

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Eficácia de películas edíveis suplementadas com
componentes de óleos essenciais no controlo de
Listeria monocytogenes e *Salmonella enterica*
Typhimurium**

Ana Isabel Arsénio Vieira

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Doutora Maria Leonor Faleiro e Prof. Doutora Maria Dulce
Antunes

2014

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Eficácia de películas edíveis suplementadas com
componentes de óleos essenciais no controlo de
Listeria monocytogenes e *Salmonella enterica*
*Typhimurium***

Ana Isabel Arsénio Vieira

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Doutora Maria Leonor Faleiro e Prof. Doutora Maria Dulce
Antunes

2014

Eficácia de películas edíveis suplementadas com componentes de óleos essenciais no controlo de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* Typhimurium

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright:

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

À minha orientadora, a Professora Doutora Maria Leonor Faleiro, pela sua disponibilidade e interesse no trabalho realizado, pelos seus ensinamentos, paciência e apoio.

À minha co-orientadora, a Professora Doutora Maria Dulce Antunes, pela sua orientação, colaboração e disponibilidade.

À Adriana, por toda a ajuda e por se mostrar sempre disponível, pela amizade e por todos os bons momentos.

Ao José e à Ana Sofia, pela amizade e pela imensa ajuda. Por todos os momentos partilhados cheios de risadas.

À Liseta, pela sua amizade, apoio e por ser minha “mãe adotiva”, que está e estará no meu coração.

Aos restantes colegas de laboratório, Soraia, Elsa, Sam e Jenna, pelo companheirismo e pela colaboração.

Às minhas amigas, Ana Rita Caramelo, Carina Silva, Ana Nunes, Melissa Afonso e Vanessa Abegão, por me terem oferecido o ombro, ouvido e conselhos quando precisei. Por garantirem que a minha sanidade mental se mantinha intacta e por garantirem que iria conseguir.

Ao Fábio, por todo o amor e carinho, pela extrema paciência e compreensão em todos os momentos desta fase.

À minha avó e ao meu irmão, por toda a ajuda, pelo amor e carinho.

À minha mãe, pelo amor incondicional, pelo carinho, por todos os sacrifícios, compreensão e palavras de incentivo.

Ao meu avô e ao meu tio, quem perdi durante estes anos, mesmo não presentes fisicamente, estiveram sempre presentes e continuaram a apoiar-me.

O trabalho foi realizado no âmbito do projeto (PTDC/AGR-ALI-121085/2010-INNCOAT-Inovação em filmes edíveis para melhorar a conservação de pequenos frutos e frutos minimamente processados.

Resumo

As películas edíveis são utilizadas na preservação da qualidade dos frutos. O crescimento de microrganismos, como a bactéria *Listeria monocytogenes* e a bactéria *Salmonella* Typhimurium, em frutos contribui para a sua rápida deterioração. A incorporação de óleos essenciais em películas edíveis tem sido explorada no âmbito da preservação da qualidade de frutos minimamente processados.

O objetivo principal deste estudo consistiu na avaliação do efeito da utilização de películas edíveis suplementadas com óleos essenciais, eugenol e citral, no controlo das bactérias *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ e ‘Golden Delicious’. Neste estudo foi ainda avaliada a sobrevivência das bactérias em maçãs revestidas com as películas sob exposição a um sistema de simulação do trato gastrointestinal. A atividade antioxidante nas condições do sistema gastrointestinal foi igualmente avaliada.

A aplicação das películas edíveis à base de alginato de sódio (2%) suplementadas com 0,2% de eugenol e com a mistura 0,1% de eugenol e 0,15% de citral inibiram o desenvolvimento das bactérias nas maçãs ‘Bravo de Esmolfe’, mas a sua eficácia foi menor nas maçãs ‘Golden Delicious’.

Em condições de simulação do sistema gastrointestinal utilizando o suco gástrico com pH 2,5, em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ revestidas com as películas foi observada a sobrevivência das duas bactérias, em contraste com a utilização do suco gástrico a pH 1,5 onde, a recuperação da bactéria *L. monocytogenes* em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ revestidas com ambas as películas não foi observada.

No entanto, foi possível a recuperação da bactéria *S. Typhimurium* ao longo do sistema. A atividade antioxidante não foi significativa sob exposição aos sucos gastrointestinais.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, películas edíveis, óleos essenciais, maçã.

Abstract

Edible coatings are used for the preservation of fruit quality. Contamination of minimally processed fruits by *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium poses a risk to consumer health. The incorporation of essential oils into edible coatings has been explored for preservation of the quality of minimally processed fruits. The main objective of this study was to evaluate the effect of edible coats supplemented with essential oils, eugenol and citral, to control the growth of *L. monocytogenes* and *S. Typhimurium* in apples 'Bravo de Esmolfe' and 'Golden Delicious'. In this study it was also estimated the bacterial survival in apples coated with the films over the exposure to a simulated system of the gastrointestinal tract. The antioxidant activity in the conditions of the gastrointestinal system was also determined.

The application of the sodium alginate edible coating (2%) supplemented with 0,2% eugenol and with the combination of 0,1% eugenol and 0,15% citral inhibited the bacterial development on apples 'Bravo de Esmolfe', but its efficacy was lower in 'Golden Delicious' apples .

At simulated conditions of the gastrointestinal tract using gastric juice at pH 2,5 it was observed the survival of the two bacteria in the inoculated apples 'Bravo de Esmolfe' coated with both films. In contrast the exposure of *L. monocytogenes* to the gastric juice at pH 1,5 led to null recovery. However it was possible to recover the bacterium *S. Typhimurium* throughout the simulated gastrointestinal system.

The antioxidant activity was not significant over the exposure to gastrointestinal juices.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, edible coatings, essential oils, apple.

Abreviaturas

CDC - *Center for Disease and Control and Prevention*

cm – centímetro

DOP - Denominação de Origem Protegida

FDA - *Food and Drug Administration*

g – grama

GRAS - *Generally Recognized as Safe*

h - horas

l - litro

LIPI - *Listeria pathogenicity Island*

mg – miligrama

min - minutos

mL - mililitro

mm – milímetro

nm - nanómetro

OE – Óleo essencial

ORF – *Open Reading Frame*

p/v – peso/volume

SPI - *Salmonella pathogenicity Island*

T3SS - *Type III secretion system*

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

v/v – volume/volume

YOPI - *young, old, pregnant and immunodepressed*

μm - micrómetro

μL – microlitro

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract.....	vi
Abreviaturas.....	vii
Capítulo I - Introdução	1
1.1 Frutos com importância económica	3
1.1.1 Maçã ‘Bravo de Esmolfe’	3
1.1.2 Maçã ‘Golden Delicious’	4
1.2 Contaminação microbiana de frutos	5
1.3 Incidência de bactérias patogénicas em frutos e frutos minimamente processados	8
1.4 A bactéria <i>Listeria monocytogenes</i>	9
1.4.1 Características gerais	9
1.4.2 Patogénese	11
1.4.3 A doença listeriose.....	12
1.5 A bactéria <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium.....	13
1.5.1 Características gerais	13
1.5.2 Patogénese	14
1.5.3 A doença salmonelose	16
1.6 Utilização de óleos essenciais no controlo microbiano	17
1.6.1 Eugenol.....	19
1.6.2 Citral.....	21
1.7 Objetivos.....	22
Capítulo II - Materiais e Métodos.....	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Equipamentos	23
2.1.2 Meios de cultura	24
2.1.3 Soluções.....	24
2.1.4 Material biológico	25
2.1.4.1 Óleos essenciais	25
2.1.4.2 Maçãs	25

2.1.4.3	Bactérias.....	26
2.2	Métodos	26
2.2.1	Preparação do inóculo bacteriano.....	26
2.2.2	Maçãs.....	27
2.2.3	Películas edíveis	28
2.2.3.1	Preparação das películas edíveis.....	28
2.2.3.2	Aplicação de películas edíveis.....	28
2.2.4	Medição do pH das maçãs	29
2.2.5	Simulação das condições do trato gastrointestinal	29
2.2.6	Avaliação da atividade antioxidante.....	30
2.2.6.1	TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).....	31
2.2.6.2	ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	32
2.2.7	Determinação de ácidos orgânicos das maçãs por High-performance liquid chromatography (HPLC).....	34
2.2.8	Análise estatística	34
Capítulo III	- Resultados e Discussão	35
3.1	Características da maçã.....	35
3.2	Sobrevivência da bactéria <i>Listeria monocytogenes</i> 12.04 e da <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ conservadas a 20°C.....	36
3.3	Utilização das películas de alginato de sódio (2%) suplementadas com eugenol e citral38	
3.3.1	Utilização de películas edíveis em maçã ‘Bravo de Esmolfe’ para controlo de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium.....	39
3.3.2	Utilização de películas edíveis em maçã ‘Golden Delicious’ para controlo de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella enterica</i> Thyphimurium.....	44
3.4	Sobrevivência da bactéria <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> Typhimurium em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ revestidas com películas suplementadas com óleos essenciais, sujeitas à simulação de condições do trato gastrointestinal (suco gástrico com pH 2,5)	47
3.4.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	48
3.4.2	<i>Salmonella</i> Typhimurium.....	50
3.5	Sobrevivência das bactérias <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> Typhimurium em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ revestidas com películas suplementadas com óleos essenciais, sujeitas à simulação de condições do trato gastrointestinal (suco gástrico com pH 1,5).....	53
3.5.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	54

3.5.2	<i>Salmonella Typhimurium</i>	56
3.6	Atividade antioxidante	58
3.6.1	TEAC	60
3.6.2	ORAC	61
Capítulo IV – Conclusões		62
4.1	Conclusões	62
4.2	Perspetivas futuras	63
Capítulo V - Bibliografia		65

Índice Tabelas

Tabela 2.1.1. Origem das bactérias utilizadas no estudo.....	26
Tabela 3.1.2. Concentração dos ácidos orgânicos determinados por HPLC de amostras de maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ e ‘Golden Delicious’	35
Tabela 3.1.3. Valores de pH das duas cultivares de maçãs analisadas.....	35
Tabela 3.6.4. Atividade antioxidante determinada pelo método TEAC das amostras de maçã ‘Bravo de Esmolfe’ na ausência e presença das películas de alginato de sódio (2%) suplementadas com 0,2% eugenol e com 0,1% eugenol e 0,15% citral quando expostas aos sucos gastrointestinais.	60
Tabela 3.6.5. Atividade antioxidante determinada pelo método ORAC das amostras de maçã ‘Bravo de Esmolfe’ na ausência e na presença das películas de alginato de sódio (2%) suplementadas com 0,2% eugenol e com 0,1% eugenol e 0,15% citral quando expostas aos sucos gastrointestinais.	61

Índice Figuras

Figura 1.4.1. Mecanismo de infecção da bactéria <i>Listeria monocytogenes</i> (Adaptado de Freitag <i>et al.</i> , 2009).	12
Figura 1.4.2. Representação esquemática de uma infecção causada por <i>Listeria monocytogenes</i> (Adaptado de Lecuit, 2007).	13
Figura 1.5.3. Mecanismo de infecção da bactéria <i>Salmonella</i> Typhimurium (Fonte: Velge <i>et al.</i> , 2012).	16
Figura 1.5.4. Representação esquemática de uma infecção causada por <i>Salmonella</i> Typhimurium (Adaptado de Baron, 1996).	17
Figura 1.6.5. Estrutura química do Eugenol.	20
Figura 1.6.6. Estrutura química do citral. 1) geraniol, 2) neral.	21
Figura 2.2.7. Ilustração da zona de inoculação da maçã 'Bravo de Esmolfe' (3x3 cm). 27	
Figura 2.2.8. Curva padrão Trolox e a respetiva equação, utilizada para determinar a atividade antioxidante através do método TEAC.	32
Figura 2.2.9. Curva padrão Trolox com a respetiva equação, utilizada para determinar a atividade antioxidante através do método ORAC.	33
Figura 3.2.10. Sobrevivência da bactéria <i>L. monocytogenes</i> 12.04 em maçãs 'Bravo de Esmolfe'. Os dados são representativos de três ensaios em duplicado (n=6). As barras de erro representam o desvio padrão.	37
Figura 3.2.11. Sobrevivência da bactéria <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 em maçãs 'Bravo de Esmolfe'. Os dados são representativos de três ensaios em duplicado (n=6). As barras de erro representam o desvio padrão.	37
Figura 3.3.12. Efeito da utilização da películas de alginato de sódio (2%) com e sem suplemento de 0,1% eugenol em fatias de maçã 'Bravo de Esmolfe' no controlo de <i>Listeria monocytogenes</i> 12.04 em condições de armazenamento a 4°C. Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio padrão.	40
Figura 3.3.13. Efeito da utilização das películas de alginato de sódio (2%) com e sem suplemento de 0,1% eugenol em fatias de maçã 'Bravo de Esmolfe' no controlo de <i>S.</i>	

Thyphimurium ATCC 14028 em condições de armazenamento a 4°C. Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio padrão.	41
Figura 3.3.14. Efeito da utilização das películas de alginato de sódio (2%) na presença de 0,2% eugenol e na presença de 0,1% eugenol mais 0,15% citral em maçãs cortadas ‘Bravo de Esmolfe’ no controlo de <i>Listeria monocytogenes</i> 12.04 em condições de armazenamento a 4°C. Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio padrão.	42
Figura 3.3.15. Efeito da utilização das películas de alginato de sódio (2%) na presença de 0,2% eugenol e na presença de 0,1% eugenol mais 0,15% citral em maçãs cortadas ‘Bravo de Esmolfe’ no controlo de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 em condições de armazenamento a 4°C. Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio padrão.	44
Figura 3.3.16. Efeito da utilização das películas de alginato de sódio (2%) na presença de 0,2% eugenol e na presença de 0,1% eugenol mais 0,15% citral em maçãs cortadas ‘Golden Delicious’ no controlo de <i>Listeria monocytogenes</i> 12.04 em condições de armazenamento a 4°C. Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio padrão.	45
Figura 3.3.17. Efeito da utilização das películas de alginato de sódio (2%) na presença de 0,2% eugenol e na presença de 0,1% eugenol mais 0,15% citral em maçãs cortadas ‘Golden Delicious’ no controlo de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 em condições de armazenamento a 4°C. Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio padrão.	46
Figura 3.4.18. Sobrevivência da bactéria <i>Listeria monocytogenes</i> 12.04 quando exposta ao suco gástrico a pH 2,5 (A) e ao suco intestinal (B), em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ na ausência (controlo) e na presença da película de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol e de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral. Os dados são representativos de três ensaios independentes com determinações em duplicado (n=6). As barras de erro representam o desvio padrão.	49
Figura 3.4.19. Sobrevivência da bactéria <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 quando exposta ao suco gástrico a pH 2,5 (A) e ao suco intestinal (B) em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ na ausência (controlo) e na presença das película de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol e de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral. Os	

dados são representativos de três ensaios independentes com determinações em duplicado (n=6). As barras de erro representam o desvio padrão.	52
Figura 3.5.20. Sobrevivência da bactéria <i>Listeria monocytogenes</i> 12.04 quando exposta suco gástrico a pH 1,5 (A) e ao suco intestinal (B), em maçãs ‘Bravo de Esmolfé’ sem revestimento (controle) e revestidas com a película de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol e com a película de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral. Os dados são representativos de três ensaios independentes com determinações em duplicado (n=6). As barras de erro representam o desvio padrão.	55
Figura 3.5.21. Sobrevivência da bactéria <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 quando exposta ao suco gástrico a pH 1,5 (A) e ao suco intestinal (B), em maçãs ‘Bravo de Esmolfé’ sem revestimento (controle) e revestidas com a película de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol e com a película de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral. Os dados são representativos de três ensaios independentes com determinações em duplicado (n=6). As barras de erro representam o desvio padrão. ...	57
Figura 3.6.22. Maçãs 'Bravo de Esmolfé' cortadas e revestidas A- Película alginato de sódio (2%) sem óleo essencial, B- Película alginato de sódio (2%) suplementada com 0,1% eugenol, C- Película alginato de sódio (2%) suplementada com 0,2% eugenol, D- Película alginato de sódio (2%) suplementada com 0,1% eugenol e 0,15% citral, E- sem revestimento (controle) ao fim de 3 dias de armazenamento a 4°C.	59
Figura 3.6.23. Aspeto das maçãs ‘Golden Delicious’ minimamente processadas com a aplicação das três diferentes películas após 3 dias armazenadas a 4°C. A – Película sem óleo essencial; B – Película com 0,2% eugenol; C – Película com 0,1% eugenol e 0,15% citral; D – Controlo.....	59

Capítulo I - Introdução

O consumo de frutos frescos e de frutos minimamente processados tem vindo a aumentar ao longo dos anos, pois são fundamentais para uma alimentação saudável. São fontes ricas em nutrientes, vitaminas e em fibras (Olaimat & Holley, 2012). Uma alimentação rica em frutos e vegetais têm-se demonstrado benéfica contra o desenvolvimento de várias doenças, incluindo cancro e várias doenças crónicas (Goodburn & Wallace, 2013).

