH e NaCl, evidenciar a variabilidade intra-espécies apresentadas por essas bactérias (LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2011b). Assim, os elementos na avaliação quantitativa de risco microbiano podem ser diferentes, mesmo quando se avalia a mesma espécie (LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2011a). Esse comportamento foi observado em vários agentes patogênicos como *E. coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *S. enterica* e *Staphylococcus aureus* (FEHLHABER; KRÜGER, 1998; COLEMAN et al., 2003; LINDQVIST, 2006).

Nos últimos anos, sorotipos de *Salmonella* como *Salmonella enterica* Heidelberg, Schwarzengrund e Infantis foram isolados em diversos países em todo o mundo e várias pesquisas foram feitas quanto as características genéticas, devido a patogenicidade e resistência (ASAI et al., 2009; BANGTRAKULNONTH et al., 2004; GONZALEZ-SANZ et al., 2009; SHAHADA et al., 2006).

Os sorotipos de *Salmonella enterica* Heidelberg, Schwarzengrund e Infantis podem causar doenças de origem alimentar que apresentam sintomas como diarreia, febre, cólicas abdominais, septicemia e em alguns casos pode levar até a morte, sendo o principal grupo de risco pessoas idosas (TAYLOR et al., 1993; CHITTICK et al., 2006; CHIRONNA et al., 2014).

As infecções alimentares causadas por esses sorotipos podem estar associadas ao consumo de *nuggets*, carne de frango, carne suína, carne de peru, peixe e ovos pouco cozidos (BURT et al., 1990; ESAKI et al., 2004; VUGIA et al., 2004; AARESTRUP et al., 2007). Esses sorovares apresentam resistência a múltiplos antibióticos (LAUDERDALE et al., 2006; NOGRADY

et al., 2008; CHEN et al., 2010; DUTIL et al., 2010; AKIYAMA; KHAN, 2012), o que pode dificultar o tratamento de pessoas afetadas.

### **3.1.2. Métodos de controle da incidência de *Salmonella* em alimentos**

Métodos utilizados para reduzir a incidência de *Salmonella* em alimentos de origem animal incluem medidas aplicadas durante a criação e abate dos animais, além de higiene e desinfecção do ambiente de processamento (WEGENER et al., 2003).

O crescimento de *Salmonella* pode ser evitado empregando o hipoclorito de sódio, ácidos orgânicos como ácido acético, propiônico, láctico, málico e cítrico, além de tratamento térmico e o uso de bacteriófago (DICKSON, 1991; JAQUETTE; BEUCHAT; MAHON, 1996; BEUCHAT et al., 1998; LEVERENTZ et al., 2001; PARK et al., 2011). Assim como, o uso de altas pressões, radiação ionizante, campo elétrico pulsado e a radiação ultravioleta (GOMES; MOREIRA; CASTELL-PEREZ, 2011; LADO; YOUSEF, 2002; LUNG et al., 2015; TAHERGORABI; MATAK; JACZYNSKI, 2012). A alteração do pH, da  $A_w$  e a adição de sorbato de potássio também são alternativas consideradas para inibir esse patógeno (PARISH et al., 2003).

Compostos antimicrobianos como timol, carvacrol, eugenol e ácido cinâmico também podem ser usados para o controle de *Salmonella* Typhimurium (OLASUPO et al., 2003).

### **3.2. Compostos antimicrobianos**

O uso de plantas medicinais, aromáticas e condimentares como agentes antimicrobianos são reportados por muitos pesquisadores, como por exemplo os frutos de *Emblica officinalis*, *Terminalia chebula*, *Terminalia bellerica*, as raízes de *Plumbago zeylanica* e as cascas de *Holarrhena antidysenterica* (AHMAD; MEHMOOD; MOHAMMAD, 1998; SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998; RÍOS; RECIO, 2005). Dessas plantas medicinais é extraído o óleo essencial ou extrato, que pode ser usado em

embalagens de alimentos e na higienização de superfície nas indústrias de alimentos a fim de inibir o crescimento de micro-organismos (BURT, 2004; YADAV et al., 2016). Tais compostos antimicrobianos podem ainda desempenhar um função expressiva no aumento da vida útil dos alimentos (PRAKASH et al., 2015).

### **3.2.1. Modo de ação dos óleos essenciais**

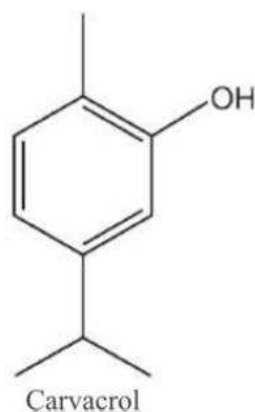
O mecanismo de ação dos óleos essenciais pode envolver vários alvos na célula microbiana como danos na membrana plasmática, inibição da bomba de efluxo e inibição da atividade da enzima ATPase (BURT, 2004; GILL; HOLLEY, 2006; MILADI et al., 2016).

A hidrofobicidade dos óleos essenciais pode promover a quebra dos lipídeos de membrana e, conseqüentemente, aumentar a permeabilidade da mesma, o que leva ao extravasamento do material intracelular, como íons fosfato e potássio (BURT, 2004). Além disso, quando as células são expostas a certas condições como pH baixo, baixas temperaturas e baixos níveis de oxigênio, a ação dos óleos essenciais é facilitada (BURT, 2004). Utilizando a microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser foram observadas alterações causadas nas células de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 11253 pela presença de 2,5  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  de carvacrol e 10  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  de 1,8-cineol (SOUSA et al., 2012). Essas alterações incluíam o encolhimento do protoplasma, descontinuidade das membranas externas e citoplasmáticas e vazamento do material intracelular provocando a morte das células. Além disso, carvacrol e timol são capazes de inibir a bomba de efluxo, o que possibilita a sensibilização das células de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas à antibióticos e sanitizantes (MILADI et al., 2016).

### **3.2.2. Carvacrol: definição e legislação**

O carvacrol é um composto fenólico presente em muitos óleos essenciais como o de orégano, tomilho e manjerona (FLORES et al., 2016).

Esse composto pode ser extraído utilizando as técnicas de ultra-som assistida, maceração e percolação (BARANAUSKAITĖ et al., 2016). A identificação desse composto, cuja estrutura química está representada na Figura 1, pode ser feita utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (MILOS; MASTELIC; JERKOVIC, 2000).



**Figura 1.** Estrutura química do carvacrol

Muitas pesquisas mostram que o carvacrol possui propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antioxidantes (LAMBERT et al., 2001; CHAVAN; TUPE, 2014; ARIGESAVAN; SUDHANDIRAN, 2015; SÁNCHEZ; AZNAR; SÁNCHEZ, 2015). O uso do carvacrol em alimentos está aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e compõe a lista de aromas químicos do Conselho da Europa, especificado como categoria B, que permite o uso de carvacrol em bebidas a concentração de  $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e de  $25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em doces (DE VINCENZI et al., 2004). No Brasil, contudo, não há referência na legislação quanto ao uso dessa substância em alimentos.

### **3.2.3. Aplicações de carvacrol em alimentos**

O carvacrol apresenta atividade antimicrobiana sobre bactérias como *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *P. fluorescens* e *E. coli* (BEN ARFA et al., 2006). Por esse motivo, esse composto é usado como um dos componentes para o revestimento de frutas a fim de aumentar a vida de prateleira (FLORES et

al., 2016). O carvacrol foi capaz de reduzir a contagem de mesófilos aeróbios de 6,6 log para  $< 2 \text{ log UFC} \cdot \text{g}^{-1}$  por 21 dias a 4 °C em kiwi, além de prolongar a fase lag da microbiota do melão (ROLLER; SEEDHAR, 2002). Entretanto, altas concentrações de carvacrol podem modificar a cor e odor dos frutos avaliados. Em outro trabalho, a adição do carvacrol e timol em molho de soja mostrou-se eficaz contra *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium e *L. monocytogenes* sem causar impacto sensorial (MOON; RHEE, 2016). A aplicação do clorito de sódio acidificado ou carvacrol, como uma barreira antes do tratamento térmico em frango com pele, foi capaz de inativar *Salmonella*, sem alterar a qualidade do produto (YADAV et al., 2016). A combinação de carvacrol com dióxido de carbono em embalagens para alimentos mantidos em atmosfera modificada se mostrou eficiente na inibição de *Salmonella* e *Campylobacter jejuni* em costeletas de peru sem alterar as características sensoriais (NAIR et al., 2015). O uso do carvacrol em embalagens para alimentos tem sido promissora e pode ser combinado com diferentes polímeros para atingir as propriedades desejáveis (RAMOS; JIMÉNEZ; GARRIGÓS, 2016). Além disso, esse composto é considerado como conservante natural e reconhecido como GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros) (FLORES et al., 2016).

A aplicação prática dos óleos essenciais em alimentos tem limitações como a baixa solubilidade em água, alta volatilidade, além de poder causar mudanças nas propriedades sensoriais dos alimentos (MA; DAVIDSON; ZHONG, 2016). No entanto, os óleos essenciais podem ser usados na forma de nanoemulsões que promove a homogeneização, além de auxiliar na sua ação (MA; ZHONG, 2015; XUE; ZHONG, 2014).

### **3.3. Microbiologia preditiva**

Microbiologia preditiva é usada na área de microbiologia para a previsão da evolução de populações microbianas ao longo do tempo por meio de modelos matemáticos (FERRER et al., 2009). Esses modelos podem ser aplicados, por exemplo, na previsão do comportamento de microorganismos em alimentos durante o processamento, transporte, distribuição

e armazenamento, auxiliando na estimativa da vida útil e na avaliação de risco (HUANG, 2014).

Os modelos preditivos possuem grande quantidade de informações condensadas que podem ser aplicadas na prática em sistemas de gestão de qualidade como Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), tecnologia de barreiras e análise de risco microbiológico quantitativo (MCMEEKIN, 2007; ROSS; MCMEEKIN; BARANYI, 2014). Essas previsões podem ser realizadas utilizando programas de computador que, por meio de modelos, calcula o crescimento ou não o crescimento de patógenos e assim, auxilia no uso do APPCC nas empresas (TENENHAUS-AZIZA; ELLOUZE, 2015).

Esses modelos podem ser considerados ferramentas para investigar e resumir o efeito das condições ambientais que influenciam na ecologia microbiana (VALDRAMIDIS, 2016). Em alguns casos, empregam-se ferramentas da microbiologia preditiva para ajustar uma função que descreva a cinética de crescimento microbiano perante condições ambientais pré-definidas (STAMATI et al., 2016).

Os modelos podem configurar com uma equação matemática ou função que descreve, quantitativamente, a relação entre os diferentes fatores como pH, temperatura,  $A_w$  e os valores de resposta, ou seja, o comportamento microbiano nessa condição (ALGHOONEH et al., 2015). Por meio dos modelos é possível prever o crescimento de bactérias durante o resfriamento, verificar a eficácia do processamento e também determinar doses de conservantes a serem utilizados nos alimentos (GUILLIER, 2016).

Os modelos matemáticos são instrumentos de auxílio à tomada de decisão, como, por exemplo, a definição da concentração ideal do agente antimicrobiano em alimentos armazenados sobre refrigeração (POSSAS et al., 2015). Para modelar curvas de crescimento microbiano são necessários dados experimentais, o que pode demandar horas de trabalho ao ser empregado método de contagem em placa. Desse modo, o método de medida de densidade óptica (D. O.) se destaca por possibilitar a obtenção de grandes quantidades de dados em menor tempo (BEGOT; DESNIER; DAUDIN, 1996).

### 3.3.1. Modelos segundo a categoria do evento microbiológico

Os modelos aplicados à microbiologia preditiva são divididos em duas categorias: mecanísticos e empíricos. Os modelos mecanísticos, normalmente, descrevem a resposta microbiana por meio de modelos matemáticos clássicos de base teórica, fato que limita o uso dos mesmos devido à dificuldade de ajuste na descrição dos dados experimentais, por não considerar aspectos da fisiologia microbiana (MUÑOZ et al., 2010). Já os modelos empíricos provêm de adaptações dos modelos mecanísticos com a finalidade de aprimorar a descrição dos processos fisiológicos. Desse modo, essa categoria de modelos é a mais utilizada na microbiologia preditiva (MCMEEKIN; ROSS, 2002).