Os frutos frescos são altamente perecíveis dado que continuam os processos metabólicos após a sua colheita, levando à sua deterioração e conseqüente perda de qualidade (Dhall, 2013). Industrialmente, os frutos minimamente processados são sujeitos a várias etapas de processamento que incluem a seleção, lavagem, descasque, corte e empacotamento. Estas operações conduzem, ainda mais, comparativamente com frutos inteiros, à deterioração rápida da qualidade dos frutos incrementando a perda de água, amolecimento, contaminação microbiana, escurecimento e aumento da respiração (Qi *et al.*, 2011).

A aparência e o sabor costumam ser os fatores qualitativos mais importantes para os consumidores, contudo essa percepção tem vindo a mudar. Os consumidores estão cada vez mais preocupados com a segurança alimentar e com o valor nutricional. O crescimento de microrganismos nos frutos leva à sua rápida deterioração e à causa de doenças (Sanla-Ead *et al.*, 2012). As bactérias patogénicas como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium* são dois microrganismos que causam grande preocupação para a saúde humana. Estas são duas das bactérias que raramente são responsáveis pelo surgimento de surtos relacionados com o consumo de frutos. No entanto a sua associação ao consumo de frutos tem vindo a aumentar (Abadias *et al.*, 2008). Por outro lado, os frutos quando minimamente processados são mais suscetíveis ao ataque de patogénicos sendo necessário maiores cuidados sanitários.

Devido a todos estes factos, tem-se desenvolvido, cada vez mais, várias estratégias para preservar a qualidade e aumentar o tempo de vida quer dos frutos frescos, quer dos frutos minimamente processados. Uma destas estratégias é a utilização de películas edíveis (Chiumarelli & Hubinger, 2012). Ao longo dos anos, o mercado de películas edíveis tem vindo a aumentar, pois é considerada uma técnica de baixo custo

adequada para a preservação de frutos frescos e frutos minimamente processados (Assis & Britto, 2011).

Uma película edível é uma camada fina, normalmente transparente, composta por materiais edíveis, aplicada à superfície dos frutos. Esta encontra-se na forma líquida sendo assim aplicada, normalmente, por imersão. Mas também pode ser aplicada por pulverização ou por pincelagem (Falguera *et al.*, 2011; Dhall, 2013). Existe uma grande variedade de produtos que podem ser utilizados na sua formulação. Todos estes produtos utilizados devem ser abundantes e de baixo custo. São utilizados polissacarídeos (celulose, quitosano, alginato, entre outros), proteínas (colagénio, caseína, glúten, zeína, entre outros) e lípidos (cera, resina, ácidos gordos, entre outros) (Dhall, 2013; Assis & Britto, 2011). Estes podem ser utilizados individualmente ou em combinação. As películas atuam como barreiras contra a perda de água, trocas gasosas (oxigénio e dióxido de carbono), humidade, reduz a respiração, a oxidação e atuam como barreiras contra os microrganismos (Qi *et al.*, 2011; Falguera *et al.*, 2011). Estas propriedades estão relacionadas com a sua formulação. As películas de polissacarídeos contribuem com boas propriedades estruturais e mecânicas e possuem uma menor capacidade de permeabilidade, o que pode contribuir para uma maior preservação de alguns alimentos (Falguera *et al.*, 2011; Dhall, 2013).

As películas edíveis também são passíveis da adição de aditivos alimentares aos frutos. Produtos como antioxidantes (p. ex. ácido ascórbico), corantes, sabores, nutrientes, especiarias, agentes antimicrobianos (p. ex. óleos essenciais) têm sido misturados às películas (Rojas-Graü *et al.*, 2009). Estes produtos contribuem para o aumento do tempo de vida e para a redução do crescimento de microrganismos nos frutos (Rojas-Graü *et al.*, 2009).

A utilização de películas edíveis ou outros produtos que entram em contacto com produtos alimentares têm de obter aprovação da FDA (*Food and Drug Administration*), sendo depois reconhecidos como seguros (GRAS – *Generally Recognized as Safe*) (Du *et al.*, 2011; Embuscado & Huber, 2009).

1.1 Frutos com importância económica

O consumo de frutos tem-se demonstrado benéfico para a saúde, em particular, devido aos elevados níveis de antioxidantes naturais (carotenoides, vitaminas, compostos fenólicos, entre outros) (Chiumarelli & Hubinger, 2012; Guerreiro *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2011). Em países europeus como Inglaterra, França e Itália, o consumo tem sido de 12 kg, 6 kg, 4 kg, respetivamente enquanto na Alemanha, Bélgica e Holanda tem sido >3 kg por pessoa (Abadias *et al.*, 2008).

A dose recomendada é de ≥ 400 g/dia (Goodburn & Wallace, 2013).

A maçã é um dos frutos mais consumidos a nível mundial. Estes frutos são incluídos na dieta, por serem uma importante fonte de antioxidantes e vitaminas (Serra *et al.*, 2012). Vários estudos relataram a relação entre o consumo de maçãs e a redução de risco das doenças mencionadas anteriormente (Wolfe *et al.*, 2003; Nagasako-Akazome *et al.*, 2007; Boyer & Liu, 2004; Sun & Liu, 2008; Liu *et al.*, 2009; Serra *et al.*, 2012). Esta relação deve-se, principalmente, à presença de polifenóis, pois estes mostraram-se ser responsáveis pelos efeitos antioxidantes (Wolfe *et al.*, 2003; Nagasako-Akazome *et al.*, 2007; Boyer & Liu, 2004; Sun & Liu, 2008; Serra *et al.*, 2012; Drogoudi & Pantelidis, 2011). Mas a relação do valor nutricional com a saúde não depende só da concentração de nutrientes como também depende do consumo diário (Feliciano *et al.*, 2010). Os polifenóis, em maior quantidade nos frutos, são a quercetina, catequina, epicatequina, procianidina, florizina e o ácido clorogénico. A sua concentração varia consoante a cultivar, pois depende da composição da casca (Drogoudi & Pantelidis, 2011). Foi demonstrado que a cultivar de maçã ‘Bravo de Esmolfe’ é das que contém valores mais elevados de polifenóis, o dobro ou o triplo do presente na cultivar ‘Golden Delicious’ (Serra *et al.*, 2010).

1.1.1 Maçã ‘Bravo de Esmolfe’

A maçã ‘Bravo de Esmolfe’ é uma cultivar portuguesa, original da freguesia Esmolfe, Viseu, cultivada a norte de Portugal. Pomares de maçã ‘Bravo de Esmolfe’, encontram-se, principalmente, nas freguesias de Mangualde, Viseu, Lamego, Moimenta da Beira, Covilhã, Belmonte e Fundão. A primeira árvore desta cultivar apareceu à

cerca de 200 anos na vila Esmolfe (Rocha *et al.*, 2004). A maçã ‘Bravo de Esmolfe’ é bastante apreciada pelos consumidores pelo seu aroma e sabor (Reis *et al.*, 2009).

A maçã ‘Bravo de Esmolfe’ é colhida em meados de Setembro estando disponível até Maio, mas a sua disponibilidade é superior nos meses de Dezembro a Fevereiro (Rocha *et al.*, 2004).

O aroma foi definido como *sui generis*, tendo os consumidores identificado um traço cítrico. A composição volátil depende da variedade, condições climáticas, data da colheita, variedade e do estado de maturação (este foi considerado o mais importante) (Reis *et al.*, 2009).

Reis *et al.*, (2009) avaliou a composição volátil presente na maçã ao longo de vários meses. Foi detetada a presença de ésteres, terpenóides, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, entre outros. Em relação aos aromas, o floral e o cítrico foram os mais característicos. No seu conjunto explicam o aroma *sui generis* desta cultivar.

A maçã ‘Bravo de Esmolfe’ é uma cultivar classificada como DOP (Denominação de Origem Protegida). Apresenta boas propriedades organoléticas, tal como a doçura e o sabor, mas a sua deterioração é bastante rápida (Moldão-Martins *et al.*, 2003).

1.1.2 Maçã ‘Golden Delicious’

A maçã ‘Golden Delicious’ é a cultivar de cor amarela esverdeada pálida (Hui *et al.*, 2006). Por vezes, verifica-se zonas vermelhas na casca (Garlough, 2011). O seu interior também apresenta uma cor amarela. O seu processo de escurecimento é lento, após corte (Garlough, 2011). Esta maçã é, também, muito sumarenta e bastante aromática (Hui *et al.*, 2006).

Devido ao seu sabor, pois é uma maçã muito doce, é utilizada na produção de sumos, compotas, entre outros (Garlough, 2011).

É colhida em meados do mês de Setembro e início do mês de Outubro (Hui *et al.*, 2006).

1.2 Contaminação microbiana de frutos

Tem sido relatada a presença das bactérias patogénicas *Listeria monocytogenes* e a *Salmonella* Typhimurium em frutos frescos e em frutos minimamente processados (Abadias *et al.*, 2011).

A contaminação pode ocorrer durante a produção agrícola, colheita, manuseamento, transporte e distribuição. Também pode ocorrer durante a lavagem e nas etapas de empacotamento (Mehtyar *et al.*, 2011). Nestas fases do processo, os frutos depois de terem contacto com o solo e água, passam pelo equipamento e com o manuseamento humano e até animal, o que pode contribuir para a sua contaminação. Nestas etapas pode ocorrer a danificação dos frutos afetando a sua qualidade (Mehtyar *et al.*, 2011). Em operações como o descasque e corte ocorre a destruição das células, stress dos tecidos e, também, são removidas as barreiras naturais (como a casca) presentes nos frutos, o que os torna mais suscetíveis à perda de água e decomposição. A remoção da casca contribui igualmente para uma maior exposição dos nutrientes provocando a sua oxidação (Alegre *et al.*, 2010).

O crescimento das bactérias depende de vários fatores como a temperatura, pH, disponibilidade de água, nutrientes e composição da atmosfera da embalagem (Oliveira *et al.*, 2011; Espina *et al.*, 2012). Os biofilmes microbianos (células aderentes a uma superfície) constituem um enorme problema aos produtores devido à resistência destas formas contra a ação de desinfetantes (Aviles *et al.*, 2013).

A maioria dos frutos tem um valor de pH 4,0-5,0, o que permite o crescimento de vários microrganismos (Alegre *et al.*, 2013). Relativamente à temperatura, os frutos são armazenados a temperaturas adequadas de refrigeração ($\leq 4^{\circ}\text{C}$) (Francis *et al.*, 2012). Mas, por exemplo, no caso da bactéria *L. monocytogenes*, esta é capaz de crescer a temperaturas de refrigeração (Gandhi *et al.*, 2007). Para evitar o crescimento bacteriano, os frutos devem ser armazenados a temperaturas inferiores a 4°C reduzindo significativamente o seu crescimento (Alegre *et al.*, 2010).

A casca dos frutos proporciona a existência de barreiras protetoras, físicas e químicas devido à presença de cutículas. Contudo, estas são removidas durante o processamento (durante o corte e descasque) aumentando assim a sua vulnerabilidade, o que contribui para a contaminação (Alegre *et al.*, 2010; Strawn & Danyluk, 2010).

Deste modo, os frutos minimamente processados são mais suscetíveis quando expostos a condições desfavoráveis (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2013).

A superfície dos frutos influencia a adesão dos microrganismos (Fernandes *et al.*, 2014). Alguns frutos proporcionam uma maior adesão (Fernandes *et al.*, 2014). Existem vários estudos que indicam a sua relação (Fernandes *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2009; Hassan & Frank, 2004). As propriedades hidrofóbicas, carga elétrica e a rugosidade da casca contribuem para essa influência (Fernandes *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2009; Hassan & Frank, 2004). Compostos hidrofóbicos presentes na casca produzem cutina, suberina e ceras que são componentes primários das cutículas (membrana extracelular contínua das células da epiderme), o que influencia a interação entre os frutos e os microrganismos (Fernandes *et al.*, 2014; López-Casado *et al.*, 2007).

Uma grande variedade de frutos proporciona a colonização de elevadas concentrações de bactérias (Leff & Fierer, 2013), sendo detetado, normalmente, valores entre 10^4 - 10^6 UFC/g, na maioria dos frutos (Abadias *et al.*, 2011; Abadias *et al.*, 2008).

Vários estudos reportaram a sobrevivência e crescimento das bactérias *L. monocytogenes* e a *S. Typhimurium* em maçãs armazenadas a temperatura ambiente (Alegre *et al.*, 2010; Perez-Rodriguez *et al.*, 2014; Conway *et al.*, 2000; Raybaudi-Massilia *et al.*, 2009). Em morangos minimamente processados, a população da bactéria *S. Typhimurium* diminuiu quando os frutos foram armazenados a 5°C durante 7 dias enquanto que a população da bactéria *L. monocytogenes* manteve-se quando os frutos foram armazenados a 24°C durante 48 h e a 4°C durante 7 dias. Em tomates minimamente processados (pH 4-4,5), a população de *S. Typhimurium* aumentou quando conservados a temperatura ambiente. Já a população *L. monocytogenes* diminuiu quando armazenados a 10°C e a 21°C (Strawn & Danyluk, 2010). Frutos não ácidos como o melão, melancia, papaia e dióspiro também proporcionam o crescimento de microrganismos (Strawn & Danyluk, 2010).

Tem sido demonstrado o crescimento da bactéria *L. monocytogenes* em frutos não ácidos e ácidos (p. ex. tomate e laranja) quando armazenado a temperaturas superiores a 20°C (Flessa *et al.*, 2005; Strawn & Danyluk, 2010). O seu crescimento também ocorre em fatias de maçã ‘Golden Delicious’ armazenadas a 10°C e a 20°C (Alegre *et al.*, 2010). Em sumos de tomate comerciais conservados a 5°C durante 15 dias, a sua população aumenta (Roering *et al.*, 1999).

A bactéria *S. Typhimurium* consegue colonizar frutos como a manga (pH 4,2) durante o processamento após a colheita (Strawn & Danyluk, 2010). Quando as mangas

foram armazenadas quer a temperaturas de refrigeração quer a temperaturas $\geq 20^{\circ}\text{C}$, o seu crescimento foi mantido (Strawn & Danyluk, 2010). Em sumos de papaia, a 4°C , o crescimento desta bactéria ocorre lentamente e a 37°C ocorre rapidamente (Strawn & Danyluk, 2010). Em tomates (pH 3,99-4,37) minimamente processados conservados a 22°C e a 30°C , a população de *S. Typhimurium* aumenta (Guo *et al.*, 2001). O seu crescimento também foi descrito em cidra de maçã não pasteurizada (pH 4,1) (Roering *et al.*, 1999).

Um estudo realizado por Danyluk *et al.*, (2014) indicou um crescimento superior da bactéria *L. monocytogenes* relativamente à bactéria *S. Typhimurium* em meloa variedade cantalupe cortada e conservada a temperaturas inferiores a 20°C . No entanto, foi observado um aumento da sua população quando a conservação decorreu a 5°C durante 15 dias e quando a conservação foi a 4°C durante 6 dias. A superfície deste tipo de meloa é composta por uma estrutura complexa que favorece a adesão das bactérias que facilmente penetram infetando a polpa (Danyluk *et al.*, 2014).

De modo a salvaguardar a segurança dos frutos e de frutos minimamente processados é necessário implementar, nas indústrias, várias medidas preventivas. Várias diretrizes de Boas Práticas Agrícolas (*Good Agricultural Practice – GAP*) foram elaboradas, tais como *Risks of Pathogens in Ready to Eat Fruits, Salads through the production process* em 2004, o *Microbiological Guidance for Produce Suppliers to Chilled Food Manufacturers* em 2007 e o *Code of Good Practice for Fresh Fruits and Vegetables* em 2010. Este último é um código aceite internacionalmente que refere os requisitos necessários para proceder a uma produção segura de produtos frescos. No *Global Gap Standard for Integrated Farm Management* de 2012 são referidos os requisitos gerais, mas não incluem requisitos para a segurança microbiológica (Goodburn & Wallace, 2013).

A certificação HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*) é obrigatória e, cada vez mais, imprescindível. O sistema HACCP consiste num sistema preventivo de controlo da segurança alimentar, identificando os riscos e definindo medidas preventivas. Empresas certificadas demonstram, assim, a qualidade dos seus produtos, oferecendo aos consumidores a segurança dos seus produtos (CERTIF).

Como a contaminação em frutos tem sido cada vez mais frequente, foi estabelecida uma tolerância zero na presença de bactérias patogénicas (Thévenot *et al.*, 2006). No Canadá e em França, dependendo do alimento, são aplicadas normas com a indicação dos valores limite em cada um deles (Thévenot *et al.*, 2006).

1.3 Incidência de bactérias patogênicas em frutos e frutos minimamente processados

Ao longo dos anos, o número de surtos de origem alimentar associados a frutos frescos e frutos minimamente processados tem vindo a aumentar (Abadias *et al.*, 2008).

Nos anos 90, o consumo de frutos frescos e vegetais foram responsáveis por 12% de todos os surtos de origem alimentar (Goodburn & Wallace, 2013). Na Inglaterra relataram-se 88 surtos provocando mais de 3435 casos, entre os anos 1996-2006 associado ao consumo de frutos e vegetais. Em 2011, o *Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food* (ACMSF) reportou que entre os anos 2008-2010 ocorreram 531 casos em que um desses resultou em morte associado ao consumo de frutos e vegetais (Goodburn & Wallace, 2013).

A incidência de infeções causadas pela bactéria *L. monocytogenes* registadas na Europa é de, aproximadamente, 1500 casos/ano (Barbau-Piednoir *et al.*, 2013). Devido à sua taxa elevada de fatalidade (30-40%), a listeriose é uma das causas de morte mais frequente associada ao consumo de produtos alimentares contaminados com esta bactéria (Barbau-Piednoir *et al.*, 2013; Miliotis & Bier, 2003). O surto mais recente ocorreu em 2011 devido ao consumo de meloa Cantalupe (Lomonaco *et al.*, 2013; CDC, 2011). A meloa era produzida numa quinta localizada no Colorado, EUA (CDC, 2011). Neste surto foram registados 146 casos com 32 mortes e 1 aborto (CDC, 2011; Danyluk *et al.*, 2014). As serovares 1/2a e 1/2b foram as implicadas neste surto (Lomonaco *et al.*, 2013; CDC, 2011). O CDC (*Center for Disease and Control and Prevention*) identificou 34 surtos relacionados com o consumo de melões que ocorreram nos EUA entre 1973 e 2011 (Danyluk *et al.*, 2014). A maioria destes foram causados pela *Salmonella* spp. (Danyluk *et al.*, 2014).

Foi estimado que nos EUA, a bactéria *S. enterica* causa por ano cerca de 1.2 milhões de casos (Jackson *et al.*, 2013), onde 35% resultaram em hospitalizações, enquanto 28% resultaram em morte (Aviles *et al.*, 2013).

Os surtos de salmonelose são normalmente associados ao consumo de produtos alimentares contaminados, em particular carne de aves e ovos (Hur *et al.*, 2012). Recentemente, o número de relatos de salmonelose tem aumentado, devido ao aumento de procura e consumo de frutos frescos e frutos minimamente processados contaminados (Oliveira *et al.*, 2011). A bactéria *S. Typhimurium* foi responsável por

23,3% dos casos de salmonelose ocorridos na Europa durante o ano 2009 (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2011).

Recentemente, esta serovar foi associada aos surtos ocorridos em 2006 e em 2012 (CDC, 2012; CDC, 2006). Em 2006 ocorreu um surto de salmonelose devido ao consumo de tomates contaminados (CDC, 2006) onde foram registados 183 casos nos EUA e até no Canadá (CDC, 2006). Contudo, não foram reportadas mortes e 22 pacientes foram hospitalizados (CDC, 2006). O surto que ocorreu em 2012, também nos EUA, esteve relacionado com a contaminação de meloa Cantalupe (CDC, 2012). Neste surto foram afetadas 228 pessoas que resultaram em hospitalizações e até em 3 mortes (CDC, 2012; CDC, 2006).

1.4 A bactéria *Listeria monocytogenes*

1.4.1 Características gerais

A bactéria *Listeria monocytogenes* é um agente patogénico causador de listeriose humana e animal (Roberts *et al.*, 2006).

Esta espécie é uma das quinze espécies, nomeadamente, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. recourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia* e *L. grandensis* (Jin *et al.*, 2012; Bertsch *et al.*, 2013; Bakker *et al.*, 2013; Halter *et al.*, 2013), mas apenas a *L. monocytogenes* e a *L. ivanovii* são reconhecidas como sendo patogénicas (Boerlin *et al.*, 1992; Bakker *et al.*, 2010; Leclercq *et al.*, 2010). A espécie *L. ivanovii* causa infeções principalmente em animais, mas também causa infeções em humanos, contudo são raras (Bakker *et al.*, 2010; Boerlin *et al.*, 1992). Apesar das restantes espécies serem não patogénicas, as espécies *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. innocua* têm sido implicadas em infeções humanas (Barbau-Piednoir *et al.*, 2013).

A bactéria *L. monocytogenes* foi descrita originalmente por Murray *et al.* em 1926 (Low & Donachie, 1997). Esta bactéria apresenta-se sob a forma de pequenos bacilos gram-positivos com um diâmetro de 0,5-2 µm (Low & Donachie, 1997; Murray, 2010). É uma bactéria anaeróbia facultativa, não é formadora de esporos, catalase positiva e oxidase negativa (Barbau-Piednoir *et al.*, 2013; Ryser & Marth, 2007). A sua

mobilidade é dependente da temperatura. Entre 20-25°C tem uma mobilidade característica sob o seu próprio eixo (“cambalhota”) através de flagelos peritricos. Quando se encontra a temperaturas iguais ou superiores a 37°C, a produção de flagelina é reduzida ficando, assim, imóveis (Miliotis & Bier, 2003).

Em relação ao seu crescimento, é uma bactéria que cresce bem na maioria dos meios de culturas comuns (Ryser & Marth, 2007; Pádua, 2009). A temperatura ótima de crescimento é entre 30 a 37°C, contudo é capaz de crescer a temperaturas de refrigeração (2-4°C) e 50°C (Gandhi *et al.*, 2006; Barbau-Piednoir *et al.*, 2013). O seu crescimento ocorre a valores de pH 4,4-9,6, sendo o valor ótimo a pH 7 e, além disso, sobrevive a concentrações elevadas de sal (10% p/v de NaCl) (Gandhi *et al.*, 2006). A sobrevivência a valores de pH baixos e em elevadas concentrações de sal é dependente da temperatura (Ryser & Marth, 2007). Em meio de cultura sólido após 24 h de incubação a 37°C, é possível observar colónias redondas, translúcidas, lisas com um diâmetro de 0,5-1,5 mm apresentando uma cor característica azul esverdeada quando observada sob luz transmitida obliquamente (Liu, 2008). Após 3-7 dias de incubação, as colónias tornam-se maiores com um diâmetro de 3-5 mm e com aparência de ovo estrelado (Liu, 2008). Em meio de cultura suplementado com sangue a 37°C, as colónias são ligeiramente menores e produzem β -hemólise (Gray & Killinger, 1966; Liu, 2008).

A bactéria *L. monocytogenes* é ubíqua, podendo ser isolada da água, solo, produtos alimentares (lacticínios, marisco, carne, ovos e vegetais), animais (fezes de mamíferos, pássaros, peixe, insetos e outros), em humanos e em material vegetal em decomposição. Acredita-se que cerca de 1-5% da população humana seja portadora de *L. monocytogenes* no trato intestinal mantendo-se saudáveis (Murray, 2010; Smith *et al.*, 2013).

Relativamente à classificação serológica, foram identificados treze serovares como 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7 (Jaradat & Bhunia, 2003). Estes são divididos em quatro linhagens através de métodos de tipagem genética (Ward *et al.*, 2008).

1.4.2 Patogénese

A bactéria *L. monocytogenes* é um agente patogénico intracelular facultativo, isto porque é capaz de invadir tanto macrófagos, fibroblastos, hepatócitos e células epiteliais (Miliotis & Bier, 2003; Dewamitta *et al.*, 2010).

Entre os genes virulência responsáveis pela patogenicidade da bactéria *L. monocytogenes* destacam-se os genes *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* e *plcB* que formam um agrupamento de 9 kb denominado LIPI-1 (*Listeria pathogenicity Island 1*). Os genes *inlA*, *inlB* e *iap* também têm um papel importante na virulência, mas não se encontram presentes na LIPI-1 (Ryser & Marth, 2007). No seu conjunto todos são essenciais para uma colonização eficaz do hospedeiro (Bakker *et al.*, 2010).

A sobrevivência intracelular da *L. monocytogenes* depende de vários fatores de virulência. Dentro destes destaca-se a listeriolisina O (LLO), as fosfolipases C, a proteína ActA, o fator PrfA (regulador da expressão dos genes que constituem a LIPI-1), a proteína P60 e as internalinas A e B (Ryser & Marth, 2007).

A infeção pela bactéria *L. monocytogenes* (Figura 1.4.1) ocorre através do processo de fagocitose, no caso de células fagocíticas, como os macrófagos. Para infetar células não-fagocíticas, como as células epiteliais, é necessário que ocorra uma interação entre as bactérias e as células hospedeiras (Freitag *et al.*, 2009). As internalinas A e B, proteínas codificadas pelos genes *inlA* e *inlB* estão presentes na superfície bacteriana, são responsáveis por intermediar a ligação da bactéria com as células não fagocíticas. A internalina A liga-se à proteína E-caderina, proteína que se encontra à superfície das células epiteliais. A internalina B liga-se ao fator de crescimento de hepatócitos (Met) para promover a infeção de hepatócitos (Freitag *et al.*, 2009; Pizarro-Cerdá *et al.*, 2012).

Após a internalização, a bactéria fica inserida no interior de um fagossoma e devido à ação da LLO e das fosfolipases C, dá-se a rutura da membrana do fagossoma libertando a bactéria para o citoplasma permitindo a sua multiplicação (Miliotis & Bier, 2003).

Uma vez presentes no citoplasma, as bactérias procedem à sua multiplicação e imediatamente é induzida a polimerização da actina formando-se filamentos de actina que envolvem a bactéria. Posteriormente, estes filamentos reorganizam-se num dos pólos da bactéria dando origem a uma cauda de actina que é responsável pela sua

movimentação, quer pelo citoplasma da célula hospedeira, quer pela invasão das células vizinhas (Freitag *et al.*, 2009; Ryser & Marth, 2007).

A proteína P60 (60 kDa) é codificada pelo gene *iap*. Esta está envolvida nos processos de adesão e de invasão de células não fagocíticas (Miliotis & Bier, 2003).

O fator PrfA (*positive regulatory factor A*), codificado pelo gene *prfA*, quando se encontra no interior da célula hospedeira é responsável pela expressão dos genes que se encontram na LIPI-1 e de outros genes indicados anteriormente, também responsáveis pela virulência como as internalinas A e B (Freitag *et al.*, 2009).

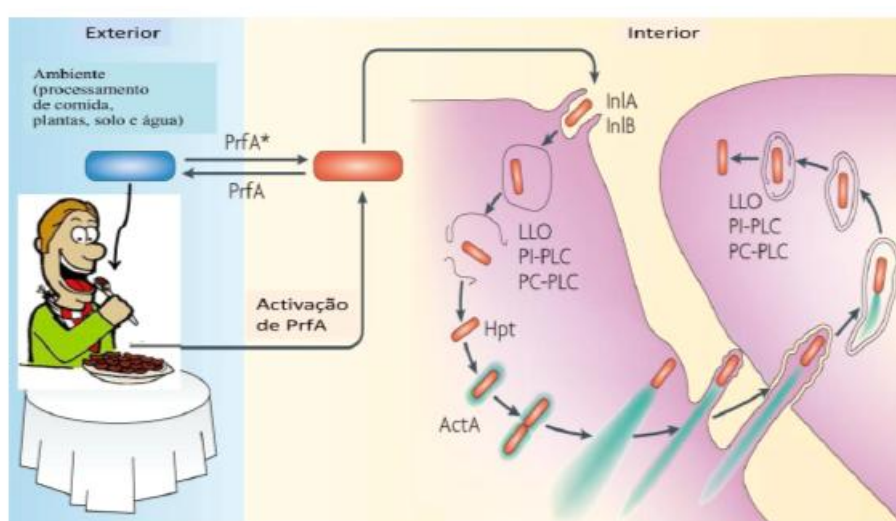


Figura 1.4.1. Mecanismo de infecção da bactéria *Listeria monocytogenes* (Adaptado de Freitag *et al.*, 2009).

1.4.3 A doença listeriose

A bactéria *L. monocytogenes* é uma bactéria intracelular facultativa responsável pela doença de origem alimentar denominada listeriose (Jaradat & Bhunia, 2003). Os casos relatados de listeriose estão associados com o consumo de alimentos crus ou cozinhados contaminados, em que sejam detetados valores elevados, cerca de 100 Unidade Formadoras de Colónias/g (Barbau-Piednoir *et al.*, 2013; Flessa *et al.*, 2005). Esta doença tem uma baixa incidência na Europa (cerca de 1,500 casos por ano), mas está entre as causas mais frequentes de mortes devido ao consumo de alimentos contaminados (Barbau-Piednoir *et al.*, 2013). De entre as 13 serovares, apenas as serovares 1/2a, 1/2b e 4b são responsáveis por aproximadamente 95% dos casos de

listeriose (Smith *et al.*, 2013). A população mais afetada são os recém-nascidos, idosos, mulheres grávidas e imunodepressivos (YOPI – *young, old, pregnant and immunodepressed*) (Barbau-Piednoir *et al.*, 2013). Mas estes respondem de maneiras diferentes, não só devido ao seu estado de saúde como também depende da virulência da estirpe e da dose ingerida (Thévenot *et al.*, 2006).

Após a ingestão de alimentos contaminados, a bactéria consegue ultrapassar diferentes barreiras (Dworkin *et al.*, 2006; Lecuit, 2007). Esta bactéria consegue ultrapassar a barreira intestinal e através dos nódulos linfáticos, consegue infectar o fígado e o baço. Consegue também ultrapassar a barreira hematoencefálica causando assim infecções no sistema nervoso central e, por fim, ultrapassa a barreira placentária originando infecções neonatais e mesmo abortos (Figura 1.4.2) (Dworkin *et al.*, 2006; Lecuit, 2007).