### 3.3.2. Modelos de acordo com o nível da variável estudada

Quanto ao critério nível da variável estudada, os modelos empregados em microbiologia preditiva são classificados em primários, secundário e terciários.

Os modelos primários estimam a resposta microbiana ao longo do tempo, utilizando o mínimo de parâmetros para definir, com precisão, as diferentes fases do crescimento microbiano (TAYLOR et al., 2015). A curva de crescimento bacteriana é representada graficamente com o logaritmo do número de células em função do tempo. Contudo, para isso é necessário definir o número inicial de células, o intervalo de tempo, a taxa de crescimento e a densidade máxima da população (ROSS; MCMEEKIN, 2003). Um exemplo de modelo primário é descrito por meio da Equação 1, que possibilita a previsão do tempo necessário para deterioração de alimento (MONOD, 1949).

$$t_s = \frac{\log N_s - \log N_0}{\log 2} \times \gamma \quad (1)$$

Em que:

$t_s$  é o tempo (dias) para desenvolver a deterioração sobre um dado conjunto de condições intrínsecas e extrínsecas;

$N_s$  é a concentração de final micro-organismos (UFC·g<sup>-1</sup> ou UFC·mL<sup>-1</sup>) presente;

$N_0$  é a concentração de micro-organismos (UFC·g<sup>-1</sup> ou UFC·mL<sup>-1</sup>) inicialmente presente;

$\gamma$  é o tempo de geração (h) sobre as circunstâncias determinadas.

Por meio da Equação 1 é possível calcular a vida de prateleira do produto, a partir da estimativa de  $N_0$  (MONOD, 1949).

Os modelos secundários são aplicados para descrição do comportamento microbiano mediante definições de condições ambientais como temperatura, pH e  $A_w$ , tendo como base os modelos primários (GEERAERD et al., 2004). Um exemplo de modelo secundário é o modelo de superfície de resposta, que segundo Ross e McMeekin (1994) podem ser descritas por meio de equações polinomiais como a Equação 2.

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

Em que:

$y$  é a variável resposta;

$\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_{ij}$  são parâmetros a serem estimados;

$X_1, X_2, \dots, X_{ij}$  são as variáveis a serem estudadas.

Os modelos terciários consistem em expressar as previsões dos modelos primários e, ou secundários por meio de programas de computador (GEERAERD et al., 2004) que podem ser desenvolvidos com o uso da linguagem de programação ou de linguagens de simulação. Alguns dos

programas que utilizam da modelagem matemática são *Pathogen Modeling Program* (PMP)(BUCHANAN, 1993), *Growth Predictor*, *Seafood Spoilage Predictor* (DALGAARD, 1995) e *Pseudomonas Predictor* (NEUMEYER; ROSS; MCMEEKIN, 1997). Esses programas são usados na indústria de alimentos, uma vez que possuem uma interface de fácil entendimento e podem ser utilizados por funcionários que não sejam especialistas na área (MEMBRÉ; LAMBERT, 2008).

### **3.3.3. Modelagem estocástica**

Os modelos terciários podem ser determinísticos ou estocásticos. Os modelos determinísticos não englobam variáveis aleatórias, portanto o valor previsto é único. Entretanto, os modelos estocásticos, por englobarem uma ou mais variáveis aleatórias, têm a previsão dos valores associadas à probabilidade de ocorrência (NICOLAÏ; VAN IMPE, 1996; KOUTSOUMANIS et al., 2010).

Normalmente, os modelos determinísticos proporcionam estimativa pontuais das concentrações microbianas, fato que determinam questionamentos, em razão do seu grau de variação na dinâmica microbiana (NICOLAÏ; VAN IMPE, 1996). Esse questionamento se deve às informações que muitas vezes são insuficientes para serem aplicadas em APPCC e nos projetos de análise de risco (POSCHET et al., 2003). Dessa forma, surgiu a necessidade de modelos estocásticos (NICOLAÏ; VAN IMPE, 1996).

Por meio dos modelos estocásticos é possível considerar fontes de variabilidade como variações nos níveis iniciais de contaminantes, variações no crescimento ou na sobrevivência, variações nos métodos de preparação de alimentos e da suscetibilidade do hospedeiro, que são considerados adequados para a avaliação de risco (MUÑOZ et al., 2010).

Ao comparar os modelos determinísticos com os modelos estocásticos nota-se que os modelos determinísticos ignoram as incertezas dos parâmetros preditivos e não possuem um nível de confiança conhecido. Por outro lado, os modelos estocásticos abordam os resultados

probabilísticos que levam em conta os riscos na tomada de decisão, o que é fundamental nas estratégias de gerenciamento de risco (EINSTEIN, 1996; STURK; OLSSON; JOHANSSON, 1996). Além disso, os modelos determinísticos não são capazes de lidar com a variabilidade das células, por isso, os modelos estocásticos tem uma abordagem baseada na análise da distribuição dos tempos de fase lag em células individuais. Esses modelos, também modelam a probabilidade de sobrevivência e crescimento de forma mais precisa em baixas contagens microbianas (BARANYI, 2002).

Os modelos estocásticos assim como os determinísticos podem descrever a contaminação do alimento durante a vida de prateleira, sendo que os modelos estocásticos são estruturados utilizando as principais fontes de variabilidade (COUVERT et al., 2010). Ao ser empregado modelos estocásticos utiliza-se a simulação de Monte Carlo, em que os riscos e as incertezas são descritos por meio de distribuições de probabilidade e as previsões são associadas a níveis de probabilidade (MCMEEKIN, 2007; COPUR et al., 2014). Esse modelo gera aleatoriamente múltiplos cenários que leva em conta os valores das variáveis escolhidas aleatoriamente, com cada cenário ponderado pela sua probabilidade de ocorrência (LATIMER et al., 2002).

As fontes de variação na avaliação de risco podem ser alterações do crescimento ou sobrevivência do micro-organismo entre a produção e o consumo desse produto, que incluem variações devido à formulação, na temperatura, tempo de armazenamento e na distribuição desse produto (MUÑOZ et al., 2010). Portanto, o objetivo da avaliação de risco é estimar e caracterizar o risco para os consumidores referentes ao patógeno possivelmente presente no produto final (MEMBRÉ; LAMBERT, 2008).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

### 4.1. Delineamento experimental

O experimento foi um realizado considerando um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial completo com dois fatores (4x4), sendo quatro níveis de temperaturas e quatro níveis de concentração de carvacrol, que foram utilizados para avaliar os efeitos e interações de temperatura e concentração de carvacrol sobre o crescimento de *Salmonella*.

### 4.2. Preparo do inóculo

Para a condução do experimento foram utilizados dois isolados de *Salmonella* de carne de frango: *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Schwarzengrund e dois isolados de carne suína: *Salmonella* Infantis 1 e *Salmonella* Infantis 2, fornecidos pelo Departamento de Veterinária da UFV. Esses isolados foram conservados a -70 °C em caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) (Himedia®, Roseto degli Abruzzi, Itália) contendo 10 % (v/v) de glicerol. Os isolados foram ativados por duas vezes consecutivas, a uma temperatura de incubação de 35 °C por 24 h. Posteriormente, realizaram-se diluições em solução salina 0,85 % (v/v) de modo a obter um inóculo com, aproximadamente  $10^6$  UFC·mL<sup>-1</sup>.

### **4.3. Preparo da solução do carvacrol**

O carvacrol  $\geq 98\%$  (5-isopropil-2-metilfenol) de pureza, foi adquirido da empresa Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha). As soluções de carvacrol foram preparadas em caldo BHI (Himedia®), de modo a obter as concentrações finais de 0,056; 0,113 e 0,225  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ , adicionado de 2 % dimetilsulfóxido (DMSO) para emulsificação do carvacrol. As emulsões foram preparadas imediatamente antes de cada teste e repetição para cada isolado de *Salmonella*.

### **4.4. Ensaio antimicrobiano**

A atividade antimicrobiana de carvacrol foi avaliada por meio de curvas de crescimento conforme descrito por Belda-Galbis e colaboradores (2013), usando microplacas de poliestireno de 96 poços. Os tratamentos consistiram nos poços contendo 180  $\mu\text{L}$  de solução de carvacrol nas concentrações de 0,056; 0,113 e 0,225  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 20  $\mu\text{L}$  da cultura bacteriana. O controle negativo consistiu nos poços com 180  $\mu\text{L}$  das soluções de carvacrol e 20  $\mu\text{L}$  de solução salina 0,85 % (v/v), o controle positivo continha 180  $\mu\text{L}$  de meio de cultura e 20  $\mu\text{L}$  do inóculo. O branco foi constituído por 180  $\mu\text{L}$  de meio de cultura e 20  $\mu\text{L}$  de solução salina 0,85 % (v/v). Posteriormente, as microplacas foram incubadas nas temperaturas de 10, 15, 25 e 35 °C (FEHLHABER; KRÜGER, 1998).

A curva de crescimento foi acompanhada utilizando o equipamento leitor de microplacas (Modelo Expert Plus - Asys®). As microplacas foram agitadas por 20 s e, em seguida, realizada as leituras com D.O. em 600 nm. O tempo entre as leituras foi definido conforme a temperatura de incubação e os ensaios foram realizados em quadruplicada e três repetições.

#### 4.5. Modelos primário e secundário

Os dados de densidade óptica foram transformados em log ( $\log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})$ ) utilizando uma curva de calibração para cada sorotipo de *Salmonella*. Posteriormente, os dados foram ajustados à equação de Gompertz modificada (Equação 4):

$$\log_{10}(N_f) = \log_{10}(N_0) + A \cdot \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{e \cdot \mu_{\max}(T, \text{conc})}{A} (\lambda_{(T, \text{conc})} - t) + 1 \right] \right\} \quad (4)$$

Em que:

$t$  é o tempo (h);

$\log_{10}(N_0)$  é o logaritmo da concentração inicial bacteriana no meio de cultura ( $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ );

$\log_{10}(N_f)$  é a concentração máxima alcançada no meio de cultura ( $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ );

$A$  é a assíntota superior que representa a equação:  $[\log_{10}(N_f) - \log_{10}(N_0)]$  ( $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ );

$\lambda(T, \text{conc})$  é a duração da fase lag (h) a uma temperatura  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ), que depende da concentração de carvacrol ( $\text{conc}$ ;  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ );

$\mu_{\max}(T, \text{conc})$  é a taxa máxima específica de crescimento ( $(\log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}))\cdot\text{h}^{-1}$ ) a uma temperatura  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ), que depende da concentração de carvacrol ( $\text{conc}$ ;  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ );

$e$  é o exponencial de 1.

Os modelos secundários para  $\lambda$  e  $\mu_{\max}$  em função da temperatura, da concentração do antimicrobiano e sua interação, foram descritos conforme as Equações 5 e 6:

$$\mu_{max} = p_0 + p_1(\text{conc}) + p_2(T) + p_3(T \times \text{conc}) + p_4 \text{conc}^2 + p_5 T^2 \quad (5)$$

$$\lambda = q_0 + q_1(\text{conc}) + q_2(T) + q_3(T \times \text{conc}) + q_4 \text{conc}^2 + q_5 T^2 \quad (6)$$

Em que *conc* é concentração de carvacrol ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); *T* é temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ );  $p_0, p_1, p_2, p_3, p_4$  e  $p_5$  são os parâmetros estimados de  $\mu_{max}$  (taxa máxima de crescimento); e  $q_0, q_1, q_2, q_3, q_4$  e  $q_5$  são os parâmetros estimados para  $\lambda$  (fase lag).

O coeficiente de correlação ( $R^2$  ajustado) (Equação 7), o fator bias (Equação 8), e o fator exatidão (Equação 9), foram usados como medidas de ajuste do modelo secundário.

$$R^2_{\text{ajustado}} = \left[ 1 - \frac{n-1 \times \left( 1 - \frac{SSQ_{\text{regressão}}}{SSQ_{\text{total}}} \right)}{n-p} \right] \quad (7)$$

$$\text{fator bias} = 10^{\left( \frac{\sum \log \frac{\text{valor observado}}{\text{valor predito}}}{n} \right)} \quad (8)$$

$$\text{fator exatidão} = 10^{\left( \frac{\sum \left| \log \frac{\text{valor observado}}{\text{valor predito}} \right|}{n} \right)} \quad (9)$$

Em ambas as equações 7, 8 e 9  $n$  representa o número de observações;  $p$  o número de parâmetros; e  $SSQ$  é a soma de quadrados.