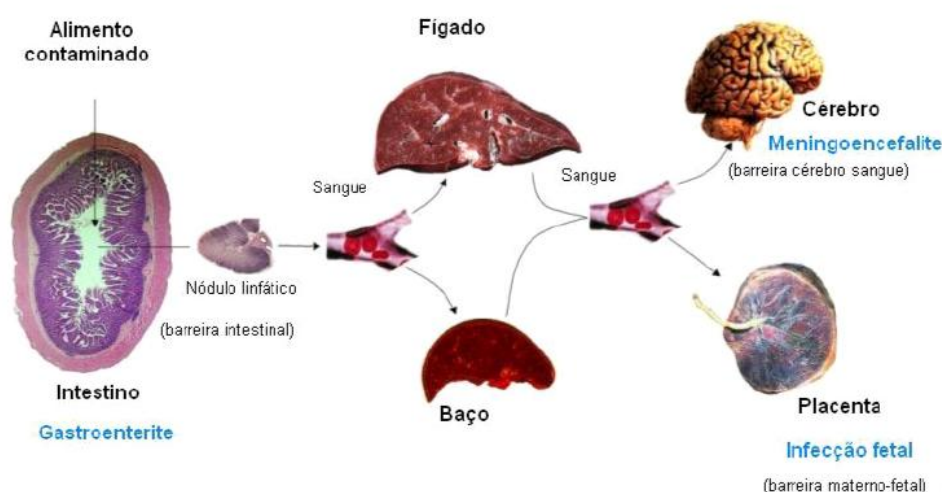


Figura 1.4.2. Representação esquemática de uma infecção causada por *Listeria monocytogenes* (Adaptado de Lecuit, 2007).

1.5 A bactéria *Salmonella enterica* Typhimurium

1.5.1 Características gerais

Tal como a bactéria *L. monocytogenes*, a *Salmonella* Typhimurium é uma bactéria patogénica para os humanos e animais. Foi dado o nome de *Salmonella* ao

gênero em homenagem a Daniel Elmer Salmon em 1885 (Fàbrega & Vila, 2013; Rhen *et al.*, 2007). Este gênero é composto por apenas duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* sendo, esta dividida em seis subespécies (*S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae* e *S. indica*) (Velge *et al.*, 2012; Fàbrega & Vila, 2013). Foram classificados mais de 2.500 serovares pertencentes à espécie *S. enterica*, entre eles, *S. enterica* serovar Thyphi, Choleraesuis, Thyphimurium e Enteritidis (Murray, 2010).

Quanto à sua morfologia, a bactéria *S. Typhimurium* são bacilos Gram-negativos de 1-3 µm de diâmetro. Não forma esporos, é anaeróbia facultativa, catalase positiva e oxidase negativa. Geralmente, move-se através de flagelos peritríquios (Brooks *et al.*, 2010; Adams & Moss, 2008).

Relativamente ao seu crescimento, a temperatura ótima é de 35-37°C, mas suporta temperaturas entre 5-47°C (Pui *et al.*, 2011; Miliotis & Bier, 2003). Quando se atinge temperaturas $\geq 70^\circ\text{C}$ não consegue sobreviver, pois é sensível ao calor (Miliotis & Bier, 2003). Cresce, também, a valores de pH de 4,5-9, mas as condições ótimas são entre 6,5 e 7,5. Quando os valores de pH se encontram abaixo de 4 ou acima de pH 9, a bactéria *S. Typhimurium*, a sua sobrevivência vai decrescendo (Miliotis & Bier, 2003). Cresce facilmente nos meios de cultura convencionais (Miliotis & Bier, 2003) e não necessita da presença de concentrações de sal (NaCl) para crescer, mas consegue crescer com concentrações que varia entre 0,4% e 4% (Pui *et al.*, 2011).

A bactéria *S. Typhimurium* está amplamente distribuída no ambiente sendo considerada uma bactéria ubíqua (Bearson *et al.*, 2006). Pode ser encontrada principalmente no trato intestinal de animais (Dworkin *et al.*, 2006), assim como, nos mais variados produtos alimentares (ovos, laticínios, frutos e vegetais). Resumindo pode ser encontrada em produtos que entrem em contacto com fezes de animais (Berdanier *et al.*, 2008; Pui *et al.*, 2011).

1.5.2 Patogénese

É uma bactéria patogénica facultativa intracelular que sobrevive e se replica em células fagocíticas e não fagocíticas (Jong *et al.*, 2012). Invade neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais (Jong *et al.*, 2012).

Os genes responsáveis pela virulência de *S. Typhimurium* estão localizados em ilhas de patogenicidade (SPI – *Salmonella pathogenicity Island*). Até ao presente foram identificadas cinco SPI (SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5) (Fàbrega & Vila, 2013).

A SPI-1 é uma ilha cromossomal de 40 kb e nesta encontram-se os genes responsáveis pela invasão das células hospedeiras não fagocíticas, nomeadamente os genes *prg*, *org*, *inv* e *spa* que codificam proteínas para o sistema de secreção tipo III (T3SS- *type III secretion system*), os genes *sic* e *sip* que codificam proteínas efectoras, os genes *sipa*, *sipc*, *sopb*, *sope*, *sope2* e as respectivas chaperonas e, também, genes que codificam proteínas reguladoras (Velge *et al.*, 2012; Rhen *et al.*, 2007).

A invasão inicia-se com a adesão da bactéria à superfície da célula hospedeira (células epiteliais) (Figura 1.5.3). Através do sistema T3SS, uma estrutura molecular semelhante a uma agulha que atravessa a membrana da célula hospedeira, as proteínas efectoras são transferidas para o citoplasma da célula hospedeira. A entrada destas proteínas causa um rearranjo do citoesqueleto de actina que resulta na internalização da bactéria através de vacúolos permitindo a sua proliferação (Velge *et al.*, 2012; Fàbrega & Vila, 2013).

A SPI-2 está dividida em dois segmentos, um menor de 14,5 kb e outro maior de 25,3 kb. O segmento menor contém cinco genes *ttr* que se encontram envolvidos na redução de tetrato e sete *Open Reading Frames* (ORFs) com função ainda desconhecida. No segmento maior encontram-se os genes responsáveis pela virulência (*ssa*, *ssr*, *sse* e *ssc*), genes esses que codificam proteínas para o sistema de secreção tipo III (T3SS-2) que se ativa quando a bactéria se encontra no interior da célula hospedeira, dentro de vacúolos. O sistema T3SS-2 transporta proteínas efectoras que permitem a sobrevivência da *Salmonella* no interior de macrófagos e células epiteliais (Fàbrega & Vila, 2013).

A SPI-3 é uma ilha de 34 kb que contém genes que codificam proteínas com funções ainda não conhecidas, mas alguns deles tem responsabilidade na patogenicidade (Rhen *et al.*, 2007). Os genes *mgtB* e *mgtC* são necessários para a infeção sistémica, pela sobrevivência em macrófagos e pelo crescimento em meios com baixas concentrações de Mg^{2+} (Rhen *et al.*, 2007; Fàbrega & Vila, 2013).

A SPI-4 contém seis ORFs que desempenham um papel importante durante a interação com o epitélio intestinal, pois contém genes que codificam proteínas para o sistema de secreção tipo I (Rhen *et al.*, 2007; Fàbrega & Vila, 2013).

Por fim, a SPI-5 de apenas 7,6 kb está envolvida em vários processos de patogenicidade durante a infecção. Mas ainda não existe muita informação acerca da sua função (Rhen *et al.*, 2007).

Outros fatores responsáveis pela virulência de *S. Typhimurium* são os plasmídeos de virulência e os flagelos. Os plasmídeos de virulência estão relacionados com infecções em células do sistema retículo endotelial. Estes possuem um segmento de 7,8 kb onde se encontram os genes *spv*. São estes genes que conferem o fator de virulência aos plasmídeos (Miliotis & Bier, 2003). Os flagelos são estruturas que se encontram à superfície da bactéria que não só conferem mobilidade como, também, são necessário para vários processos de patogenicidade (Fàbrega & Vila, 2013).

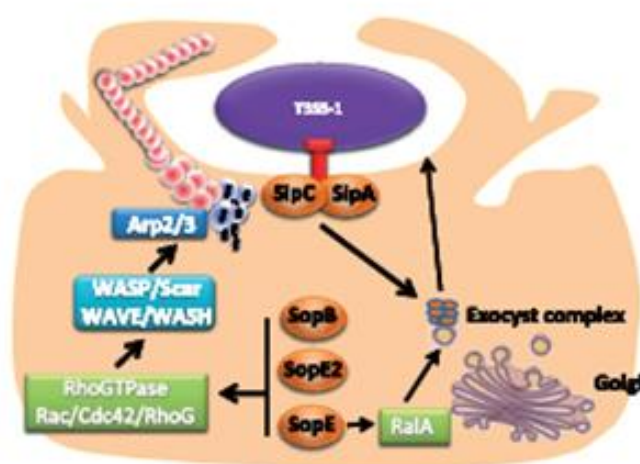


Figura 1.5.3. Mecanismo de infecção da bactéria *Salmonella Typhimurium* (Fonte: Velge *et al.*, 2012).

1.5.3 A doença salmonelose

A bactéria *Salmonella Typhimurium* é uma bactéria patogénica de origem alimentar que causa a doença denominada de salmonelose. Existe duas formas clínicas desta patologia: tifóide e não tifóide. A salmonelose tifóide é provocada pela presença da espécie *S. Typhi* que causa a febre tifóide. Já a bactéria *S. Typhimurium* é causadora da forma clínica não tifóide (Pui *et al.*, 2011; Jong *et al.*, 2012).

A salmonelose é identificada pela presença de sintomas como diarreia, dores abdominais, febre, dores de cabeça, náuseas e vômitos. Estes são causados pela ingestão

de produtos contaminados. Também houve relatos de infecções mais graves como bacterémia e meningite (Wattiau *et al.*, 2011). Em aproximadamente 1-4% de pacientes imunocomprometidos contraem bacterémia e em 5-10% desses mesmos pacientes podem surgir infecções no sistema nervoso central, infecções urinárias e outras complicações (Franklin *et al.*, 2011). O período de incubação desta doença depende da dose administrada (Baron, 1996). O período de incubação para o desenvolvimento de gastroenterites varia de 6 a 72 horas provocando dores abdominais, diarreia, febre (38-39°C), entre outros sintomas. Os sintomas podem durar 2 a 7 dias (Murray, 2010). Os sintomas agravam-se em crianças e em idosos com mais de 60 anos (Miliotis & Bier, 2003).

Após a ingestão (Figura 1.5.4), a bactéria *S. Typhimurium* coloniza o trato gastrointestinal, mais especificamente o cólon e o íleo, invade o epitélio intestinal e multiplica-se (Baron, 1996).

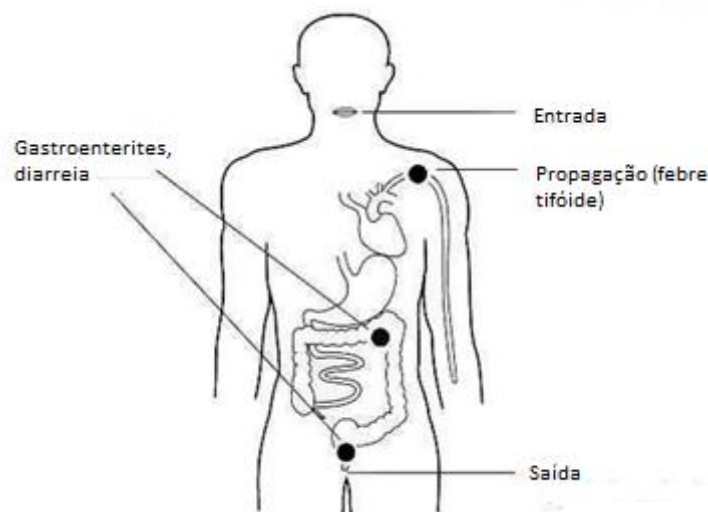


Figura 1.5.4. Representação esquemática de uma infecção causada por *Salmonella Typhimurium* (Adaptado de Baron, 1996).

1.6 Utilização de óleos essenciais no controlo microbiano

Como foi referido, as doenças de origem alimentar são uma preocupação, quer para as indústrias alimentares quer para a população devido às consequências para a saúde dos consumidores e respetivas perdas nas indústrias. Têm sido aplicadas várias estratégias para resolver este problema, mas o controlo microbiano é uma tarefa muito

complexa devido à capacidade dos microrganismos ultrapassarem as várias barreiras que são utilizadas durante o processamento dos alimentos (Lee, 2004; Kalia & Parshad, 2013) e desenvolverem resistência aos diferentes agentes desinfetantes (Divergiliis *et al.*, 2011; Canizalez-Roman *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Então têm sido feitos vários estudos com o objetivo de encontrar agentes antimicrobianos eficazes contra diversos agentes patogênicos e que sejam seguros para a saúde humana principalmente quando utilizados na conservação de alimentos. A utilização de óleos essenciais é uma das estratégias que têm sido estudadas (Sánchez-González *et al.*, 2011; Faleiro, 2011; Hyldgaard *et al.*, 2012; Antunes & Cavaco, 2010).

Os óleos essenciais (OEs), também designados óleos voláteis, são óleos naturais extraídos das plantas que são compostos por substâncias voláteis aromáticas (Bassolé & Juliani, 2012; Burt, 2004). A maioria encontra-se no estado líquido à temperatura ambiente e podem apresentar coloração (Bassolé & Juliani, 2012). Podem ser isolados a partir de todo o material da planta tal como as flores, rebentos, sementes, folhas, frutos, ramos e raízes e encontram-se armazenados nas células secretoras, cavidade, canais, células epidérmicas e tricomas glandulares (Bassolé & Juliani, 2012; Burt, 2004). Os OEs podem ser extraídos através de diferentes técnicas. Técnicas como destilação a vapor, extração por solventes, extração por fluido supercrítico, entre outros (Bassolé & Juliani, 2012).

O termo óleo essencial foi usado pela primeira vez no século XVI pelo médico Paracelsus von Hohenheim quando se referia ao componente eficaz da droga designada *Quinta essentia* (Burt, 2004).

Atualmente são conhecidos 3000 óleos dos quais 300 são utilizados comercialmente. Os OEs são utilizados em diferentes áreas, como na medicina, perfumaria, cosmética e indústria alimentar (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Os óleos essenciais são compostos por uma mistura complexa de moléculas voláteis de baixo peso molecular. Os principais compostos são os terpenóides/terpenos e constituintes alifáticos e aromáticos (Faleiro, 2011). Esta mistura de compostos voláteis é reconhecida pelas suas propriedades antimicrobianas, antiparasitas, inseticidas, antivirais e antioxidantes (Hyldgaard *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2013).

Apesar das várias vantagens, também são reconhecidas algumas limitações. Os OEs podem alterar as propriedades dos alimentos (sabor e aroma) devido ao seu intenso aroma (Espina *et al.*, 2012; Sánchez-González *et al.*, 2011). O aroma depende da composição do óleo que, por sua vez, pode ser influenciada por outros fatores como o

material da planta (folha, fruto, caule ou raiz), altura do ano, origem e o método de extração (Teixeira *et al.*, 2013).

Foi relatado que OEs ricos em aldeídos e fenóis como o cinamaldeído, citral, carvacrol, eugenol e timol demonstraram uma maior atividade antimicrobiana (Bassolé & Juliani, 2012). Estes componentes apresentam um maior efeito contra as bactérias Gram-positivas, pois as bactérias Gram-negativas contêm lipopolisacarídeos hidrofílicos na membrana externa que cria uma barreira contra macromoléculas e compostos hidrofóbicos (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Existem vários estudos que mostram que os óleos essenciais têm uma ação antimicrobiana contra várias bactérias patogênicas (Apolónio *et al.*, 2014; Saddiq & Khayyat, 2010; Lang & Buchbauer, 2012; Espina *et al.*, 2012; Devi *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2013; Burt, 2004). Mas a suscetibilidade das bactérias aos OEs aumenta com a diminuição do pH dos alimentos, temperatura de armazenamento e da quantidade de oxigênio presente na embalagem (Tassou *et al.*, 1995; Tassou *et al.*, 1996; Skandamis & Nychas, 2001; Tsigarida *et al.*, 2000; Espina *et al.*, 2012). Os óleos α -terpeniol, carvacrol, citral, eugenol, geraniol e o timol mostraram-se ser bastantes eficazes na eliminação das principais bactérias patogênicas encontradas nos alimentos, como *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *E. coli* (Burt, 2004).