#### 4.6. Modelo estocástico

Foram implementados dois modelos terciários estocásticos, empregando a linguagem de simulação Extend<sup>TM</sup> versão 4.1.3C.

Na implementação do primeiro, foram considerados como variáveis de entrada,  $t$ ,  $\log_{10}(N_0) = y_0$  e os parâmetros  $A$ ,  $\mu_{max}$  e  $\lambda$  ajustados por meio da equação de Gompertz modificada. Para esses parâmetros empregando o *software* BestFit® (Palisade Corporation, 2002, Nova Iorque, EUA), foram ranqueadas as melhores distribuições de probabilidade, para descrevê-los, segundo os testes de aderências Qui-quadrado, Kolmogorov-Smirnov e Anderson-Darling ao nível de 5 % de significância. A simulação do primeiro modelo ocorreu empregando a técnica de simulação de Monte Carlo, com 10.000 replicações, sendo reportadas como variáveis de saída  $\log_{10}(N_f) = y_f$ ,  $A$ ,  $\mu_{max}$  e  $\lambda$ .

Quanto ao segundo modelo, em que o objetivo foi avaliar a interação entre temperatura e concentração de carvacrol, as variáveis de entrada foram os valores da temperatura ( $T$ ) e concentração de carvacrol ( $conc$ ) e os coeficientes das equações polinomiais dos modelos secundários que descrevem  $\mu_{max}$  e  $\lambda$ , equações 5 e 6, respectivamente. Para inserção dos coeficientes, na implementação do modelo, foram empregadas distribuições normal, que possui como parâmetros a média e o desvio padrão, e além desses parâmetros foram introduzidos os valores mínimo e máximo, conforme definido pelo *software* Statistica 6.0. A exemplo do primeiro modelo empregando a técnica de simulação de Monte Carlo, e conduzindo 10.000 replicações, foram previstas como variáveis previstas de  $\mu_{max}$  e  $\lambda$ .

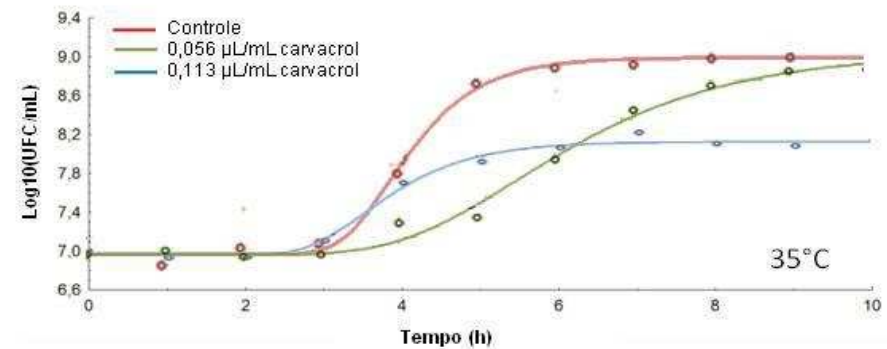
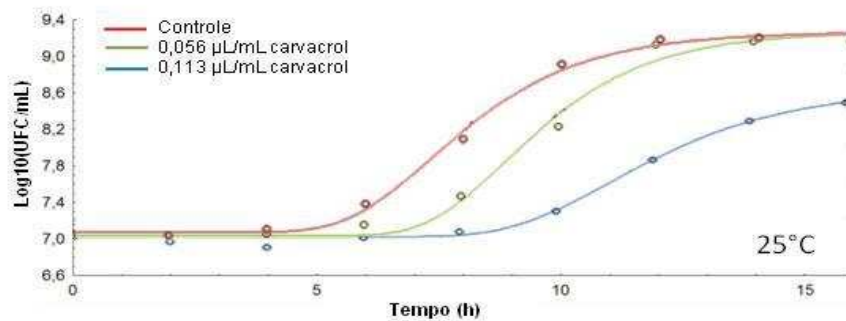
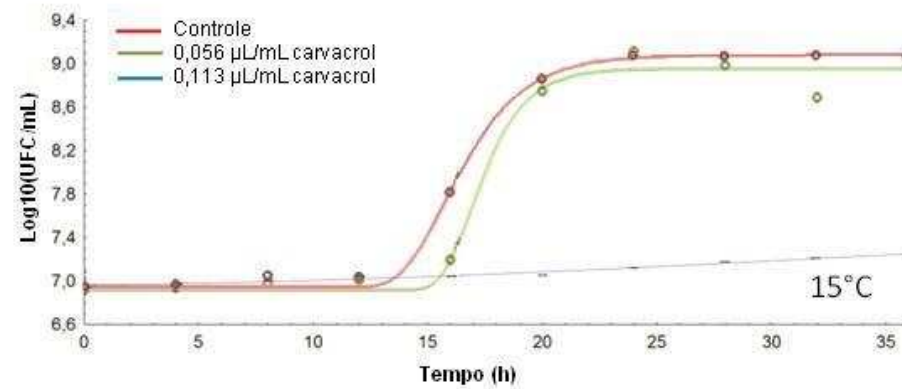
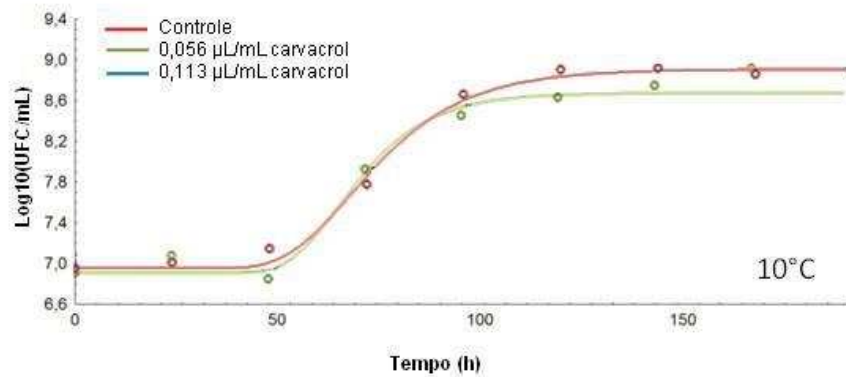
Nas avaliações de níveis de probabilidades para os dois modelos estocásticos foram elaboradas planilhas eletrônicas empregando o programa Microsoft Excel®.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

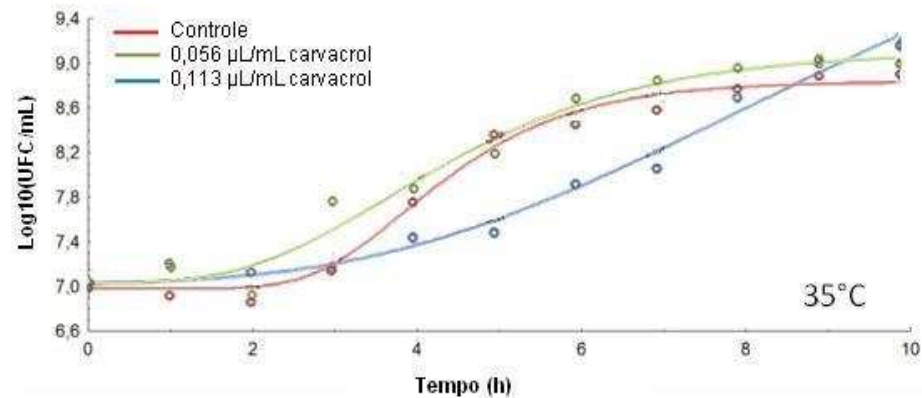
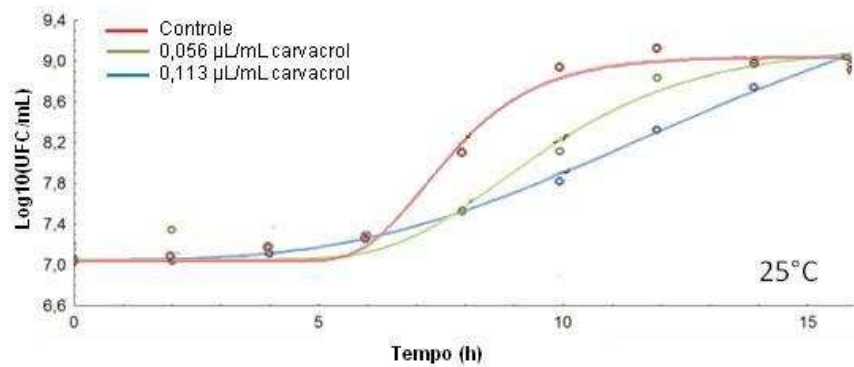
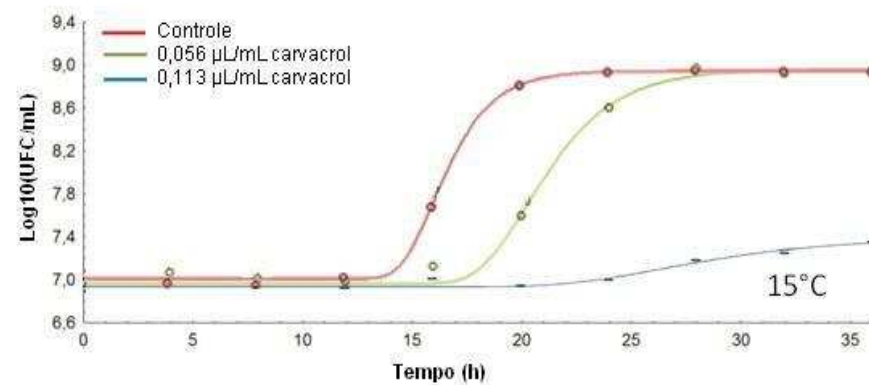
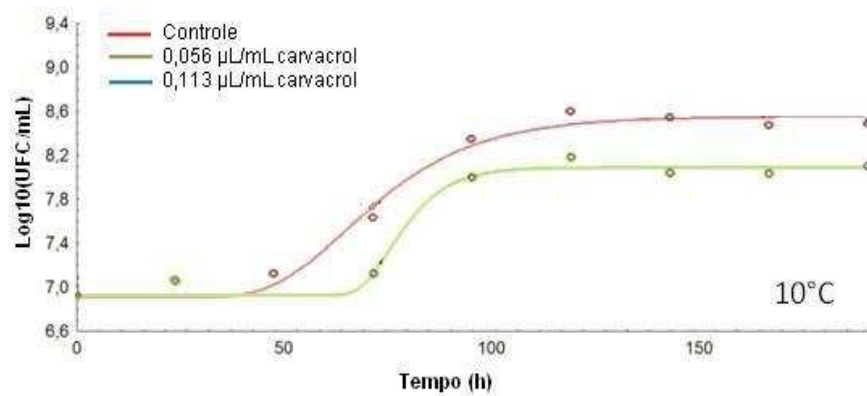
### 5.1. Efeito do carvacrol no comportamento cinético dos sorotipos de *Salmonella*

Nas figuras 2, 3, 4 e 5 são apresentadas as curvas de crescimento ajustadas utilizando a equação de Gompertz modificada, para os quatro sorotipos de *Salmonella* submetidos às concentrações de 0; 0,056 e 0,113  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  de carvacrol sob temperaturas de 10, 15, 25 e 35 °C. O ajuste dessas curvas gerou os dados de taxa máxima de crescimento ( $\mu_{\text{max}}$ ), aumento logarítmico da população ( $A$ ) e duração da fase lag ( $\lambda$ ). Nas situações em que não houve crescimento bacteriano as curvas não foram ajustadas, como na concentração de 0,225  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  de carvacrol para todos os isolados em todas as temperaturas avaliadas e na concentração de 0,113  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  para os isolados de *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Schwarzengrund sob a temperatura de 10 °C (Figuras 2, 3, 4 e 5). Esse longo período de adaptação bacteriana ocorreu em razão da presença do antimicrobiano. Deste modo, a taxa de máxima de crescimento ( $\mu_{\text{max}}$ ), foi considerada igual a zero, e a duração da fase lag ( $\lambda$ ) foi considerada o período máximo de avaliação dos experimentos.