1.6.1 Eugenol

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é o componente encontrado, em maior concentração, no óleo do cravo-da-índia (Ito *et al.*, 2005; Burt, 2004). Além disso, pode ser isolado de folhas de louro e de pimenta da Jamaica (Ito *et al.*, 2005). O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) é cultivado em países como Madagáscar, Sri Lanka, Indonésia e no sul da China. Esta é uma especiaria de aroma muito forte e com um sabor característico sendo, assim, muito frequente a sua utilização em culinária. Para além disso, é muito utilizado como antifúngico, anticancerígeno, antialérgico, anti-inflamatório e, também, como analgésico (Hemaiswarya & Doble, 2009; Bachiega *et al.*, 2012). O óleo essencial é extraído a partir do botão floral seco que contém eugenol, β -cariofileno, acetato de eugenilo e α -humuleno (Moon *et al.*, 2011). As propriedades conferidas pelo cravo-da-índia devem-se à elevada concentração de eugenol presente.

Este aspeto foi validado por vários estudos que demonstraram as propriedades biológicas do eugenol (Bachiega *et al.*, 2012; Burt, 2004). É devido a estas propriedades sem provocar efeitos citotóxicos que o eugenol é considerado inócuo, ou seja, GRAS (*Generally Recognised as Safe*) (Hemaiswarya & Doble, 2009). Recentemente, foi descrito que a aplicação em modo contínuo não provocou a aquisição de resistência a diferentes antibióticos ou a si próprio nas bactérias *Staphylococcus aureus* e *L. monocytogenes*, o que reforça a segurança na utilização deste óleo (Apolónio *et al.*, 2014)

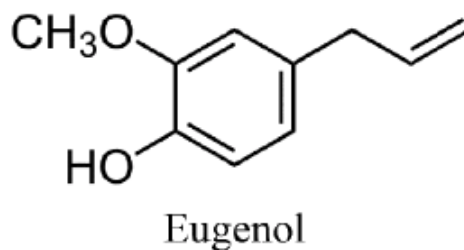


Figura 1.6.5. Estrutura química do Eugenol.

Estudos prévios sugeriram que o modo de ação antibacteriana do eugenol seria por rutura da membrana citoplasmática aumentando, assim, a permeabilidade não específica. Estudos mais recentes revelaram que o eugenol previne a ação enzimática das bactérias (Devi *et al.*, 2010). Pensa-se que o grupo hidroxilo do eugenol liga-se às proteínas alterando as suas propriedades. Isto contribui para o efeito inibitório do eugenol em concentrações bactericidas. Inibe a ATPase, histidina descarboxilase, amílase e protease, contribuindo para a lise celular (Gill & Holley, 2006; Wendakoon & Morihiko, 1995).

No estudo de Apolónio *et al.*, (2014), o eugenol para além da atividade inibitória contra as bactérias *L. monocytogenes* e *S. aureus* também inibiu a formação de biofilme.

Relativamente às bactérias Gram-negativas, estas têm-se demonstrado menos suscetíveis aos óleos essenciais (Trombetta *et al.*, 2005). No estudo de Nazer *et al.*, (2005) foram testados nove agentes antimicrobianos, diferentes entre eles, onde foram incluídos óleos essenciais (timol, carvacrol, citral, eugenol, geraniol), os outros compostos foram o ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico e ácido piropolifósforico.

Os resultados obtidos mostraram que os óleos timol, carvacrol, cital, eugenol e geraniol foram eficazes na inibição do crescimento da bactéria *S. Typhimurium*. Os óleos timol e carvacrol foram que obtiveram melhores resultados quando testados individualmente. Os restantes, quando combinados entre si foram mais eficazes (Nazer *et al.*, 2005).

1.6.2 Citral

O citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) é um aldeído monoterpeneo insaturado acíclico presente nas folhas e frutos de várias plantas tais como árvore de mirtilos, manjerição africano, limoeiro, limeira, laranjeira. Encontra-se também presente na espécie *Cymbopogon citratus* (Somolinos *et al.*, 2010).

O *Cymbopogon citratus* em Portugal conhecida como erva-príncipe, a sua popularidade deve-se ao facto das suas infusões serem utilizadas muito frequentemente como antiespasmódico, analgésico, anti-inflamatório, antimicrobiano, antifúngico, antipirético, diurético e sedativo. O óleo obtido das folhas frescas é usado na indústria de perfumes, cosmética e na medicina tradicional para vários fins (Saddiq & Khayyat, 2010; Somolinos *et al.*, 2010).

O composto principal presente no óleo essencial de *Cymbopogon citratus* é o citral, o que corresponde cerca de 65-85%, os outros compostos presentes em menor quantidade são o geraniol, geranilacetato e mirceno (Saddiq & Khayyat, 2010).

O citral é uma mistura de dois isómeros de aldeídos monoterpeneos acíclicos, o geraniol (trans-citral, citral A) e neral (cis-trans, citral B). São estes compostos que conferem o forte aroma a limão. O citral é um produto de interesse devido ao forte odor (Somolinos *et al.*, 2010).

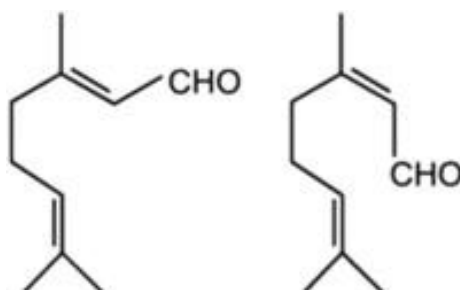


Figura 1.6.6. Estrutura química do citral. 1) geraniol, 2) neral.

Tem sido referido a ação antibacteriana do citral contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, assim como fungos. Esta propriedade, assim como anti-inflamatórias têm sido comprovadas através de vários estudos realizados (Somolinos *et al.*, 2010).

No estudo de Somolinos *et al.*, (2010) foi observada a atividade antibacteriana do citral contra a bactéria *E. coli*. Esta ação foi dependente do valor de pH, tendo-se registado uma resistência maior por parte das células que se encontravam a valores de pH 4, em comparação com as que se encontravam a pH 7. O mecanismo inibitório do citral foi associado a danos causados às membranas externa e citoplasmática das células de *E. coli*.

No estudo de Saddiq & Khayat, (2010) foram comprovadas as propriedades antibacterianas e antifúngicas quando testada a eficácia do citral contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (MRSA) e contra os fungos *Penicillium italicum* e *Rhizopus stolonifer*.

O facto de possuir uma vasta gama de propriedades e, também, por ser um aditivo alimentar natural, o citral foi reconhecido como um produto seguro (GRAS), foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e foi registado pela Comissão Europeia como aromatizante de produtos alimentares, pois a sua utilização não apresenta qualquer risco para a sua saúde do consumidor (Somolinos *et al.*, 2010). No estudo de Apolónio *et al.*, (2014), o citral do mesmo modo que o eugenol não induziu a resistência aos antibióticos e inibiu a formação de biofilme em *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

1.7 Objetivos

O presente estudo teve como principal objetivo a avaliação do impacto da adição de eugenol e citral em películas edíveis no controlo de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* em maçãs. A sobrevivência de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* em maçãs cobertas com películas edíveis suplementadas com eugenol e citral em condições de simulação do sistema gastrointestinal constituiu o segundo objetivo deste estudo.

Capítulo II - Materiais e Métodos

2.1 Material

2.1.1 Equipamentos

- Agitador com aquecimento Rotabit (J.P. Selecta, Espanha);
- Agitador magnético com aquecimento Agimatic-E (Selecta, Espanha);
- Autoclave Uniclave88 – 44x60 (AJC, Lisboa, Portugal);
- Balança analítica XS-410 (Fisher Scientific, USA);
- Balança analítica AE 200 (Mettler, Suíça);
- Banho-maria SW 22 (Julabo, Alemanha);
- Câmara de Fluxo laminar Bio48 (Faster, Itália);
- Câmara frigorífica (Centauro, Portugal);
- Centrifugadora refrigerada – Mikro 22R (Hettich, Reino Unido);
- Coluna Purospher® Star RP-18 Endcapped (Millipore);
- Congelador ultra low temperature freezer -80°C U725 (Innova New Brunswick Scientific, EUA);
- Detetor L-2455 Diode Array, Lachrom Elite (Hitachi);
- Espectrofotómetro Novaspec®II (Amersham Pharmacia Biotech, Espanha);
- Espectrofotómetro UV – 160 A (Shimadzu, Brasil);
- Citometria de Fluxo FACS Calibur (BD Bioscience);
- HPLC Lachrom Elite (Hitachi);
- Incubadora 37°C (Binder, EUA);
- Incubadora Raypa, 30°C (Selecta, Espanha);
- Leitor de microplacas Tecan Infinite M200 (Tecan, Suíça);
- Medidor de pH GLP 21 (Crison, Espanha);
- Stomacher (IUL Instruments);
- Ultra Turrax T18 digital (IKA, Germany);
- Vortex ZX3 (VELP Scientifica, Europa);
- Vortex/Centrifugadora PCV-2400 (Grant bio, Inglaterra).

2.1.2 Meios de cultura

- Água peptonada tamponada (Biokar, Espanha). Preparado de acordo com as instruções do fabricante;
- Água peptonada (Oxoid, Reino Unido). Preparado de acordo com as instruções do fabricante;
- TSA (*Trypticase Soy Agar*). Preparado de acordo com as instruções do fabricante, com adição de 1,5% (p/v) de agar (VWR, EUA);
- TSB (*Trypticase Soy Broth*, Oxoid, Reino Unido). Preparado de acordo com as instruções do fabricante.

2.1.3 Soluções

As soluções de simulação do sistema gastrointestinal foram utilizadas de acordo com o descrito em Versantvoort *et al.*, (2005) e Melo *et al.*, (2013).

- Suco de saliva:

KCl (89,6 g/L), KSCN (20 g/L); NaH₂PO₄ (88,8 g/L); Na₂SO₄ (57 g/L); NaCl (175,3 g/L); NaHCO₃ (84,7 g/L); Ureia (25 g/L); α -amilase (0,1 mL/50 mL); ácido úrico (1,5 mg/50 mL); mucina (2,5 mg/50 mL). O valor de pH foi de $8,13 \pm 0,36$.

- Suco gástrico:

NaCl (175,3 g/L); NaH₂PO₄ (88,8 g/L); KCl (89,6 g/L); CaCl₂.2H₂O (22,2 g/L); NH₄Cl (30,6 g/L); HCl (0,09 mL/60 mL, 37% g/g); Glicose (65 g/L); Ácido glucurónico (2 g/L); Ureia (25 g/L); Hidroclorato de glucosamina (33 g/L); BSA (0,12 g/60 mL); Pepsina (0,3 g/60 mL); Mucina (30 mL/60 mL, 12 g/L). O valor de pH foi de $2,51 \pm 0,07$. Na preparação da solução com um valor um valor de pH mais baixo ($1,47 \pm 0,07$) foi adicionado 0,2 mL/60 mL, 37% g/g de HCl.

- Suco intestinal:

NaCl (175,3 g/L); NaHCO₃ (84,7 g/L); K₂H₂PO₄ (8 g/L); KCl (89,6 g/L); MgCl₂ (5 g/L); HCl (0,0108 mL/30 mL, 37% g/g); Ureia (25 g/L); CaCl₂.2H₂O (22,2 g/L); BSA

(0,06 g/30 mL); Pancreatina (0,54 g/30 mL); Lipase (0,09 g/30 mL). O valor de pH foi de $7,85 \pm 0,04$.

- **Bílis:**

NaCl (175,3 g/L); NaHCO₃ (84,7 g/L); KCl (89,6 g/L); HCl (0,006 mL/20 mL, 37% g/g); Ureia (25 g/L); CaCl₂·2H₂O (22,2 g/L); BSA (0,072 g/20 mL); Bílis de porco (0,6g/20 mL); Bílis de bovino (0,6 g/20 mL). O valor de pH foi de $9,02 \pm 0,01$.

2.1.4 Material biológico

2.1.4.1 Óleos essenciais

Neste estudo foram utilizados dois óleos essenciais, eugenol (99%, Fluka) e citral (95%, Sigma-Aldrich).

2.1.4.2 Maçãs

Foram adquiridas duas cultivares de maçã. A maçã ‘Bravo de Esmolfe’ foi obtida de um distribuidor. A maçã ‘Golden Delicious’ foi adquirida num supermercado local. A conservação das maçãs decorreu a 0°C. Em ambos os casos as maçãs foram conservadas durante 4-6 meses a 0,5°C e estavam no estado ótimo para consumo aquando da sua utilização nos ensaios.

2.1.4.3 Bactérias

Tabela 2.1.1. Origem das bactérias utilizadas no estudo.

Bactéria	Origem	Fonte
<i>Listeria monocytogenes</i> 12.04 (serovar 1/2b)	Salada	Centre National de Référence des Listeria, Institut Pasteur, Paris, França
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	Tecido animal (coração e fígado de frango, 4 semanas de idade)	American Type Culture Collection, EUA

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação do inóculo bacteriano

As bactérias *L. monocytogenes* 12.04 e *S. Typhimurium* ATCC 14028 foram recuperadas da conservação a -80°C em meio de cultura *Tryptic Soy Agar* (TSA) com uma incubação durante 24 h incubada a 30°C . Para a preparação do pré-inóculo, foi utilizada uma ansada do crescimento bacteriano em meio TSA que foi transferida para 10 mL de TSB (*Tryptic Soy Broth*). A incubação decorreu em banho-maria com agitação (120 rpm) durante 18 h a 30°C . Da cultura anterior, 1 mL foi transferido para 9 mL do meio TSB. A incubação decorreu igualmente em banho-maria com agitação (120 rpm) a 30°C até atingir a $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.3 - 0.4$.

Para determinar a viabilidade bacteriano do inóculo, foram preparadas seis diluições seriadas da suspensão bacteriana em água peptonada, sendo inoculadas em placas de TSA pelo método Miles & Misra (1938). A incubação decorreu a 30°C durante 24 h. As determinações foram realizadas em triplicado. Os valores obtidos foram entre 10^8 e 10^9 UFC/mL.

2.2.2 Maçãs

As maçãs utilizadas nos ensaios foram selecionadas, não contendo qualquer dano. A desinfecção da superfície de cada maçã foi efetuada com etanol a 70% no interior de uma câmara de fluxo laminar. As maçãs desinfetadas foram deixadas a secar na câmara de fluxo laminar.

Depois de secas, procedeu-se ao corte com facas estéreis sendo cada metade colocada numa placa de Petri de vidro com a face virada para baixo. Na parte superior, numa área de 3x3 cm (Figura 2.2.7), foram distribuídos 100 μ L de inóculo (equivalente a 10^8 Log₁₀ UFC/mL). A secagem do inóculo decorreu na câmara de fluxo laminar durante 30 min. A incubação das maçãs decorreu a 20°C e as amostragens foram realizadas ao fim de colocadas durante 24 h, 48 h, 72 h, e 7 dias.

Para determinar a sobrevivência bacteriana ao longo da incubação, foram pesadas 10g de maçã num saco estéril do homogenizador (Stomacher) ao qual foi adicionado 90 mL de água peptonada. A amostra foi homogeneizada durante 30 segundos. Foram preparadas seis diluições decimais e a partir delas a viabilidade foi determinada pelo método Miles & Misra (1938). As determinações foram realizadas em triplicado.

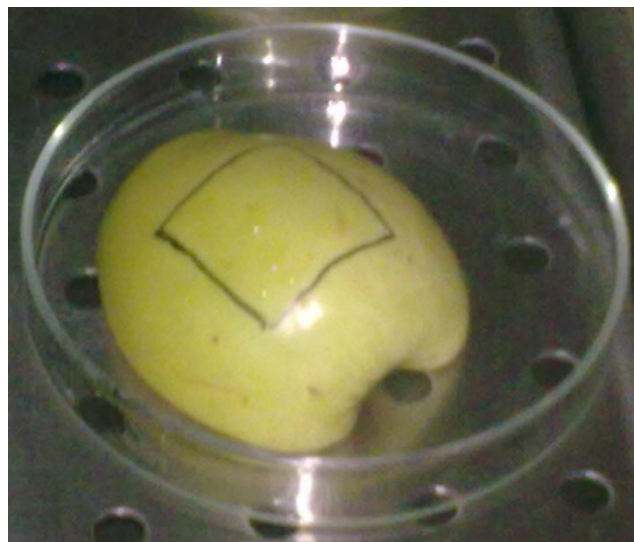


Figura 2.2.7. Ilustração da zona de inoculação da maçã 'Bravo de Esmolfe' (3x3 cm).

2.2.3 Películas edíveis

2.2.3.1 Preparação das películas edíveis

Neste estudo utilizaram-se películas edíveis à base de alginato de sódio (Sigma-Aldrich), sendo em concentração testada de 2%.

As películas edíveis são compostas por, para além do alginato de sódio, glicerol (1% v/v) e pelos óleos essenciais.

A sua preparação foi efetuada adicionando, em primeiro lugar, o glicerol (Fisher Chemical) juntamente com o(s) óleo(s) essencial(s) e metade do volume de água destilada. O alginato de sódio foi solubilizado nessa mistura através do Ultra Turrax, sendo adicionado lentamente para evitar a formação de grumos. Ao mesmo tempo que se adicionou o alginato de sódio foi adicionado o restante volume de água destilada. A agitação foi mantida durante alguns minutos até se obter uma mistura uniforme. A velocidade da agitação é aumentada conforme a consistência da mistura.

As películas edíveis preparadas foram (1) Película de alginato de sódio (2%) com 0,1% (v/v) eugenol; (2) Película de alginato de sódio (2%) com 0,2% (v/v) eugenol; (3) Película de alginato de sódio (2%) com 0,1% (v/v) eugenol e 0,15% (v/v) citral e (4) Película de alginato de sódio (2%).

O procedimento foi realizado à temperatura ambiente.

2.2.3.2 Aplicação de películas edíveis

As maçãs, sem qualquer dano, foram desinfetadas com etanol a 70% e deixadas a secar na câmara de fluxo laminar. Estas foram cortadas e divididas em fatias.

Cada fatia foi colocada numa placa de Petri de vidro e inoculada com 10 µL (equivalente a 10^9 Log₁₀ UFC/mL) do inóculo bacteriano numa área de 1x1 cm. Logo, após à inoculação procedeu-se à aplicação das películas edíveis. Este passo foi realizado com rapidez devido à rápida oxidação da maçã. O método utilizado para a aplicação das películas foi por imersão.

A fatia da maçã foi imersa, em primeiro lugar, na solução de ácido ascórbico (Fisher Chemical) durante 1 min. Este composto foi utilizado com o objetivo de reduzir o processo de oxidação. Em seguida, foi imersa na película edível durante 2 min e por

fim, foi colocada em cloreto de cálcio (Panreac) durante 1 min, o que ajuda a fixar a película e a manter a firmeza da maçã cortada. O fruto é mantido por mais tempo na película para garantir que se encontra uniformemente aplicada.

A incubação das maçãs inoculadas e cobertas com as películas decorreu a 4°C. As amostragens foram realizadas ao fim de 24 h, 48 h e 72 h.

A determinação da viabilidade foi realizada como descrito acima (ponto 2.2.1). Foram testadas as cultivares de maçã ‘Bravo de Esmolfe’ e ‘Golden Delicious’.

Apenas as películas edíveis de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol, alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral e alginato de sódio (2%) foram testadas na cultivar ‘Golden Delicious’. Relativamente à cultivar ‘Bravo de Esmolfe’, todas as películas utilizadas neste estudo foram testadas nesta cultivar.

As maçãs sem qualquer tratamento constituíram o controlo. Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.2.4 Medição do pH das maçãs

O pH das duas cultivares (‘Bravo de Esmolfe’ e ‘Golden Delicious’) foi determinado para verificar se este poderia influenciar o crescimento bacteriano, pois o valor de pH é um dos fatores que influencia o crescimento das bactérias.

Para isso, foram utilizadas cerca de cinco maçãs de cada cultivar. O pH pode variar entre a mesma cultivar.

Foram selecionadas as maçãs, sem qualquer dano. As cinco maçãs foram cortadas em pedaços, sem pele e caroços e, por fim, trituradas. Seguiu-se a filtração da polpa em tecido de gaze, obtendo-se apenas o sumo e, assim, procedeu-se à medição do pH (GLP 21 Crison, Espanha). As medições foram realizadas em triplicado.

2.2.5 Simulação das condições do trato gastrointestinal

Nos ensaios de avaliação do impacto das películas edíveis suplementadas com eugenol e citral na sobrevivência de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* em maçãs durante a exposição a um processo de simulação dos sistema gastrointestinal,

foram testadas as películas com (0,2% de eugenol) e (0,1% de eugenol e 0,15% de citral). O modo de aplicação foi idêntico ao descrito acima (ponto 2.2.3.2). Neste procedimento, as fatias de maçã inoculadas e cobertas com as películas foram mantidas a 4°C durante 24 h antes da exposição aos sucos gastrointestinais.

A simulação das condições do trato gastrointestinal foi executada como descrito por Versantvoort *et al.*, (2005) e Melo *et al.*, (2013). A preparação da saliva e do suco gástrico foi efetuada no dia anterior e mantidas a 37°C enquanto que o suco intestinal e a solução de bÍlis foram preparados no dia de realização do ensaio mantidos a 37°C até à sua utilização.

Foram pesadas 10g de cada fatia de maçã, num saco estéril de Stomacher ao qual foram adicionados 6 mL de saliva. A amostra foi homogeneizada no Stomacher durante 30 segundos. A incubação decorreu durante 5 min a 37°C com agitação (60 rpm). Ao fim deste intervalo, foram adicionados 12 mL de suco gástrico, sendo muito bem homogeneizado e procedeu-se a uma incubação a 37°C durante 2 h com uma leve agitação (60 rpm). De seguida, foram adicionados 12 mL de suco intestinal, 6 mL de bÍlis e 2 mL de NaHCO₃ (84,7 g/L). A incubação decorreu a 37°C durante 2h com agitação (60 rpm). A viabilidade bacteriana foi determinada no final da exposição à saliva, durante a exposição ao suco gástrico e suco intestinal ao fim de 1 e 2 h. A determinação foi através do método Miles & Misra (1938). Os ensaios foram realizados em triplicado utilizando as maçãs ‘Bravo de Esmolfe’.

2.2.6 Avaliação da atividade antioxidante

As maçãs têm sido incluídas, cada vez mais, na alimentação da população devido aos seus benefícios. O seu maior benefício é a elevada quantidade de compostos antioxidantes presentes no fruto. Com base neste facto, procedeu-se à avaliação desta capacidade antioxidante quando a maçã foi exposta à simulação do sistema gastrointestinal.

Este procedimento foi realizado no laboratório de Pós-Colheita da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve.

2.2.6.1 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

Este método baseia-se na formação do radical $ABTS^{•+}$ (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). A adição de substâncias antioxidantes promove a formação deste radical, o que origina uma redução da cor da solução de ABTS com persulfato de potássio. A intensidade obtida é correlacionada com a intensidade gerada pelo padrão Trolox.

De modo a determinar a atividade antioxidante, o método TEAC foi realizado conforme descrito por Re *et al.*, (1999).

Foi preparada uma solução em que se misturou, em partes iguais, as soluções ABTS (3,8 g/L) e a solução de persulfato de potássio (0,662 g/L). A reação da mistura decorreu por 12 a 16 h, à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após a conclusão da reação, obtendo-se o radical $ABTS^{•+}$ foi adicionado o etanol a 96% (uma diluição de 1/60, aproximadamente) até se obter uma leitura de absorvência de 0,700-0,800 a 735 nm. A mistura foi mantida no escuro até à sua utilização.

A determinação da absorvência das amostras numa microplaca de 96 poços (Greiner) colocando em cada poço 198 μ L da solução ABTS. A leitura da solução ABTS foi realizada a 735 nm ao fim de 6 minutos de reação. De seguida foram adicionados 2 μ L de cada amostra tendo o cuidado de homogeneizar bem a mistura. Ao fim de 6 min procedeu-se a uma nova leitura ao mesmo comprimento de onda. Como padrão utilizou-se uma solução de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico). Este foi utilizado para a construção da curva padrão (Figura 2.2.8).

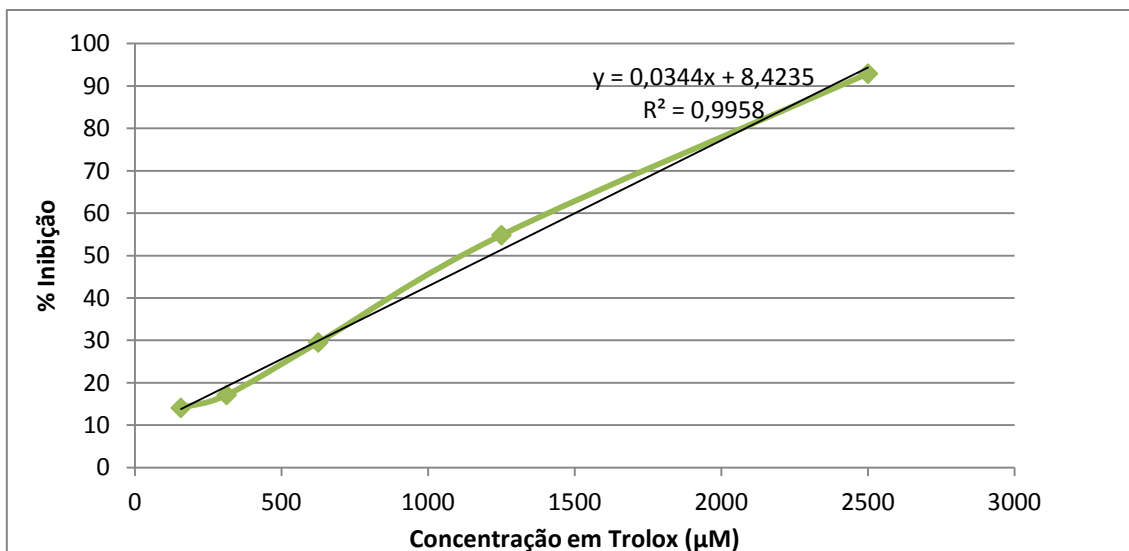


Figura 2.2.8. Curva padrão Trolox e a respetiva equação, utilizada para determinar a atividade antioxidante através do método TEAC.

A atividade antioxidante de cada amostra foi calculada através da seguinte equação (Guerreiro *et al.*, 2013):

$$\frac{(\text{Absorvância do controlo} - \text{Absorvância da amostra})}{\text{Absorvância do controlo}} \times 100$$

2.2.6.2 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

A determinação da atividade antioxidante pelo método ORAC baseia-se na capacidade da amostra, a analisar, em eliminar os radicais peróxido. Este método utiliza a fluoresceína como sonda fluorescente e foi descrito por Ou *et al.*, (2001).

O método ORAC é bastante sensível e por isso as amostras são diluídas com uma solução tampão fosfato (75 mM).

Numa microplaca de fundo preto de 96 poços (Greiner) foram adicionados a cada poço 50 µL do tampão fosfato, 150 µL de fluoresceína (mistura controlo). A mistura foi colocada a 37°C. Findo este intervalo adicionou-se 25 µL de ABAP (2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) dihidroclorato). Para a leitura das amostras, a cada poço foi adicionado 150 µL de fluoresceína e 25 µL das amostras. A incubação da

mistura decorreu a 37°C durante 10 min. Após os 10 min, foram adicionados 25 µL de ABAP. A fluorescência foi determinada com um comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 528 nm durante 90 min cada.

Os valores obtidos foram calculados utilizando a reta de calibração entre a concentração de Trolox e o AUC (*net area under the curve*) (Figura 2.2.9).

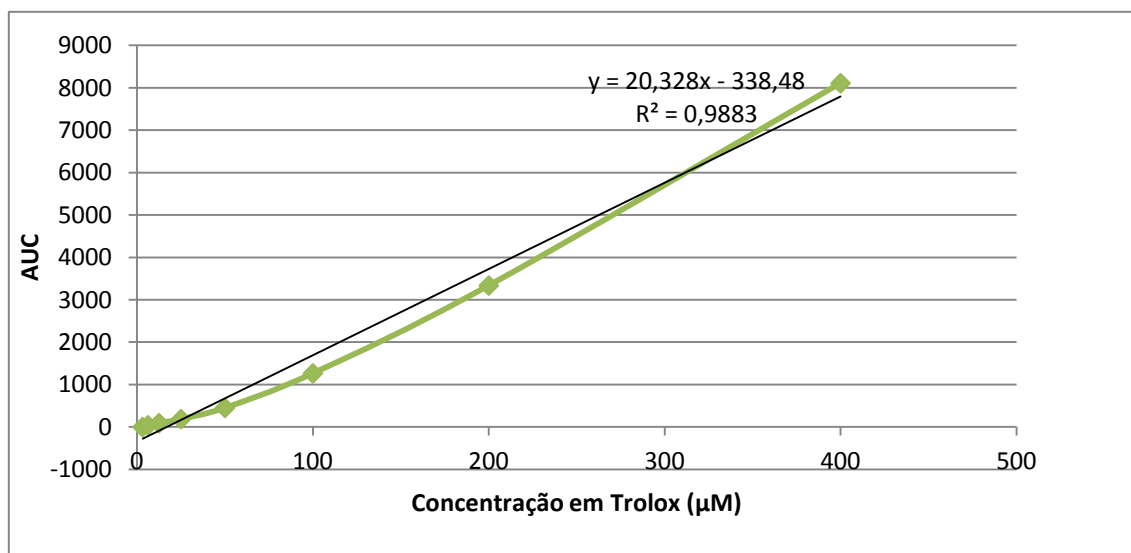


Figura 2.2.9. Curva padrão Trolox com a respetiva equação, utilizada para determinar a atividade antioxidante através do método ORAC.

Os valores obtidos foram calculados de acordo com o descrito por Huang *et al.*, (2002).

O AUC foi calculado pela seguinte equação:

$$AUC = 0,5 + \frac{f1}{f0} + \dots + \frac{fi}{f0} + \dots + \frac{f34}{f0} + 0,5\left(\frac{f35}{f0}\right)$$

A atividade antioxidante foi calculada através da seguinte equação:

$$\left(\frac{AUC_{amostra} - AUC_{branco}}{AUC_{Trolox} - AUC_{branco}}\right) \times \left(\frac{\text{concentração de Trolox}}{\text{concentração da amostra}}\right)$$

2.2.7 Determinação de ácidos orgânicos das maçãs por High-performance liquid chromatography (HPLC)

O HPLC foi realizado com o objetivo de determinar a composição de ácidos orgânicos das duas cultivares de maçãs ('Bravo de Esmolfe' e 'Golden Delicious').

Foram pesadas 5 g de polpa obtidas a partir de cinco maçãs, sem pele nem caroços. As amostras foram liofilizadas. Após a desidratação dos pedaços de maçã, estes foram imediatamente armazenados a -80°C.

Para análise dos ácidos orgânicos foi necessário pesar 50 mg \pm 0,5 mg aos quais se adicionou 3 mL de água milli-Q e a mistura foi bem homogeneizada e permitido um repouso de 5 min que depois de nova agitação foi realizada uma filtração utilizando filtro de 0,2 μ m, com a recolha do filtrado diretamente para o tubo de análise.

O estudo foi realizado no laboratório de Pós-Colheita da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve.

2.2.8 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa informático SPSS Statistics versão 22.0. Para determinar se as diferenças encontradas, entre as películas edíveis no controlo do desenvolvimento das bactérias patogénicas *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*, eram estatisticamente significativas recorreu-se ao teste estatístico One-Way ANOVA, com aplicação do teste de Tukey. O nível de significância foi de 95% ($P < 0,05$).

Capítulo III - Resultados e Discussão

3.1 Características da maçã

A composição de ácidos orgânicos foi determinada por HPLC. Apenas foram detetados os ácidos oxálico e málico.

Na Tabela 3.1.2., estão indicadas as quantidades dos ácidos oxálico e málico nas maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ e ‘Golden Delicious’. As maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ apresentam, em maior concentração, o ácido oxálico, enquanto a maçã ‘Golden Delicious’ é o ácido málico que está em maior concentração.

Estas cultivares de maçãs apresentam uma composição diferente uma da outra, o que pode influenciar o desenvolvimento das bactérias.