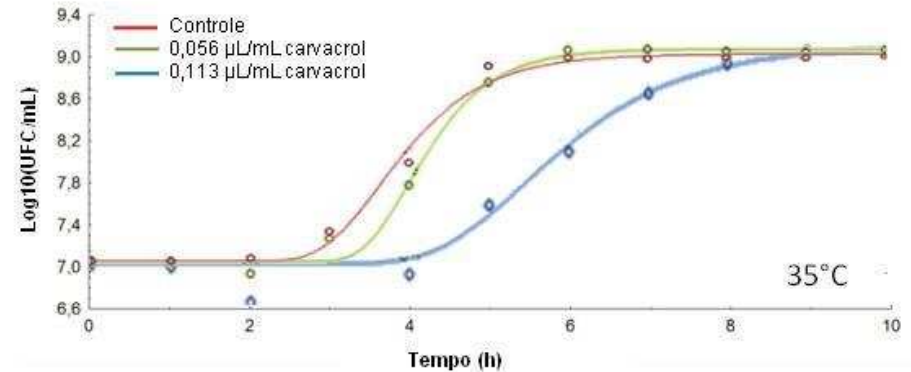
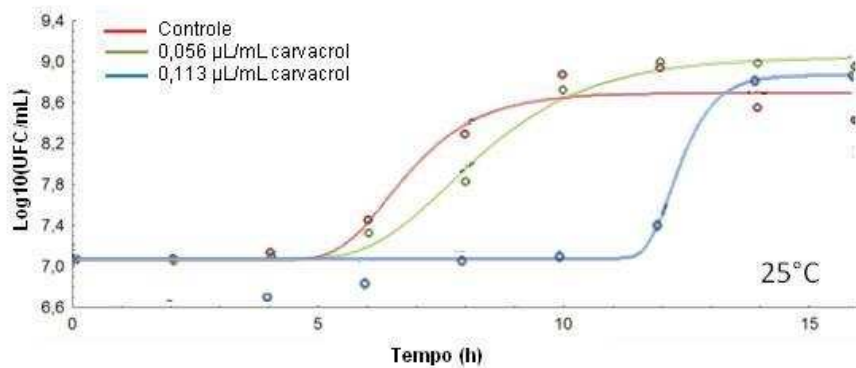
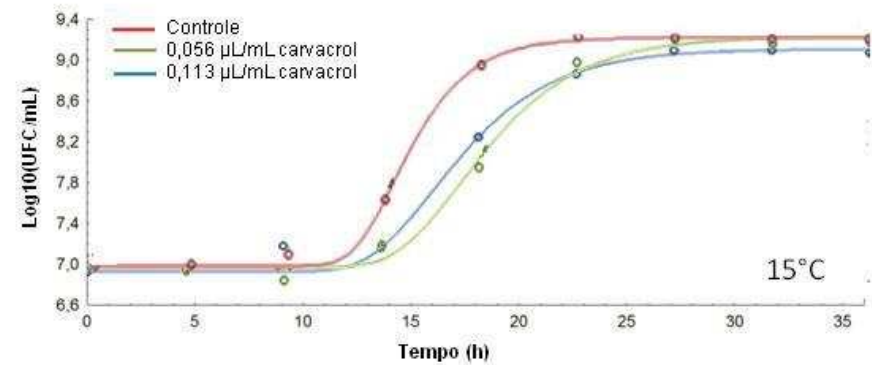
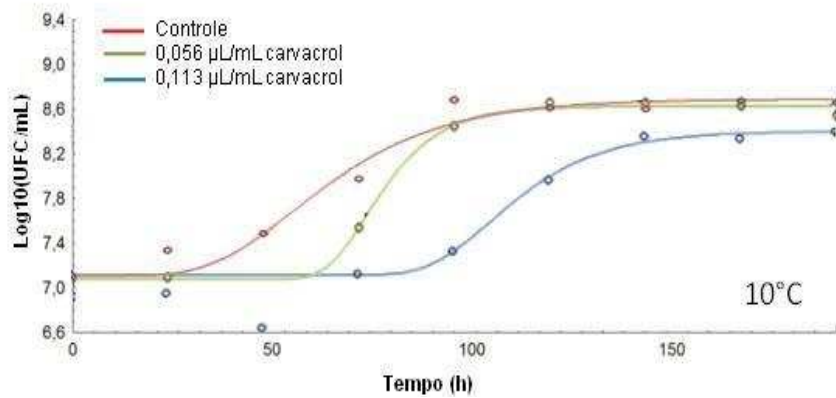
Os ajustes empregando o modelo de Gompertz modificado apresentaram coeficientes de determinação superiores a 0,98. Além disso, a maioria dos pontos situou-se na faixa de precisão de 95%. Dentre as principais vantagens do uso do modelo de Gompertz modificado estão no fato de o mesmo possuir uma base estatística para descrever os dados de crescimento microbiano e sua simplicidade (ZWIETERING et al., 1990). A equação de Gompertz modificada descreveu melhor os dados de crescimento de *Salmonella* em frango sob condições isotérmicas, quando comparada aos modelos logístico e de Baranyi, conforme reportado por Juneja et al. (2007).



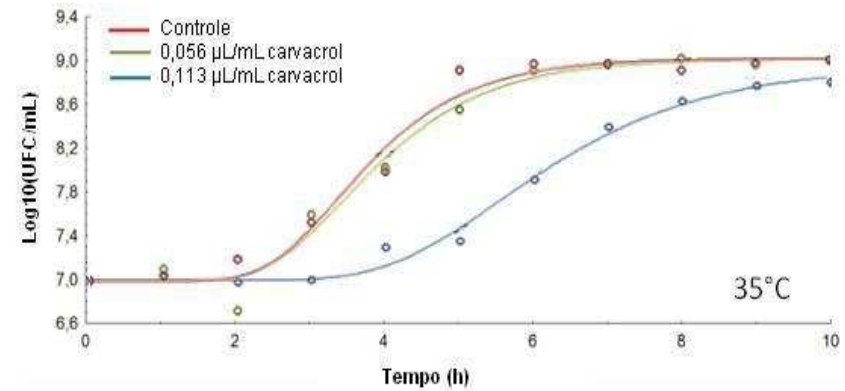
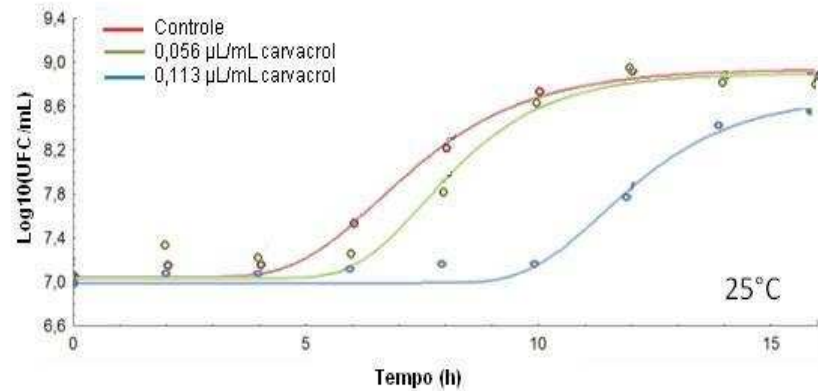
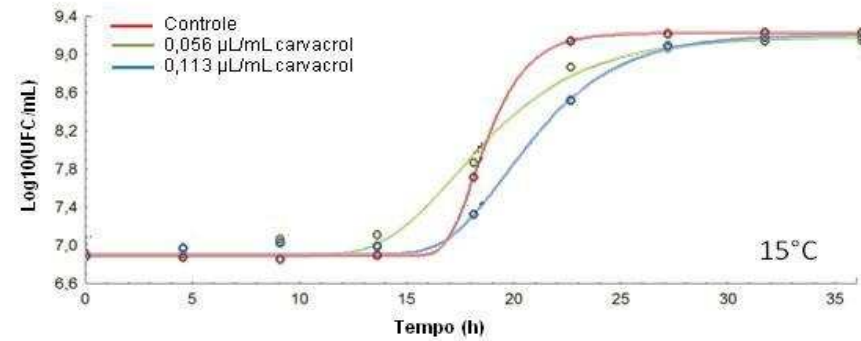
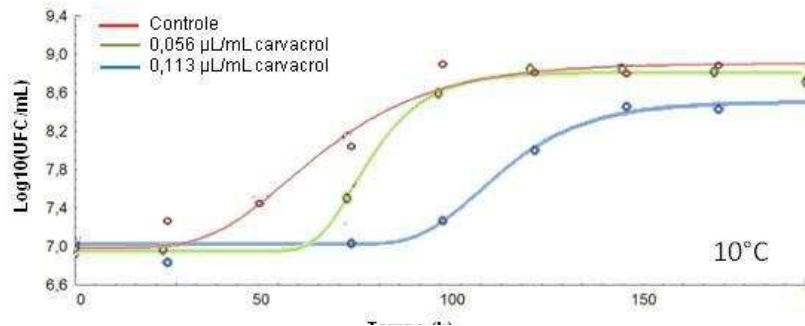
**Figura 2.** Curvas de crescimento de *Salmonella* Heidelberg em concentrações de carvacrol de 0, 0,056 e 0,113  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  com incubação a temperaturas de 10 °C, 15 °C, 25 °C e 35 °C, em função do tempo.



**Figura 3.** Curvas de crescimento de *Salmonella* Schwarzengrund em concentrações de carvacrol de 0, 0,056 e 0,113  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  com incubação a temperaturas de 10 °C, 15 °C, 25 °C e 35 °C, em função do tempo.



**Figura 4.** Curvas de crescimento de *Salmonella* Infantis 1 em concentrações de carvacrol de 0, 0,056 e 0,113  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  com incubação a temperaturas de 10 °C, 15 °C, 25 °C e 35 °C, em função do tempo.



**Figura 5.** Curvas de crescimento de *Salmonella* Infantis 2 em concentrações de carvacrol de 0, 0,056 e 0,113  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  com incubação a temperaturas de 10 °C, 15 °C, 25 °C e 35 °C, em função do tempo.

Os resultados referentes às médias das taxas de crescimento dos sorotipos de *Salmonella* avaliados estão apresentados na Tabela 1

**Tabela 1.** Médias das taxas de crescimento  $\log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$  de sorotipos de *Salmonella* submetidos a diferentes temperaturas e concentrações de carvacrol

Sorotipos de <i>Salmonella</i>	Carvacrol ( $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Temperaturas			
		10 °C	15 °C	25 °C	35 °C
<i>Salmonella</i> Heidelberg	[0]	0,033 bC	0,387 bB	0,423 dB	0,926 dA
	[0,056]	0,025 bC	0,179 dB	0,349 dA	0,368 gA
	[0,113]	0,000 bC	0,039 eC	0,157 eB	0,538 fA
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	[0]	0,062 bD	0,624 aB	0,555 cB	1,068 cA
	[0,056]	0,039 bD	0,219 cC	0,377 dB	0,580 fA
	[0,113]	0,000 bB	0,031 eB	0,209 eA	0,317 gA
<i>Salmonella</i> Infantis 1	[0]	0,228 aD	0,559 aC	1,084 aB	1,657 aA
	[0,056]	0,062 bC	0,362 bB	0,451 cB	0,689 eA
	[0,113]	0,030 bC	0,244 cB	0,487 cA	0,534 fA
<i>Salmonella</i> Infantis 2	[0]	0,167 aD	0,699 aC	0,860 bB	1,287 bA
	[0,056]	0,070 bD	0,332 bC	0,498 cB	0,729 eA
	[0,113]	0,012 bC	0,119 dC	0,385 dB	0,538 fA

Os valores apresentados correspondem à média de oito repetições da taxa de crescimento. Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha não diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Scott-Knott.

Verificou-se que o aumento temperatura favoreceu o aumento da taxa de crescimento para os sorotipos de *Salmonella*, sendo esse comportamento observado tanto na presença quanto na ausência de carvacrol (Tabela 1). Entretanto, em algumas situações não foi observado diferença significativa entre as taxas de crescimento mesmo sob o aumento de temperatura. Este comportamento pode ser observado em *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Schwarzengrund sem a presença de carvacrol nas temperaturas

de 15 e 25 °C. Na concentração de 0,056 µL · mL<sup>-1</sup> esse comportamento também foi observado em *Salmonella* Heidelberg a 25 e 35 °C e em *Salmonella* Infantis 1 a 15 e 25 °C. A concentração de 0,113 µL · mL<sup>-1</sup> de carvacrol não promoveu diferenças no crescimento de *Salmonella* Schwarzengrund nas temperaturas de 10 e 15 °C e a 25 e 35 °C como também em *Salmonella* Infantis 1 a 25 e 35 °C. A variação do comportamento de diferentes de sorotipos de *Salmonella* também foi reportada por Lianou; Koutsoumanis, (2011b) e Díez-García; Capita; Alonso-Calleja, (2012). Esse comportamento pode ter ocorrido em razão do carvacrol ter propriedade de desintegrar a membrana externa de bactérias Gram-negativas liberando os lipopolissacarídeos e assim aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP (LAMBERT et al., 2001).