Tabela 3.1.2. Concentração dos ácidos orgânicos determinados por HPLC de amostras de maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ e ‘Golden Delicious’.

	pKa*	Maçã ‘Bravo de Esmolfe’	Maçã ‘Golden Delicious’
Ácido Oxálico (g/100g Ps)	pK ₁ = 1,04 pK ₂ = 3,82	189,41 ± 60,01	158,76 ± 21,31
Ácido Málico (g/100g Ps)	pK ₁ = 3,24 pK ₂ = 4,71	161,59 ± 0,44	387,70 ± 187,21

Os valores representam a média do valor de três determinações ± desvio padrão. PS- Peso seco. *De acordo com Bhattacharyya & Rohrer, 2012.

O valor de pH tem uma influência muito significativa na sobrevivência bacteriana (Faleiro, 2012), pelo que o seu valor foi determinado nas maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ e ‘Golden Delicious’ (Tabela 3.1.3.).

Tabela 3.1.3. Valores de pH das duas cultivares de maçãs analisadas.

Cultivar	pH*
‘Bravo de Esmolfe’	4,25 ± 0,06
‘Golden Delicious’	4,97 ± 0,04

*Os valores resultam da média de três determinações ± desvio padrão.

Qualquer uma das cultivares apresentou um perfil ácido (pH < 5). Contudo, a cultivar ‘Bravo de Esmolfe’ apresenta-se mais ácida que a ‘Golden Delicious’.

3.2 Sobrevivência da bactéria *Listeria monocytogenes* 12.04 e da *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ conservadas a 20°C

A maçã ‘Bravo de Esmolfe’ é uma cultivar nacional bastante apreciada pela população portuguesa. Por esta razão, é importante avaliar o desenvolvimento de bactérias patogénicas nesta cultivar de modo a salvaguardar a saúde humana. Que seja do nosso conhecimento até ao presente, não existe informação sobre a contaminação e capacidade de sobrevivência destas bactérias neste fruto.

A avaliação da sobrevivência das bactérias *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ foi realizada a 20°C, de modo a simular as condições de comercialização.

A sobrevivência da estirpe *L. monocytogenes* 12.04 está ilustrada na Figura 3.2.10. A bactéria ao fim de 1 dia de conservação a 20°C sofreu uma redução de cerca de 2 Log₁₀ UFC/g (P < 0,05). Nos tempos de amostragem seguintes (2, 3 e 7 dias) a população bacteriana não sofreu qualquer alteração (P > 0,05). Este comportamento é indicativo de que a cultivar ‘Bravo de Esmolfe’ não possui características que suportem o desenvolvimento da *L. monocytogenes*, mas sim a sua sobrevivência. Em contraste, a bactéria *S. Typhimurium* sofreu um declínio na sua população ao longo do período de amostragem (Figura 3.2.11.). Ao fim do 1º dia foi registada uma redução de 4,3 Log₁₀ UFC/g, o dobro do observado em *L. monocytogenes* e ao fim de 7 dias as bactérias já não foram recuperadas. No entanto, é relevante observar que entre o 1º e o 3º dia a população bacteriana manteve-se estável (P > 0,05) evidenciando também alguma capacidade de sobrevivência, contudo inferior, em comparação com *L. monocytogenes*.

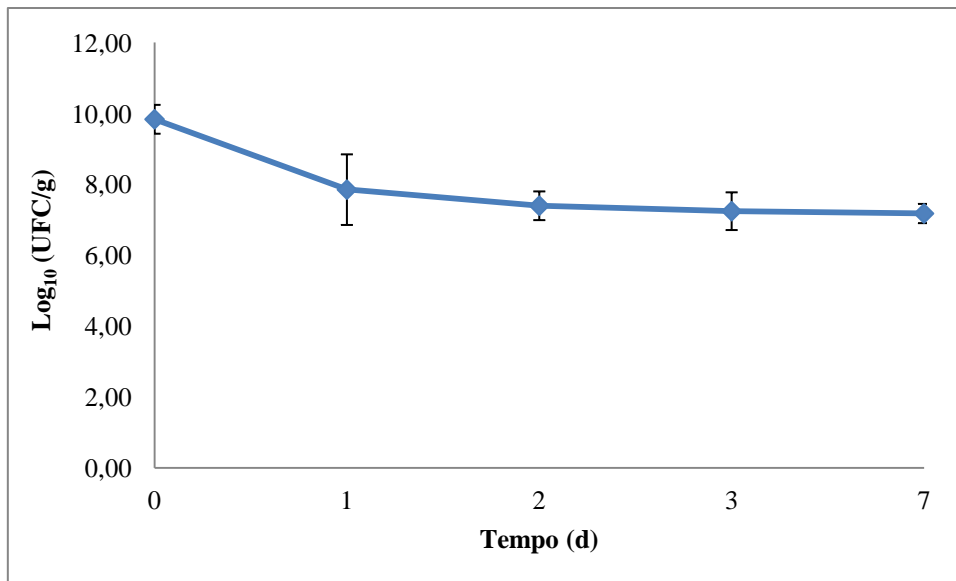


Figura 3.2.10. Sobrevivência da bactéria *L. monocytogenes* 12.04 em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’. Os dados são representativos de três ensaios em duplicado (n=6). As barras de erro representam o desvio padrão.

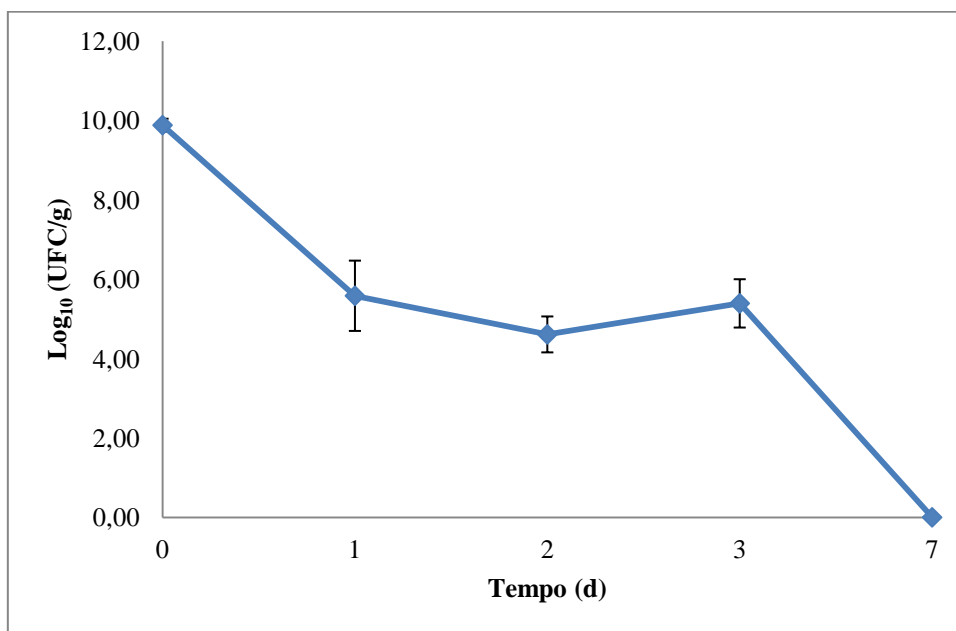


Figura 3.2.11. Sobrevivência da bactéria *S. Typhimurium* ATCC 14028 em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’. Os dados são representativos de três ensaios em duplicado (n=6). As barras de erro representam o desvio padrão.

As duas bactérias apresentaram diferentes capacidades de sobrevivência na maçã ‘Bravo de Esmolfe’ que na essencialidade se devem às diferenças entre as duas bactérias evidenciando uma maior capacidade de sobrevivência da estirpe *L. monocytogenes* 12.04. Os resultados estão em desacordo com os reportados no estudo de Conway *et al.*, (2000), onde foi avaliada a capacidade de crescimento/sobrevivência

da estirpe *L. monocytogenes* LCDC 81-861 em maçãs ‘Golden Delicious’ armazenadas a 10 e 20°C. Os autores verificaram que a bactéria aumentou a sua população a qualquer uma das temperaturas testadas. As diferenças entre o nosso estudo e o de Conway *et al.*, (2000) estarão ligadas, quer à diferente composição das maçãs (mas não o valor de pH que foi de 4,7 versus 4,25 da maçã ‘Bravo de Esmolfe’) e as diferenças entre as estirpes testadas.

Uma ligeira redução da população de *S. Typhimurium* na superfície das maçãs ‘Golden Delicious’ foi observada no estudo de Tian *et al.*, (2013) quando a temperatura de conservação foi de 15°C, mas quando a temperatura foi de 4°C a redução da população bacteriana foi mais significativa, atingiu cerca de 2 Log₁₀ ao fim de 1 e 2 dias. Em contrapartida, no estudo de Perez-Rodriguez *et al.*, (2014) foi observada a sobrevivência de *S. Reading* durante 12 dias em maçãs ‘Summerred’ (origem norueguesa) conservadas a 22°C.

Os resultados obtidos no presente estudo e nos atrás referidos (Conway *et al.*, 2000; Perez-Rodriguez *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2013) evidenciam a capacidade de sobrevivência das bactérias patogénicas na superfície das maçãs, embora se registem variações entre os estudos que estarão associadas às cultivares, estirpes e temperaturas utilizadas. Como referido por Perez-Rodriguez *et al.*, (2014) a capacidade de sobrevivência destas bactérias coloca em risco a cadeia de distribuição deste fruto, em particular pode ocorrer a contaminação cruzada de frutos minimamente processados, cuja produção vem aumentando.

3.3 Utilização das películas de alginato de sódio (2%) suplementadas com eugenol e citral

No presente estudo foi avaliada a ação da película à base de alginato de sódio (2%) suplementada com diferentes concentrações de eugenol e citral, quer individualmente quer em mistura.

Inicialmente foram testadas as películas de alginato de sódio (2% p/v) suplementada com 0,1% (v/v) eugenol e a película de alginato de sódio (2% p/v) sem adição de óleos essenciais no controlo do desenvolvimento das bactérias *L.*

monocytogenes e *S. Typhimurium* em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’. A seleção da película de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol foi por ser a que num estudo realizado no laboratório de Pós-Colheita da Universidade do Algarve, apresentou os melhores resultados no controlo de microrganismos de deterioração, pelo que no presente estudo será testada a sua eficácia no controlo de bactérias patogénicas em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ e ‘Golden Delicious’.

3.3.1 Utilização de películas edíveis em maçã ‘Bravo de Esmolfe’ para controlo de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* Typhimurium

O efeito da utilização da aplicação das películas de alginato de sódio (2%, p/v) com 0,1% (v/v) eugenol em fatias de maçã ‘Bravo de Esmolfe’ na viabilidade das bactérias *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* está ilustrado nas Figuras 3.3.12 e 3.3.13.

As maçãs depois de inoculadas, foram armazenadas a 4°C durante 3 dias, ao longo dos quais foi determinada a sobrevivência de *L. monocytogenes* 12.04 e *S. Typhimurium* ATCC 14028. Após 24 h foi observada a maior redução da viabilidade de *L. monocytogenes* ($P < 0.05$), cerca de 4 Log_{10} UFC/g (Figura 3.3.12.). Durante o 2º e 3º dia a população bacteriana manteve-se estável no controlo. Ao 3º dia a população de *L. monocytogenes* foi similar ($P > 0,05$) entre o controlo (sem película) e a película de alginato de sódio (2%, p/v) com 0,1% (v/v) eugenol, em contraste foi observada uma redução significativa ($P < 0,05$) da população bacteriana nas maçãs revestidas apenas com a película de alginato de sódio (2%, p/v) (Figura 3.3.12.). O efeito de recuperação da população de *L. monocytogenes* ao 3º dia de armazenamento a 4°C nas maçãs revestidas com a película de alginato de sódio (2%, p/v) com 0,1% (v/v) eugenol pode estar associado a respostas de resistência, contudo é intrigante uma vez que foi reportado a ausência de desenvolvimento de resistência ao eugenol em diferentes estirpes de *L. monocytogenes* (Apolónio *et al.*, 2014). E, como pode-se observar, as bactérias encontram-se aptas, pois ao fim dos 3 dias conseguiram sobreviver.

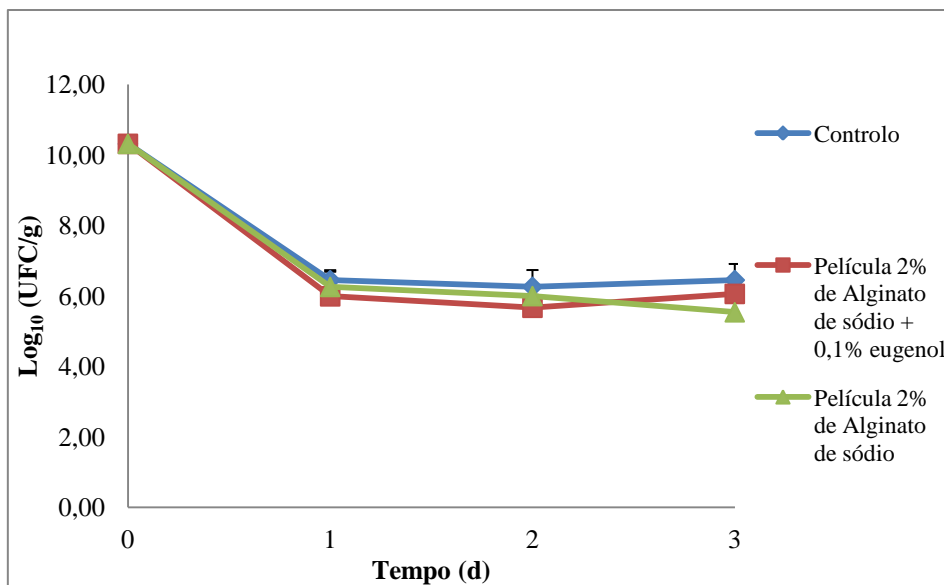


Figura 3.3.12. Efeito da utilização da películas de alginato de sódio (2%) com e sem suplemento de 0,1% eugenol em fatias de maçã ‘Bravo de Esmolfe’ no controlo de *Listeria monocytogenes* 12.04 em condições de armazenamento a 4°C. Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio padrão.

O efeito da utilização das películas em fatias de maçã ‘Bravo de Esmolfe’ para o controlo de *S. Typhimurium* está ilustrado na Figura 3.3.13. Tal como foi observado em *L. monocytogenes* também a viabilidade de *S. Typhimurium* sofreu a maior redução ($P < 0.05$) ao fim do 1º dia à temperatura de 4°C, cerca de 4 Log₁₀ UFC/g. Até ao 3º dia a população bacteriana manteve-se estável (Figura 3.3.13.). Deste modo as duas bactérias conseguiram, de igual modo, sobreviver à utilização das películas, incluindo com a película suplementada com 0,1% de eugenol.

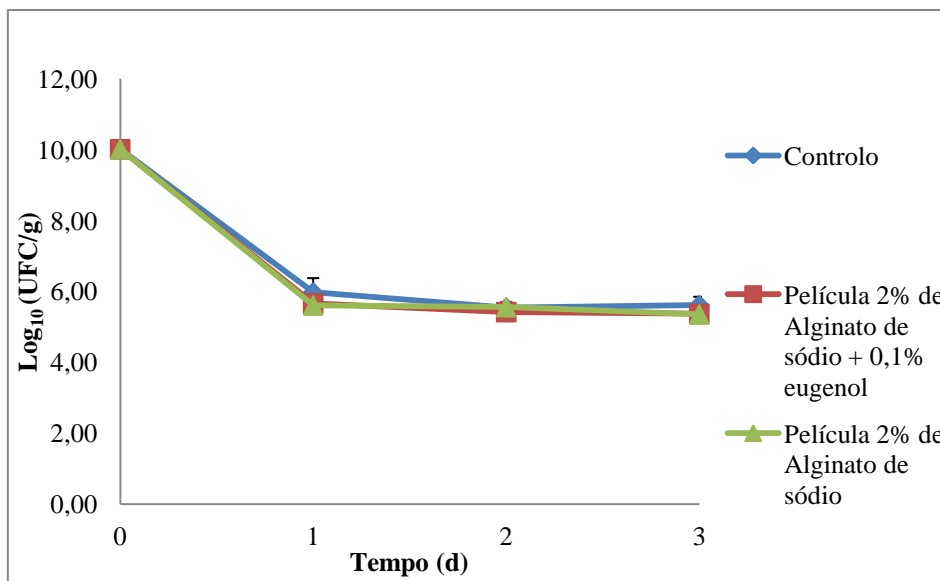


Figura 3.3.13. Efeito da utilização das películas de alginato de sódio (2%) com e sem suplemento de 0,1% eugenol em fatias de maçã 'Bravo de Esmolfé' no controle de *S. Typhimurium* ATCC 14028 em condições de armazenamento a 4°C. Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio padrão.