Os sorotipos de *Salmonella* isolados de carne de suína (*Salmonella* Infantis 1 e 2) se desenvolveram melhor na temperatura de 10 °C quando comparado aos sorotipos isolados de carne de frango (*Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Schwarzengrund).

A taxa de crescimento de *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Schwarzengrund não foi significativamente afetada pelo carvacrol na temperatura de 10 °C. Isso, provavelmente, se deve a capacidade de redução do crescimento desses sorotipos, a baixa temperatura, independente da presença ou ausência de carvacrol. Velugoti et al. (2011a) descreveram que sob baixas temperaturas (menor que 7 °C), *Salmonella* demora até 10 dias para aumentar 1 ciclo log. Além disso, temperaturas de 9,4 e 14,2 °C foram capazes de inibir o crescimento de *Salmonella* em carne de porco na presença da microbiota natural (MOLLER et al., 2013).

Os sorotipos *Salmonella* Infantis 1 e 2, também na temperatura de 10 °C, apresentaram diferença significativa nos parâmetros de crescimento nas concentrações de carvacrol, diferindo apenas do controle (ausência do composto). Nessa situação, o carvacrol apresentou efeito inibidor sobre esses sorotipos. Efeito inibidor de carvacrol sob bactérias também foi verificado em vários estudos (ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002; OLIVEIRA et al., 2015; ENGEL et al., 2017). Além da ação sobre

lipopolissacarídeos da membrana externa de bactérias Gram-negativas a ação antimicrobiana do carvacrol pode também ser decorrente da alteração de diversas enzimas, como as envolvidas com a produção de energia e na síntese de componentes estruturais (LAMBERT et al., 2001).

Os resultados referentes ao tempo de fase lag estão apresentados na Tabela 2. De maneira geral, a fase de adaptação, ou seja, o tempo de fase lag diminuiu com o aumento da temperatura. Entretanto, esse aumento não foi estatisticamente significativo no crescimento dos sorotipos *Salmonella* Schwarzengrund e *Salmonella* Infantis 2, quando expostos nas concentrações de 0,056 e 0,113  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  de carvacrol nas temperaturas de 25 e 35 °C. Comportamento similar foi observado em *Salmonella* Schwarzengrund nas temperaturas de 15 e 25 °C (Tabela 2).

O tempo de fase lag aumentou significativamente com o aumento da concentração de carvacrol, principalmente na temperatura de 10 °C (Tabela 2). Esse comportamento indica que, sob baixa temperatura, na presença de carvacrol, há maior dificuldade do patógeno se adaptar e iniciar a multiplicação celular. Entretanto, esse comportamento não foi observado no sorotipo *Salmonella* Schwarzengrund nas concentrações de 0 e 0,056  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Na temperatura de 35 °C, o aumento da concentração de carvacrol não influenciou no tempo de fase lag dos sorovares avaliados e, em *Salmonella* Infantis 2 este comportamento também foi observado na temperatura de 25 °C (Tabela 2). Considerando que essa é a faixa temperatura ótima de crescimento desse micro-organismo (HAJDENWURCEL, 1998) sugere-se que melhores condições de adaptação ao agente inibidor tenham ocorrido.

**Tabela 2.** Médias dos tempos de fase lag (h) dos sorotipos de *Salmonella* submetidos a diferentes temperaturas e concentrações de carvacrol.

Sorotipos	Carvacrol ( $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Temperatura			
		10 °C	15 °C	25 °C	35 °C
<b><i>Salmonella</i> Heidelberg</b>	[0]	35,269 eA	14,356 bB	6,114 cC	2,755 aD
	[0,056]	41,644 dA	15,939 aB	6,810 bC	3,424 aD
	[0,113]	192,00 aA	17,198 aB	8,175 bC	4,955 aD
<b><i>Salmonella</i> Schwarzengrund</b>	[0]	43,242 dA	8,074 dB	5,737 cC	2,176 aD
	[0,056]	42,184 dA	9,299 dB	4,584 cC	2,904 aC
	[0,113]	192,000 aA	11,435 cB	11,872 aB	3,725 aC
<b><i>Salmonella</i> Infantis 1</b>	[0]	35,494 eA	10,704 cB	5,361 cC	2,766 aD
	[0,056]	45,496 dA	10,459 cB	6,170 cC	3,053 aD
	[0,113]	93,935 bA	14,443bB	11,849 aC	4,161aD
<b><i>Salmonella</i> Infantis 2</b>	[0]	43,883 dA	9,744 dB	4,872 cC	2,451 aD
	[0,056]	62,569 cA	9,593 dB	4,477 cC	3,111 aC
	[0,113]	93,858 bA	13,125 bB	5,545 cC	4,210 aC

Os valores apresentados correspondem à média de oito repetições do tempo de fase lag. Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha não diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Scott-Knott.

## 5.2. Modelagem secundária

Os valores preditos para  $\mu_{max}$  e  $\lambda$  por meio da regressão polinomial estão representadas pelas equações 10 e 11 para *Salmonella* Heidelberg, 12 e 13 para *Salmonella* Schwarzengrund, 14 e 15 para *Salmonella* Infantis 1 e 16 e 17 para *Salmonella* Infantis 2. Os parâmetros de taxa de máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) e o tempo de lag ( $\lambda$ ) são calculados por essas equações, com a vantagem de levar em consideração o impacto das variáveis concentração de carvacrol (*conc*), temperatura (*T*) e sua interação quando houver.

De acordo com a análise de regressão usando o Statistica 6.0, apenas os parâmetros *T* na equação 10 e *conc*, *T*, *conc*×*T* e *T*<sup>2</sup> na equação 11, mostraram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) sobre o crescimento de *Salmonella* Heidelberg. A mesma análise pode ser realizada para as demais equações.

Equações:

$$\mu_{max} = -0,04107 - 3,06182 \times Conc + 0,022817 \times T \quad (10) \quad (R^2 = 0,87)$$

$$\lambda = 131,5183 + 1267,468 \times conc - 12,9016 \times T - 42,2357 \times conc \times T + 0,27751 \times T^2 \quad (11) \quad (R^2 = 0,80)$$

$$\mu_{max} = -0,07784 - 0,58747 \times conc + 0,030066 \times T - 0,16933 \times conc \times T \quad (12) \quad (R^2 = 0,93)$$

$$\lambda = 175,3499 + 312,6515 \times conc - 15,7214 \times T - 35,4915 \times conc \times T + 6732,852 \times conc^2 + 0,326485 \times T^2 \quad (13) \quad (R^2 = 0,82)$$

$$\mu_{max} = -0,1622 - 6,40585 \times conc + 0,050509 \times T - 0,30477 \times T \times conc + 67,67159 \times conc^2 \quad (14) \quad (R^2 = 0,98)$$

$$\lambda = 100,9167 + 474,3176 \times conc - 8,48752 \times T - 15,0754 \times conc \times T + 0,167517 \times T^2 \quad (15) \quad (R^2 = 0,88)$$

$$\mu_{\max} = -0,19046 - 4,59737 \times conc + 0,0558818 \times T - 0,12385 \times T \times conc - 0,00057 \times T^2 \quad (16) \quad (R^2 = 0,98)$$

$$\lambda = 134,2991 + 408,6095 \times conc - 11,2599 \times T - 13,3535 \times T \times conc + 0,220044 \times T^2 \quad (17) \quad (R^2 = 0,90)$$

Em que:

$\mu_{\max}$  é a taxa máxima de crescimento;

$\lambda$  é o tempo de lag;

$conc$  é a concentração de carvacrol e

$T$  é a temperatura.

Observou-se que os modelos gerados, apresentam coeficientes de determinação das equações ajustadas podem explicar mais que 80 % da variabilidade dos dados. Os modelos polinomiais são amplamente utilizados na literatura, uma vez que possibilitam descrever de forma satisfatória os dados de reposta microbiana em função da interação de fatores como o pH e a temperatura (OSCAR, 2005; LEE et al., 2014; KOSEGARTEN et al., 2017).

Na Tabela 4 estão apresentados os índices estatísticos para avaliação das equações ajustadas. Analisando o fator bias calculado para os parâmetros de taxa de crescimento e tempo de fase lag, observa-se que para os sorotipos *Salmonella* Schwarzengrund, *Salmonella* Infantis 1 e 2 apresentaram valores de bias das taxa de crescimento foram respectivamente, de 0,87 a 0,91 e de 0,72 a 0,88, o que indica que o modelo falha para o lado seguro “fail-safe” (JEYAMKONDAN; JAYAS; HOLLEY, 2001). Entretanto, o fator bias obtido com os dados do crescimento de *Salmonella* Heidelberg foi de 1,08, ou seja, o modelo prediz taxas em até 8% em média na região insegura e 92% na região segura de predição. Esse pode ser considerado um bom índice, uma vez que na literatura, há relatos de modelos com valores do fator bias de 1,82 (MCELROY; JAYKUS; FOEGEDING, 2000), situação que apresenta 82% na região insegura de

predição, o que pode ocorrer devido a grande variabilidade dos dados de resposta microbiana.

Os valores do fator exatidão da taxa de crescimento variaram de 1,31 a 1,43 e do tempo de fase lag de 1,20 a 2,68 (Tabela 4). O fator exatidão representa a variação dos valores preditos em torno da média e pode se notar que a variação da taxa de crescimento foi de 31 a 43%. Entretanto, o fator exatidão do tempo de fase lag chegou ao valor 2,68, mas há relatos na literatura de fator de exatidão de 3,48 (TE GIFFEL; ZWIETERING, 1999). Como esse índice foi estabelecido para avaliar modelos com apenas um parâmetro, esse fator pode ser aumentado de 10 a 15% para cada variável no modelo quando este apresenta mais parâmetros como pH,  $A_w$  e NaCl (ROSS, 2000).

**Tabela 3.** Valores dos índices estatísticos (bias e exatidão) calculados para os modelos secundários de taxa de crescimento e tempo de fase lag

Sorotipos	$\mu_{max}$		$\lambda$	
	(log10(UFC·mL <sup>-1</sup> )·h <sup>-1</sup> )		(h)	
	Fbias	Fexat	Fbias	Fexat
<i>Salmonella</i> Heidelberg	1,08	1,43	0,88	1,20
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	0,91	1,34	0,85	2,68
<i>Salmonella</i> Infantis 1	0,89	1,42	0,83	1,60
<i>Salmonella</i> Infantis 2	0,87	1,31	0,72	1,55

Fbias: Fator Bias; Fexat: Fator de exatidão

### 5.3. Modelagem estocástica

#### 5.3.1. Modelo estocástico I

O modelo I foi construído com os parâmetros ajustado pela equação de Gompertz modificada, como a taxa máxima de crescimento, o tempo de fase lag, aumento logarítmico da população e considerando um número inicial de células de 10<sup>6</sup> UFC·mL<sup>-1</sup>. As previsões realizadas por esse modelo são apresentadas nas Tabelas 7 e 8, em que foram exibidos o tempo de

avaliação do experimento para cada condição testada, sendo que os resultados foram expressos ao nível de 95% de probabilidade acumulada.

As distribuições de probabilidade ajustadas que descrevem os parâmetros de  $A$ ,  $\mu_{max}$  e  $\lambda$  são apresentados nas Tabelas 5 e 6, para os sorotipos isolados de carne de frango e os isolados de carne suína, respectivamente. A escolha das distribuições foi realizada segundo os testes de aderência de Qui-quadrado, Kolmogorov-Smirnov e Anderson-Darling, utilizando o software BestFit®.

Na Tabela 7 são apresentados os resultados dos dados simulados do comportamento dos sorotipos de *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Schwarzengrund. Quando empregada uma concentração de carvacrol de  $0,113 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ , a temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , há uma probabilidade de 95% de que a taxa máxima de crescimento de *Salmonella* Schwarzengrund possa chegar até  $0,226 \log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$  e tempo de fase lag possa chegar até 11,93 h. Caso seja mantida a mesma concentração do agente antimicrobiano na temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , haverá uma probabilidade de 95% de que os valores máximos de taxa máxima de crescimento seja de  $0,499 \log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$  e o tempo de fase lag de 3,91 h.

Os dados simulados para o sorotipo de *Salmonella* Heidelberg sob a temperatura de  $35^\circ\text{C}$  mostraram que o número final ( $N_f$ ) desse sorotipo pode chegar até  $8,62 \log(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})$  sem a presença de carvacrol, sendo que nessa mesma condição foi previsto o menor tempo de fase lag. O maior valor do aumento logarítmico da população ( $A$ ) foi previsto na concentração de  $0,056 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  sob a temperatura de  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ . A maior taxa de crescimento a prevista foi de  $1,643 \log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$  na concentração de  $0,113 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  na temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo que nessa mesma temperatura foi previsto o maior tempo de fase lag 5,21 h (Tabela 7).

Os dados apresentados na tabela 8 são referentes aos resultados obtido na avaliação de *Salmonella* sorotipo Infantis 1 e 2. As previsões para *Salmonella* Infantis 1 sem a presença de carvacrol e sob a temperatura de  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  prevê taxa máxima de crescimento de até  $0,662 \log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$  e tempo de fase lag de até 10,9 h para *Salmonella* Infantis 1.

*Salmonella* Infantis 2 sob a temperatura de 35 °C sem a presença de carvacrol apresentou maior taxa de crescimento  $2,220 \log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$  prevista e o menor tempo de fase lag quando comparado os demais sorotipos avaliados (Tabelas 7 e 8).

Dessa forma, a simulação de Monte Carlo pode ser utilizada para prever os valores máximos do número final de micro-organismos, aumento logarítmico da população, taxa de crescimento e tempo de fase lag para os quatro sorotipos avaliados após o tratamento com o carvacrol sob as diferentes temperaturas.

A vantagem dessa análise estocástica dos dados, é que fornece estimativas dos parâmetros com base na variação da distribuição ao longo do tempo, já os modelos determinísticos expressam apenas uma estimativa pontual dos dados (POSCHET, 2003).

### **5.3.2. Simulação de Monte Carlo para estimativa do efeito de carvacrol em *Salmonella* spp. (Modelo II)**

A metodologia de superfície de resposta foi empregada para ajustar uma equação de regressão para cada sorotipo estudado. Essa equação foi ajustada com os parâmetros de taxa de crescimento e tempo de fase lag previamente ajustados pelo modelo de Gompertz modificado. Assim, os coeficientes gerados pela equação de regressão tanto para  $\mu_{max}$  quanto para  $\lambda$ , foram empregados na simulação de Monte Carlo, utilizando uma distribuição normal e os limites de confiança superior e inferior. Desse modo, foram simulados os parâmetros de taxa de crescimento e tempo de fase lag levando em consideração a interação entre a concentração de carvacrol e a temperatura.

Os resultados obtidos pelo modelo II estão apresentados na tabela 9. Analisando os dados apresentados pelo isolado *Salmonella* Heidelberg submetido a concentração de  $0,056 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  de carvacrol na temperatura de 10 °C, a faixa de probabilidade acumulada de 75 a 95%, indica que há probabilidade de 20% de que valores de taxa máxima de crescimento se

encontre entre 0,055 e 0,155  $\log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$ . De modo semelhante, a mesma análise pode ser feita para esse micro-organismo nas mesmas condições, nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C em que os intervalos de taxa de crescimento serão de 0,174 a 0,278; 0,413 a 549 e 0,515 a 0,683  $\log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$ , respectivamente.

Os dados apresentados na tabela 9 informam ainda que há uma probabilidade de 25% de que a taxa máxima de crescimento de *Salmonella* Infantis 1 seja superior a 0,447  $\log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$  a uma concentração de 0,113  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  de carvacrol sob temperatura de 15 °C.

**Tabela 4.** Parâmetros de distribuições de probabilidade no modelo terciário I dos sorotipos isolados de carne de frango.

Sorotipos	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Carvacrol ( $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	A $\log(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})$	$\mu_{\text{max}}$ $(\log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1})$	$\lambda$ (h)
<b>Salmonella Heidelberg</b>	10	192	0	Triang(0,85;0,97;1,03)	Normal(0,02;0,007)	Normal(36,24;2,77)
			0,056	Normal(1,55;0,10)	Lognorm(0,02;0,003)	Normal(44,27;5,97)
			0,113	*	*	*
	15	36	0	Weibull(9,06;2,01)	Normal(0,20;0,08)	Normal(13,02;1,32)
			0,056	Normal(1,71;0,44)	Beta(0,36;1,75)	Lognorm(16,57;1,07)
			0,113	Lognorm(0,96;0,38)	Normal(0,05;0,02)	Triang(12,53;7,58;20,1)
	25	16	0	Weibull(10,42;2,17)	Normal(0,54;0,08)	Gamma(0,02;0,02)
			0,056	Beta(0,96;0,78;1,38;1,02)	Normal(0,42;0,18)	Normal(8,56;1,26)
			0,113	Beta(0,59;0,59;1,13; 0,87)	Normal(0,23;0,08)	Lognorm(9,36;2,26)
	35	10	0	Normal(1,65;0,44)	Normal(0,80;0,27)	Beta(0,93;2,38; 2,63)
			0,056	Beta(0,35;0,34;1,29; 1,13)	Erlang(3,00;0,25)	Lognorm(2,94;0,52)
			0,113	Normal(1,99;5,31e-2)	Gamma(7,37;0,12)	Lognorm(3,43;0,65)
<b>Salmonella Schwarzengrund</b>	10	192	0	Normal(1,62;0,14)	Normal(0,05;0,019)	Normal(45,94;3,79)
			0,056	Beta(0,28;2,41; 1,71)	Uniform(0,004;0,08)	Lognorm(66,95;56,82)
			0,113	*	*	*
	15	36	0	Beta(1,73;21,38; 2,18)	Uniform(0,20;0,23)	Triang(7,28;8,10;8,53)
			0,056	Normal(2,15;0,07)	Beta(0,83;10,81; 0,19)	Normal(9,23;0,17)
			0,113	Normal(2,49;0,26)	Normal(0,07;0,04)	Triang(9,91;10,70;13,76)
	25	16	0	Normal(2,16;0,09)	Beta(1,46;15,93; 0,40)	Normal(5,78;0,16)
			0,056	Normal(2,10;0,12)	Normal(0,38;0,01)	Normal(6,68;0,17)
			0,113	Beta(1,03;2,91;2,02)	Beta(0,31;9,95; 0,20)	Normal(11,86;0,03)
	35	10	0	Beta(5,08;12,00; 1,73)	Normal(0,92;0,15)	Normal(2,53;0,45)
			0,056	Beta(0,85;5,35; 2,06)	Beta(0,61;0,83; 0,38)	Triang(1,11;2,59;3,23)
			0,113	PearsonV(63,25;0,01)	Normal(0,37; 0,06)	Beta(1,44;1,04;3,26; 1,2)

**Tabela 5.** Parâmetros de distribuições de probabilidade no modelo terciário I dos sorotipos isolados de carne de suína.

Sorotipos	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Carvacrol ( $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	A $\log\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\mu_{\text{max}}$ ( $\log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$ )	$\lambda$ (h)
<b>Salmonella Infantis 1</b>	10	192	0	Normal(2,06;0,04,90)	Triang(0,02;0,03;0,07)	Beta(6,51;17,31;0,01)
			0,056	Normal(1,65;0,30)	Normal(0,05;0,02)	Normal(43,00;2,72)
			0,113	Normal(1,41;0,36)	Beta(0,69;16,31;0,01)	Normal(11,16;2,76)
	15	36	0	Normal(1,91;0,15)	Normal(0,53;0,06)	Normal(10,73;0,07)
			0,056	Normal(1,99;0,08)	Normal(0,43;0,06)	Triang(14,07;14,61;16,02)
			0,113	Normal(1,93;0,13)	Normal(0,17;0,09)	Beta(0,23;0,31;3,38; 11,48)
	25	16	0	Normal(2,10;0,08)	Normal(0,78;0,28)	Normal(5,37;0,08)
			0,056	Normal(2,06;0,03)	Normal(0,46;0,02)	Beta(0,31;0,43; 1,28; 5,13)
			0,113	Normal(1,87;0,13)	Beta(0,82;3,96; 0,40)	Normal(11,82;0,08)
	35	10	0	Normal(2,05;0,03)	Normal(1,33;0,36)	Normal(2,49;0,51)
			0,056	Beta(4,37;36,47;1,94)	Beta(0,57;0,67;0,49)	Beta(1,17;0,82; 2,04)
			0,113	Normal(1,93;0,08)	Weibull(4,91;0,59)	Normal(3,83;0,55)
<b>Salmonella Infantis 2</b>	10	192	0	Normal(2,06;0,04)	Normal(0,03;0,03)	Beta(0,48;0,34; 40,32; 12,03)
			0,056	Normal(1,70;0,27)	Normal(0,05;0,01)	Beta(9,08;8,24; 9,81; 56,95)
			0,113	Normal(1,45;0,31)	Normal(0,01;0,01)	Normal(90,49;6,88)
	15	36	0	Normal(2,20;0,06)	Normal(0,42;0,02)	Beta(0,36;2,04; 9,68)
			0,056	Normal(2,21;0,05)	Lognorm(3,47e-2;0,02)	Normal(9,23;0,82)
			0,113	Beta(1,18;7,17; 1,63)	Normal(0,19;0,09)	Beta(0,62;0,46; 11,59)
	25	16	0	Normal(2,15;0,09)	Normal(0,84;0,05)	Normal(5,28;0,40)
			0,056	Normal(2,19;0,05)	Normal(0,60;0,12)	Beta(0,53;0,50;3,15; 3,96)
			0,113	Normal(2,22;0,15)	Normal(0,42;0,11)	Normal(5,31;0,28)
	35	10	0	Normal(2,19;0,02)	Normal(1,26;0,43)	Beta(0,96;2,84; 2,36)
			0,056	Beta(0,88;28,37;2,09)	Beta(1,17;6,80; 0,64)	Normal(2,82;0,34)
			0,113	Normal(1,93;0,07)	Lognorm(0,60;0,11)	Beta(0,27;0,41; 2,37; 2,71)

**Tabela 6.** Valores máximos de taxa de crescimento ( $\log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$ ), tempo de fase lag (h) e aumento do logarítmico da população ( $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) os sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de frango ao nível de probabilidade acumulada de 95%

Isolados	Temperatura (°C)	Carvacrol ( $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Tempo (h)	Nf	A	$\mu_{\text{max}}$	$\lambda$ (h)
				$\log(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})$	$\log(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})$	$(\log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1})$	
<b><i>Salmonella</i> Heidelberg</b>	10	0	192	7,02	1,019	0,029	42,89
		0,056	192	7,77	1,769	0,062	58,24
		0,113	192	*	*	*	*
	15	0	36	8,34	2,390	0,380	16,12
		0,056	36	8,58	2,727	0,524	19,24
		0,113	36	7,58	2,164	0,119	19,79
	25	0	16	8,49	2,502	0,738	5,87
		0,056	16	8,21	2,247	0,808	11,44
		0,113	16	7,77	1,889	0,412	15,77
	35	0	10	8,62	2,678	1,431	3,18
		0,056	10	8,39	2,410	0,959	4,33
		0,113	10	8,08	2,097	1,643	5,21
<b><i>Salmonella</i> Schwarzengrund</b>	10	0	192	7,93	1,933	0,060	55,05
		0,056	192	7,92	1,943	0,079	190,79
		0,113	192	*	*	*	*
	15	0	36	8,22	2,220	0,220	8,45
		0,056	36	8,31	2,314	0,244	9,61
		0,113	36	8,71	3,115	0,173	13,41
	25	0	16	8,32	2,378	0,480	6,13
		0,056	16	8,26	2,368	0,403	7,07
		0,113	16	6,94	2,504	0,226	11,93
	35	0	10	8,03	2,032	1,239	3,55
		0,056	10	8,24	2,260	1,214	3,10
		0,113	10	8,41	2,612	0,499	3,91

\* Não houve crescimento bacteriano.

**Tabela 7.** Valores máximos da taxa de crescimento ( $\log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$ ), tempo de fase lag (h) e aumento do logarítmico da população ( $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) apresentados pelos sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de frango para o nível de probabilidade acumulada de 95%

Isolados	Temperatura (°C)	Carvacrol ( $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Tempo (h)	Nf $\log(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})$	A $\log(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})$	$\mu_{\text{max}}$ ( $\log_{10}(\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$ )	$\lambda$ (h)
<b><i>Salmonella</i> Infantis 1</b>	10	0	192	6,08	2,151	0,029	30,03
		0,056	192	6,03	2,325	0,105	49,36
		0,113	192	6,17	2,196	0,037	17,44
	15	0	36	6,04	2,253	0,662	10,90
		0,056	36	6,00	2,170	0,560	15,84
		0,113	36	6,12	2,215	0,371	14,85
	25	0	16	8,23	2,275	1,411	5,55
		0,056	16	7,86	2,119	0,529	6,39
		0,113	16	6,00	2,158	0,687	12,00
	35	0	10	8,13	2,128	2,173	3,65
		0,056	10	8,02	2,021	1,388	2,96
		0,113	10	8,06	2,112	0,887	5,10
<b><i>Salmonella</i> Infantis 2</b>	10	0	192	6,10	2,151	0,029	51,52
		0,056	192	6,00	2,310	0,092	62,58
		0,113	192	6,09	2,180	0,047	106,30
	15	0	36	6,23	2,339	0,456	10,02
		0,056	36	6,22	2,318	0,102	11,10
		0,113	36	6,10	1,846	0,396	12,49
	25	0	16	8,29	2,344	0,958	6,17
		0,056	16	8,22	2,317	0,847	6,99
		0,113	16	8,15	2,534	0,655	5,98
	35	0	10	8,24	2,237	2,220	2,78
		0,056	10	8,09	2,093	0,826	3,59
		0,113	10	8,09	2,096	1,389	5,07

Em algumas situações, o modelo II superestima a taxa máxima de crescimento mesmo com a adição do antimicrobiano e isso pode ter ocorrido em razão das limitações do modelo de superfície de resposta, empregado para construção do modelo II. Neste modelo, como mostrado nas análises realizadas previamente, os índices estatísticos indicam que o modelo de superfície de resposta falhou para o lado seguro.

Considerando a faixa dos limites de temperatura de 10 e 35 °C e as concentrações de 0 a 0,113  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  de carvacrol, o modelo pode ser usado para previsões da taxa de crescimento o tempo de fase lag empregando a interpretação de probabilidade acumulada.

O modelo II apresentou previsões de tempo de fase lag maiores do que os avaliados experimentalmente, portanto os dados não foram apresentados. Essas previsões podem ter ocorrido porque os microorganismos, em condições de estresse, apresentam maior variabilidade no comportamento, o que pode justificar a superestimação dos valores previstos (MUÑOZ et al., 2010).

**Tabela 8.** Níveis de probabilidade acumulada dos valores de taxa de crescimento em  $\log_{10}$  (UFC·mL<sup>-1</sup>)·h<sup>-1</sup> dos sorotipos de *Salmonella* sob diferentes concentrações de carvacrol e temperatura.

Isolados	Níveis de probabilidade acumulada	Temperaturas											
		10 °C (192 h)			15 °C (30h)			25 °C (16h)			35 °C (10h)		
		Carvacrol (µL·mL <sup>-1</sup> )			Carvacrol (µL·mL <sup>-1</sup> )			Carvacrol (µL·mL <sup>-1</sup> )			Carvacrol (µL·mL <sup>-1</sup> )		
		0	0,056	0,113	0	0,056	0,113	0	0,056	0,113	0	0,056	0,113
<b><i>Salmonella</i> Heidelberg</b>	95%	0,286	0,155	0,044	0,408	0,278	0,165	0,667	0,549	0,422	0,943	0,683	0,155
	75%	0,196	0,055	0,000	0,315	0,174	0,035	0,555	0,413	0,276	0,797	0,515	0,055
	50%	0,155	0,031	0,001	0,270	0,126	0,023	0,500	0,357	0,212	0,730	0,441	0,031
	25%	0,115	0,000	0,000	0,225	0,078	0,000	0,447	0,301	0,147	0,663	0,366	0,000
<b><i>Salmonella</i> Schwarzengrund</b>	95%	0,356	0,306	0,307	0,537	0,435	0,416	0,890	0,724	0,630	1,263	0,869	0,306
	75%	0,250	0,150	0,071	0,414	0,271	0,146	0,747	0,513	0,299	1,078	0,471	0,150
	50%	0,202	0,093	0,045	0,361	0,197	0,083	0,679	0,422	0,186	0,995	0,310	0,093
	25%	0,152	0,013	0,000	0,306	0,122	0,000	0,612	0,331	0,017	0,914	0,118	0,013
<b><i>Salmonella</i> Infantis 1</b>	95%	0,447	0,442	0,493	0,717	0,632	0,590	1,283	1,030	0,858	1,859	1,116	0,442
	75%	0,306	0,250	0,216	0,561	0,420	0,297	1,089	0,771	0,472	1,622	0,652	0,250
	50%	0,237	0,169	0,126	0,489	0,329	0,184	0,999	0,659	0,318	1,508	0,458	0,169
	25%	0,167	0,079	0,000	0,417	0,238	0,028	0,909	0,547	0,141	1,394	0,247	0,079
<b><i>Salmonella</i> Infantis 2</b>	95%	0,478	0,344	0,572	0,678	0,507	0,696	1,094	0,824	0,926	1,509	1,191	0,344
	75%	0,377	0,166	0,207	0,569	0,310	0,316	0,955	0,607	0,519	1,340	0,726	0,166
	50%	0,328	0,101	0,117	0,516	0,229	0,189	0,891	0,512	0,352	1,262	0,529	0,101
	25%	0,279	0,003	0,000	0,464	0,145	0,000	0,827	0,414	0,163	1,184	0,329	0,003

Os experimentos foram avaliados até 192 h na temperatura de 10 °C, 36 h na 15 °C, 16 h na 25 °C e 10 h na 35 °C.

## 6. CONCLUSÃO

A cinética de multiplicação mostrou que os sorotipos isolados de carne suína se desenvolveram melhor sob a temperatura de 10 °C quando comparado aos isolados de carne de frango. Observou-se que houve sinergismo entre o carvacrol e a temperatura de 15 °C, uma vez que, nessa temperatura o aumento da concentração de carvacrol foi proporcional a diminuição da taxa de crescimento. Os modelos secundários ajustados apresentaram valores do fator bias menores que um, o que indica que esses modelos falham para o lado seguro. Os dois modelos estocásticos implementados mostraram que os sorotipos isolados de carne suína apresentaram os maiores valores previstos de taxa de crescimento e menores tempo de fase de adaptação quando comparado aos isolados de carne de frango, esse comportamento foi devido as características intrínsecas desses sorotipos que apresentaram maior resistência nas condições testadas.

## 7. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. et al. International spread of multidrug-resistant *Salmonella* Schwarzengrund in food products. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 5, p. 726–31, 2007.

AHMAD, I.; MEHMOOD, Z.; MOHAMMAD, F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 2, p. 183–193, 1998.

AKIYAMA, T.; KHAN, A. A. Molecular characterization of strains of fluoroquinolone-resistant *Salmonella* enterica serovar Schwarzengrund carrying multidrug resistance isolated from imported foods. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 1, p. 101–110, 2012.

ALGHOONEH, A. et al. Application of intelligent modeling to predict the population dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* in Frankfurter sausage containing *Satureja bachtiarica* extracts. **Microbial Pathogenesis**, v. 85, p. 58–65, 2015.

ARIGESAVAN, K.; SUDHANDIRAN, G. Carvacrol exhibits anti-oxidant and anti-inflammatory effects against 1, 2-dimethyl hydrazine plus dextran sodium sulfate induced inflammation associated carcinogenicity in the colon of Fischer 344 rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 461, p. 314–320, 2015.

ASAI, T. et al. Relationships between multidrug-resistant *Salmonella enterica* Serovar Schwarzengrund and both broiler chickens and retail chicken meats in Japan. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 62, n. 3, p. 198–200, 2009.

BANGTRAKULNONT, A. et al. *Salmonella* serovars from humans and other sources in Thailand, 1993-2002. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 131–6, 2004.

BARANAUSKAITĖ, J. et al. Optimization of carvacrol, rosmarinic, oleanolic and ursolic acid extraction from oregano herbs (*Origanum onites* L., *Origanum vulgare* spp. *hirtum* and *Origanum vulgare* L.). **Natural Product Research**, v. 30, n. 6, p. 672–674, 2016.

BARANYI, J. Stochastic modelling of bacterial lag phase. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 203–206, 2002.

BEGOT, C.; DESNIER, I.; DAUDIN, J. D. ET AL. Methods Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, v. 25, p. 225–232, 1996.

BELDA-GALBIS, C. M. et al. Impact assessment of carvacrol and citral effect on *Escherichia coli* K12 and *Listeria innocua* growth. **Food Control**, v. 33, n. 2, p. 536–544, 2013.

BEN ARFA, A. et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 149–154, 2006.

BEUCHAT, L. R. et al. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. **Journal of food protection**, v. 61, n. 10, p. 1305–11, 1998.

BUCHANAN, R. L. Developing and distributing user-friendly application software. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 12, n. 3–5, p. 251–255, 1993.

BURT, C. R. et al. Fatal myocarditis secondary to *Salmonella* septicemia in a young adult. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 8, n. 3, p. 295–297, 1990.

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

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections associated with multiple raw

produce items--United States, 2008. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 57, n. 34, p. 929–34, 2008.

CHAVAN, P. S.; TUPE, S. G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. **Food Control**, v. 46, p. 115–120, 2014.

CHEMALY, M. et al. Isolation of *Salmonella enterica* in laying-hen flocks and assessment of eggshell contamination in France. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 10, p. 2071–2077, 2009.

CHEN, M. H. et al. Contamination of *Salmonella* Schwarzengrund cells in chicken meat from traditional marketplaces in Taiwan and comparison of their antibiograms with those of the human isolates. **Poultry Science**, v. 89, n. 2, p. 359–365, 2010.

CHIRONNA, M. et al. Outbreak of *Salmonella infantis* gastroenteritis among people who had eaten at a hash house in southern Italy. **Public Health**, v. 128, n. 5, p. 438–443, 2014.

CHITTICK, P. et al. A summary of national reports of foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 5, p. 1150–1153, 2006.

COLEMAN, M. E. et al. Influence of agitation, inoculum density, pH, and strain on the growth parameters of *Escherichia coli* O157:H7—relevance to risk assessment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 147–160, 2003.

COPUR, H. et al. Predicting performance of EPB TBMs by using a stochastic model implemented into a deterministic model. **Tunnelling and Underground Space Technology**, v. 42, p. 1–14, 2014.

COUVERT, O. et al. Validation of a stochastic modelling approach for *Listeria monocytogenes* growth in refrigerated foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 2, p. 236–242, 2010.

DALGAARD, P. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. **International Journal of Food Microbiology Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 305–317, 1995.

DE OLIVEIRA, K. Á. R. et al. Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineole. **Food Control**, v. 47, p. 334–339, 2015.

DE OLIVEIRA, T. L. C.; SOARES, R. DE A.; PICCOLI, R. H. A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 93, n. 3, p. 645–651, 2013.

DE VINCENZI, M. et al. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, p. 801–804, 2004.

DICKSON, J. S. Control of *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* 0157:H7 on beef in a model spray chilling system. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 1, p. 191–193, 1991.

DÍEZ-GARCÍA, M.; CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. **Food Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 173–180, 2012.

EINSTEIN, H. H. Risk and risk analysis in rock engineering. **Tunnelling and Underground Space Technology**, v. 11, n. 2, p. 141–155, 1996.

ENGEL, J. B. et al. Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 252, p. 18–23, 2017.

ESAKI, H. et al. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): report from the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring program. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 266–270, 2004.

FARDSANEI, F. et al. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from food and human samples by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profiling, (GTG)<sub>5</sub>-PCR and ERIC-PCR. **New Microbes and New Infections**, v. 14, p. 24–30, 2016.

FEHLHABER, K.; KRÜGER, G. The study of *Salmonella* Enteritidis growth kinetics using rapid automated bacterial impedance technique. **Journal of applied microbiology**, v. 84, n. 6, p. 945–9, 1998.

FERRER, J. et al. Mathematical modelling methodologies in predictive food microbiology: A SWOT analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 1, p. 2–8, 2009.

FLORES, Z. et al. Physicochemical characterization of chitosan-based coating-forming emulsions: Effect of homogenization method and carvacrol content. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 851–857, 2016.

GEERAERD, A. H. et al. Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 229–244, 2004.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 2, p. 170–174, 2006.

GOMES, C.; MOREIRA, R. G.; CASTELL-PEREZ, E. Radiosensitization of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. in ready-to-eat baby spinach leaves. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. E141–E148, 2011.

GONZALEZ-SANZ, R. et al. Emergence of extended-spectrum beta-lactamases and AmpC-type beta-lactamases in human *Salmonella* isolated in Spain from 2001 to 2005. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1181–1186, 2009.

GUILLIER, L. Predictive microbiology models and operational readiness.

**Procedia Food Science**, v. 7, n. 0, p. 133–136, 2016.

GURAN, H. S.; MANN, D.; ALALI, W. Q. *Salmonella* prevalence associated with chicken parts with and without skin from retail establishments in Atlanta metropolitan area, Georgia. **Food Control**, v. 73, p. 462–467, 2017.

HAJDENWURCEL, J. R. **Atlas de microbiologia de alimentos**. 1. ed. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 1998.

HUANG, L. IPMP 2013 — A comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 100–107, 2014.

JAQUETTE, C. B.; BEUCHAT, L. R.; MAHON, B. E. Efficacy of chlorine and heat treatment in killing *Salmonella* stanley inoculated onto alfalfa seeds and growth and survival of the pathogen during sprouting and storage. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2212–5, 1996.

JEYAMKONDAN, S.; JAYAS, D. .; HOLLEY, R. . Microbial growth modelling with artificial neural networks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 343–354, 2001.

JUNEJA, V. K. et al. Modeling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken. **Food Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 328–335, 2007.

KAPPERUD, G. et al. Outbreak of *Salmonella* Typhimurium infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60-megadalton virulence plasmid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 12, p. 2597–2601, 1990.

KOSEGARTEN, C. E. et al. Description of *Aspergillus flavus* growth under the influence of different factors (water activity, incubation temperature, protein and fat concentration, pH, and cinnamon essential oil concentration) by kinetic, probability of growth, and time-to-detection models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 240, p. 115–123, 2017.

KOUTSOUMANIS, K. et al. Probabilistic model for *Listeria monocytogenes*

growth during distribution, retail storage, and domestic storage of pasteurized milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2181–2191, 2010.

LADO, B. H.; YOUSEF, A. E. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 4, p. 433–440, 2002.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453–462, 2001.

LATIMER, H. K. et al. Sensitivity analysis of *Salmonella* Enteritidis levels in contaminated shell eggs using a biphasic growth model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, n. 1–2, p. 71–87, 2002.

LAUDERDALE, T. L. et al. Multidrug resistance among different serotypes of clinical *Salmonella* isolates in Taiwan. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 55, n. 2, p. 149–155, 2006.

LEE, Y. J. et al. Predictive model for the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in raw pork meat as a function of temperature. **Food Control**, v. 44, p. 16–21, 2014.

LEVERENTZ, B. et al. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. **Journal of food protection**, v. 64, n. 8, p. 1116–21, 2001.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. A stochastic approach for integrating strain variability in modeling *Salmonella enterica* growth as a function of pH and water activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 3, p. 254–261, 2011a.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. **Food Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 828–837, 2011b.

LIANOU, A.; NYCHAS, G.-J. E.; KOUTSOUMANIS, K. P. Variability in the adaptive acid tolerance response phenotype of *Salmonella enterica* strains. **Food Microbiology**, v. 62, p. 99–105, 2017.

LINDQVIST, R. Estimation of *Staphylococcus aureus* growth parameters from turbidity data: characterization of strain variation and comparison of methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 4862–70, 2006.

LUNG, H.-M. et al. Microbial decontamination of food by electron beam irradiation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 44, n. 1, p. 66–78, 2015.

MA, Q.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Antimicrobial properties of microemulsions formulated with essential oils, soybean oil, and Tween 80. **International Journal of Food Microbiology**, v. 226, p. 20–25, 2016.

MA, Q.; ZHONG, Q. Incorporation of soybean oil improves the dilutability of essential oil microemulsions. **Food Research International**, v. 71, p. 118–125, 2015.

MATHOLE, M. A. et al. Presence, distribution, serotypes and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* among pigs, chickens and goats in South Africa. **Food Control**, v. 72, p. 219–224, 2017.

MCELROY, D. M.; JAYKUS, L.-A.; FOEGEDING, P. M. Validation and analysis of modeled predictions of growth of *Bacillus cereus* spores in boiled rice. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 2, p. 268–272, 2000.

MCMEEKIN, T. A. Predictive microbiology: Quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries. **Meat Science**, v. 77, n. 1 SPEC. ISS., p. 17–27, 2007.

MCMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: Providing a knowledge-based framework for change management. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1–2, p. 133–153, 2002.

MEMBRÉ, J.-M.; LAMBERT, R. J. W. Application of predictive modelling techniques in industry: From food design up to risk assessment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 1, p. 10–15, 2008a.

MILADI, H. et al. Microbial pathogenesis antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 95–100, 2016.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare L. ssp. hirtum*). **Food Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 79–83, 2000.

MOLLER, C. O. A. et al. Effect of natural microbiota on growth of *Salmonella* spp. in fresh pork - A predictive microbiology approach. **Food Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 284–295, jun. 2013.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Review of Microbiology**, v. 3, n. XI, p. 371–394, 1949.

MOON, H.; RHEE, M. S. Synergism between carvacrol or thymol increases the antimicrobial efficacy of soy sauce with no sensory impact. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 35–41, 2016.

MUÑOZ, M. et al. Prediction of time to growth of *Listeria monocytogenes* using Monte Carlo simulation or regression analysis, influenced by sublethal heat and recovery conditions. **Food Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 468–475, 2010.

NAIR, D. V. T. et al. The combined efficacy of carvacrol and modified atmosphere packaging on the survival of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* and lactic acid bacteria on Turkey breast cutlets. **Food Microbiology**, v. 49, p. 134–141, 2015.

NEUMEYER; ROSS; MCMEEKIN, T. Development of *Pseudomonas* predictor. **Conference Paper**, v. 52, p. 120–122, 1997.

NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. S3–S15, 2010.

NGUYEN, D. T. A. et al. Prevalence, antibiotic resistance, and extended-spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamase productivity of *Salmonella* isolates from raw meat and seafood samples in Ho Chi Minh City, Vietnam. **International Journal of Food Microbiology**, v. 236, p. 115–122, 2016.

NICOLAÏ, B. M.; VAN IMPE, J. F. Predictive food microbiology: A probabilistic approach. **Mathematics and Computers in Simulation**, v. 42, n. 2, p. 287–292, 1996.

NOGRADY, N. et al. Prevalence and characterization of *Salmonella* Infantis isolates originating from different points of the broiler chicken? human food chain in Hungary. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 1–2, p. 162–167, 2008.

OLASUPO, N. A. et al. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 448–451, 2003.

OSCAR, T. E. Validation of lag time and growth rate models for *Salmonella* Typhimurium: Acceptable Prediction Zone Method. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 2, p. 129–137, 2005.

PARISH, M. E. et al. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. s1, p. 161–173, 2003.

PARK, S. H. et al. Use of organic acids to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh apples and lettuce. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, 2011.

POSCHET, F. et al. Monte Carlo analysis as a tool to incorporate variation on experimental data in predictive microbiology. **Food Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 285–295, 2003.

POSCHET, F. Monte Carlo analysis as a tool to incorporate variation on experimental data in predictive microbiology. **Food Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 285–295, 2003.

POSSAS, A. et al. Application of predictive models to assess the influence of thyme essential oil on *Salmonella* Enteritidis behavior during shelf-life of ready-to-eat turkey products. **International Conference on Predictive Modeling in Food**, 2015.

PRAKASH, B. et al. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. **Food Control**, v. 47, p. 381–391, 2015.

RAMOS, M.; JIMÉNEZ, A.; GARRIGÓS, M. C. Chapter 26 – Carvacrol-based films: usage and potential in antimicrobial packaging. In: **Antimicrobial Food Packaging**. p. 329–338.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 80–84, 2005.

RODRÍGUEZ, I. et al. Extended-spectrum {beta}-lactamases and AmpC {beta}-lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003-07. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 2, p. 301–309, 2009.

ROLLER, S.; SEEDHAR, P. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4° and 8°C. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 390–394, 2002.

ROSS, T. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 231–245, 2000.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Modeling microbial growth within food safety risk assessments. **Risk Analysis**, v. 23, n. 1, p. 179–197, 2003.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A.; BARANYI, J. Predictive microbiology and food safety. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**. p. 59–68.

SÁNCHEZ, C.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. The effect of carvacrol on enteric viruses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 192, p. 72–76, 2015.

SHAHADA, F. et al. Molecular epidemiology of antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* serovar Infantis from poultry in Kagoshima, Japan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, n. 4, p. 302–307, 2006.

SIVAPALASINGAM, S. ET AL. Fresh produce: A growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. **Journal of Food Protection**, v. 10, p. 2342–2353, 2004.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 118–122, 1998.

SOUSA, J. P. et al. Carvacrol and 1,8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 9–13, 2012.

STAMATI, I. et al. On the effect of sampling rate and experimental noise in the discrimination between microbial growth models in the suboptimal temperature range. **Computers and Chemical Engineering**, v. 85, p. 84–93, 2016.

STURK, R.; OLSSON, L.; JOHANSSON, J. Risk and decision analysis for large underground projects, as applied to the Stockholm Ring Road tunnels. **Tunnelling and Underground Space Technology**, v. 11, n. 2, p. 157–164, 1996.

SZE-FAN TAN, M.; RAHMAN, S.; DYKES, G. A. Relationship between cell

concentration and *Salmonella* attachment to plant cell walls. **Food Control**, v. 67, p. 119–126, 2016.

T. A. MCMEEKIN; T. ROSS; D. A., R. Predictive microbiology - theory and application. **Food Microbiology**, v. 11, p. 85–86, 1994.

TAHERGORABI, R.; MATAK, K. E.; JACZYNSKI, J. Application of electron beam to inactivate *Salmonella* in food: Recent developments. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 685–694, 2012.

TAUXE, R. et al. Microbial hazards and emerging issues associated with produce: A preliminary report to the national advisory committee on microbiologic criteria for foods. **Journal of Food Protection**, v. 11, p. 1302–1471, 1997.

TAYLOR, J. L. et al. Simultaneous Outbreak of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Schwarzengrund in a Nursing Home: Association of *S. enteritidis* with bacteremia and hospitalization. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 3, p. 781–782, 1993.

TAYLOR, T. M. et al. Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality. **Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality**, n. 269, p. 49–68, 2015.

TE GIFFEL, M. C.; ZWIETERING, M. H. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 135–149, 1999.

TENENHAUS-AZIZA, F.; ELLOUZE, M. Software for predictive microbiology and risk assessment: A description and comparison of tools presented at the ICPMF8 Software Fair. **Food Microbiology**, v. 45, p. 290–299, 2015.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561–8, 2002.

VALDRAMIDIS, J.-M. M. AND V. 1 – Predictive Microbiology. In: **Modeling in Food Microbiology**. p. 1–15.

VELUGOTI, P. R. et al. Dynamic model for predicting growth of *Salmonella* spp. in ground sterile pork. **Food Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 796–803, 2011.

VUGIA, D. J. et al. Invasive *Salmonella* infections in the United States, foodnet, 1996–1999: Incidence, Serotype distribution, and outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. s3, p. S149–S156, 2004.

WAMBUI, J. et al. Good hygiene practices among meat handlers in small and medium enterprise slaughterhouses in Kenya. **Food Control**, v. 81, p. 34–39, 2017.

WEGENER, H. C. et al. *Salmonella* control programs in Denmark. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 7, p. 774–80, 2003.

**WHO. Food safety.** World Health Organization, 2015.

XUE, J.; ZHONG, Q. Thyme Oil Nanoemulsions Coemulsified by Sodium Caseinate and Lecithin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 40, p. 9900–9907, 2014.

YADAV, A. S. et al. Thermal inactivation of *Salmonella* Typhimurium on dressed chicken skin previously exposed to acidified sodium chlorite or carvacrol. **Food Control**, v. 66, p. 227–232, 2016.

ZOU, Q.-H. et al. Genotyping of *Salmonella* with lineage-specific genes: correlation with serotyping. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 49, p. 134–140, 2016.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–81, 1990.