Existem fatores que influenciam a ação antibacteriana dos óleos essenciais em alimentos apesar do seu potencial no controle de agentes patogênicos (Burt, 2004; Hyldgaard *et al.*, 2012). Vários estudos reportaram que as propriedades dos alimentos podem afetar a suscetibilidade microbiana aos óleos essenciais (Tassou *et al.*, 1995; Juven *et al.*, 1994; Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010). As interações entre os componentes hidrofóbicos dos óleos essenciais são alteradas pelos componentes presentes nos alimentos tais como a sua composição, o valor de pH, teor de gordura, teor de proteínas, entre outros (Tassou *et al.*, 1995). Os fatores extrínsecos como a temperatura e o nível de contaminação também podem influenciar a ação dos óleos essenciais (Somolinos *et al.*, 2010). De modo geral, para atingir um valor de atividade antimicrobiana eficaz, é necessário aumentar a concentração de óleos essenciais (Burt, 2004; Hyldgaard *et al.*, 2012).

Como foi verificado, as películas de alginato de sódio (2%) e de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol não eliminaram a presença quer de *S. Typhimurium* quer de *L. monocytogenes* pelo que a concentração de eugenol foi aumentada para 0,2% e foi elaborada uma segunda película de alginato de sódio (2%) suplementada com a mistura de eugenol e citral (0,1% e 0,15%, respetivamente). Esta mistura já foi testada no laboratório de Pós-Colheita da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do

Algarve com bons resultados no controlo da população bacteriana de deterioração em vários frutos, pelo que no presente estudo foi testada no controlo da população das duas bactérias patogénicas.

O efeito da utilização das películas de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol e de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral em fatias de maçãs cortadas de 'Bravo de Esmolfe' no controlo de *L. monocytogenes* 12.04 e *S. Thyphimurium* ATCC 14028 está ilustrado nas Figuras 3.3.14 e 3.3.15, respetivamente.

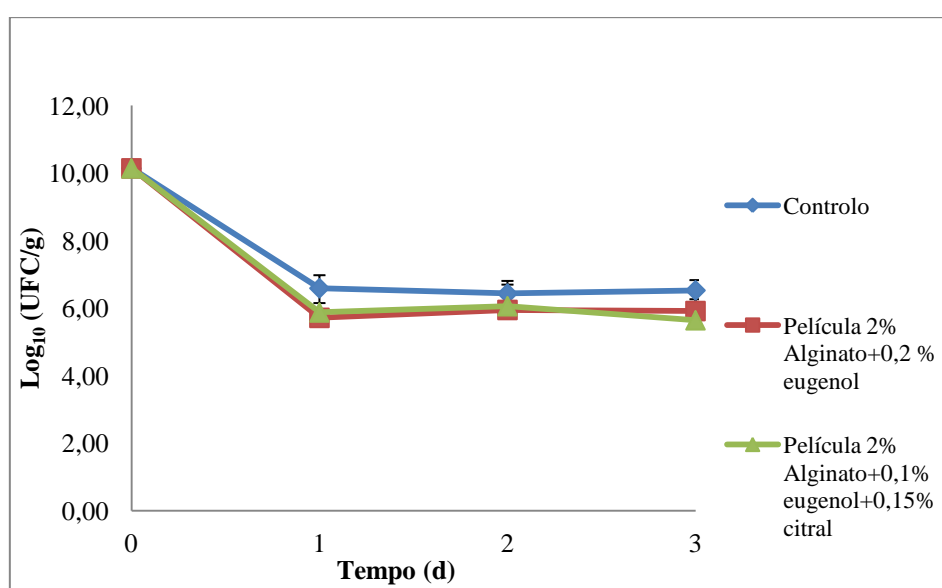


Figura 3.3.14. Efeito da utilização das películas de alginato de sódio (2%) na presença de 0,2% eugenol e na presença de 0,1% eugenol mais 0,15% citral em maçãs cortadas 'Bravo de Esmolfe' no controlo de *Listeria monocytogenes* 12.04 em condições de armazenamento a 4°C. Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio padrão.

Após 24 h, a população de *L. monocytogenes* 12.04 sofreu uma redução de cerca de 4,5 Log₁₀ UFC/g nas maçãs cortadas revestidas com as películas de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol e de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral, enquanto que nas maçãs controlo (sem revestimento) foi observada uma redução de 3,50 Log₁₀ UFC/g (Figura 3.3.14.). A partir das 24h até ao 3º dia a população de *L. monocytogenes* manteve-se constante, quer nas maçãs controlo, quer nas maçãs revestidas com as películas. O impacto das películas no controlo de *L. monocytogenes* foi eficaz ao fim do 1º dia ($P < 0,05$), em comparação com as maçãs controlo, tendo as duas películas apresentado valores de redução da população de *L. monocytogenes*

semelhantes ($P > 0,05$). Contudo, o seu efeito não se estendeu para além do 1º dia, embora seja possível observar um ligeiro decréscimo, em particular nas maçãs revestidas com a película suplementada com 0,1% eugenol e 0,15% citral, mas este não foi significativo ($P > 0,05$). Deste modo, quer o aumento da concentração do eugenol (para 0,2 %), quer a mistura de 0,1 % de eugenol com 0,15% de citral resultou numa ação mais eficaz em comparação com o ensaio onde se utilizou apenas a película suplementada com 0,1% de eugenol. Dado que a ação da mistura dos dois óleos foi semelhante à da película suplementada apenas com 0,2% de eugenol é possível concluir que a combinação dos dois óleos resultou numa sinergia.

A população de *S. Typhimurium* nas maçãs cortadas revestidas com as películas sofreu um decréscimo de cerca de 5 Log_{10} UFC/g, em contraste com as maçãs controlo que sofreram apenas uma redução de 3 Log_{10} UFC/g, ao fim de 24 h de conservação a 4°C (Figura 3.3.15.). A partir das 24 h até ao 3º dia a população bacteriana manteve-se estável nas maçãs cortadas e revestidas com as películas, mas o seu número foi significativamente menor até ao 2º dia ($P < 0,05$), em comparação com as maçãs controlo. Ao 3º dia a população bacteriana é semelhante entre as maçãs cortadas revestidas com a película suplementada com 0,2% eugenol e as maçãs controlo ($P > 0,05$), mas é inferior nas maçãs cortadas revestidas com a película na presença de 0,1% eugenol e 0,15% citral em comparação com as maçãs controlo ($P < 0,05$). A ação das duas películas contra a bactéria *S. Typhimurium* foi semelhante ($P > 0,05$) ao longo do período de conservação (Figura 3.3.15.).

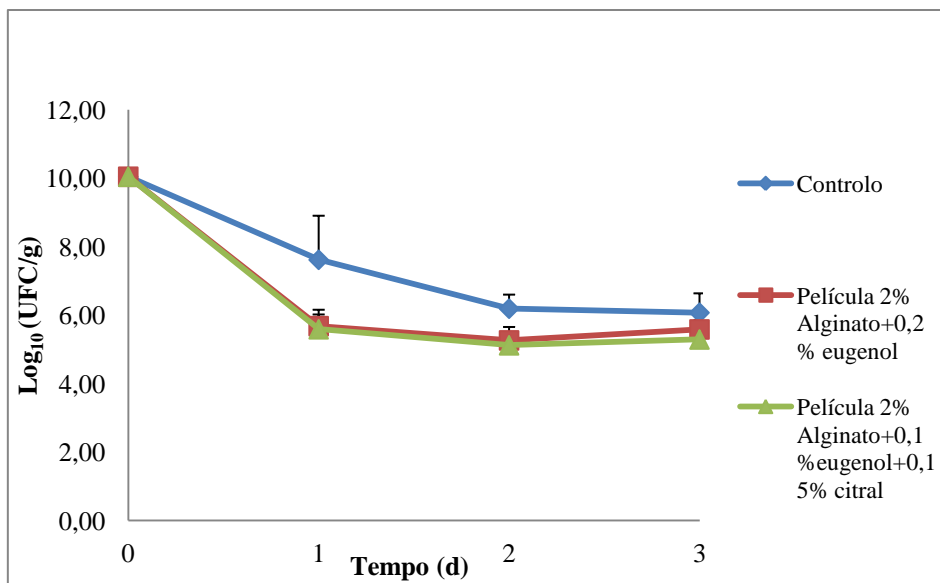


Figura 3.3.15. Efeito da utilização das películas de alginato de sódio (2%) na presença de 0,2% eugenol e na presença de 0,1% eugenol mais 0,15% citral em maçãs cortadas 'Bravo de Esmolfe' no controlo de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 em condições de armazenamento a 4°C. Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio padrão.

Os resultados obtidos no controlo de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* em maçãs cortadas e revestidas com as películas edíveis de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol e de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral foram promissores pelo que as mesmas películas foram utilizadas numa cultivar que tem uma distribuição internacional, a 'Golden Delicious' de modo a validar a utilização mais alargada destas películas.

3.3.2 Utilização de películas edíveis em maçã 'Golden Delicious' para controlo de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica Typhimurium*

Os resultados obtidos com as maçãs 'Golden Delicious' diferem daqueles obtidos com as maçãs 'Bravo de Esmolfe' (Figuras 3.3.16 e 3.3.17.). A população de *L. monocytogenes* nas maçãs cortadas e revestidas com as películas de alginato de sódio (2%) suplementadas com os óleos sofreu um decréscimo semelhante ao observado nas maçãs controlo (cerca de 3 Log₁₀ UFC/g) durante o armazenamento a 4°C. A população bacteriana manteve-se estável até ao 2º dia, mas ao 3º dia foi observado uma aumento significativo ($P < 0,05$), quer nas maçãs cortadas e revestidas com as películas quer nas

maçãs controlo (Figura 3.3.16.). Este aumento estará relacionado com as propriedades químicas desta cultivar que permitem a recuperação do crescimento da estirpe *L. monocytogenes* 12.04.

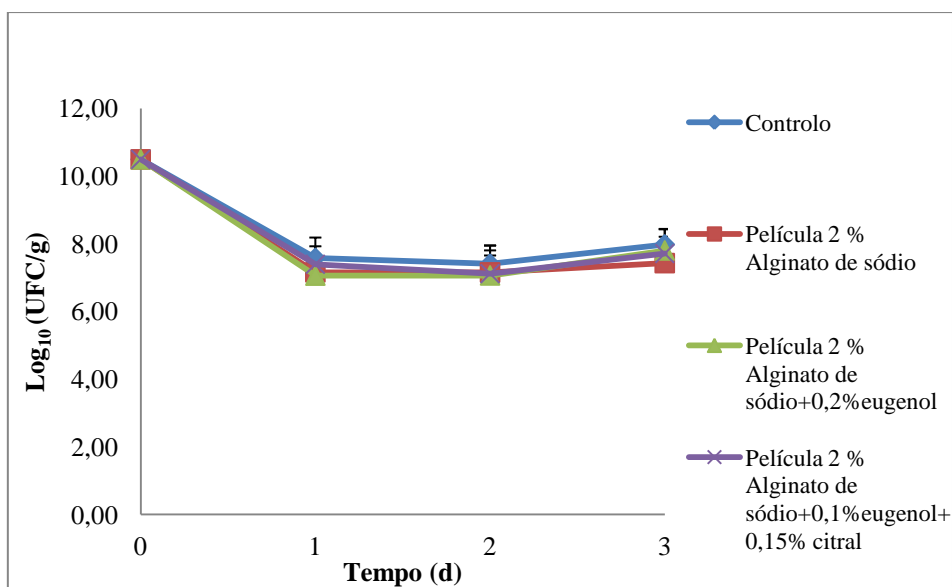


Figura 3.3.16. Efeito da utilização das películas de alginato de sódio (2%) na presença de 0,2% eugenol e na presença de 0,1% eugenol mais 0,15% citral em maçãs cortadas ‘Golden Delicious’ no controlo de *Listeria monocytogenes* 12.04 em condições de armazenamento a 4°C. Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio padrão.

A maior redução da população de *S. Thyphimurium* ATCC 14028 em maçãs cortadas de ‘Golden Delicious’ foi observada ao fim de 24 h e em valores semelhantes aos obtidos com *L. monocytogenes* (Figura 3.3.17.). No entanto, as maçãs revestidas com as duas películas de alginato de sódio (2%) suplementadas com os óleos, em comparação com as maçãs controlo apresentaram uma população significativamente menor ($P < 0,05$) ao fim das 24 h de armazenamento a 4°C, ou seja, a população bacteriana nas maçãs controlo foi de $7,70 \pm 0,47 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$, enquanto nas maçãs revestidas com a película de alginato de sódio (2%) suplementada com 0,2% de eugenol foi de $6,96 \pm 0,44 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ e as maçãs revestidas com 0,1% eugenol e 0,15% citral foi de $6,83 \pm 0,79 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$. Este efeito foi ainda mantido até ao 2º dia, mas ao 3º dia o efeito desapareceu com a população de *Salmonella* a atingir valores semelhantes nas maçãs controlo e nas maçãs tratadas.

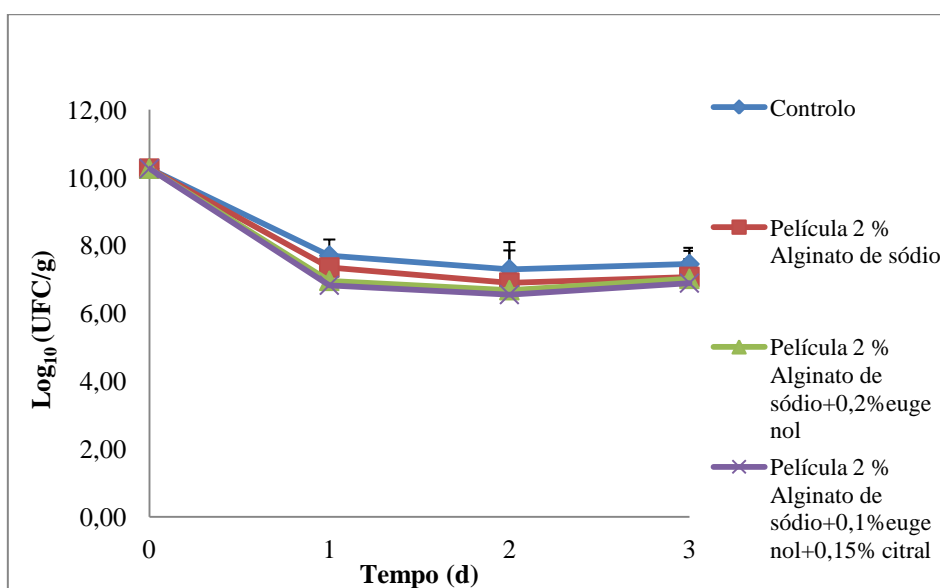


Figura 3.3.17. Efeito da utilização das películas de alginato de sódio (2%) na presença de 0,2% eugenol e na presença de 0,1% eugenol mais 0,15% citral em maçãs cortadas ‘Golden Delicious’ no controlo de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 em condições de armazenamento a 4°C. Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio padrão.

Os resultados obtidos no controlo das duas bactérias patogénicas nas duas cultivares de maçãs evidenciam a existência de fatores que propiciam a sobrevivência e até a proliferação bacteriana, limitando a eficácia das películas edíveis suplementadas com óleos essenciais. Um dos fatores é o valor de pH (Burt, 2004). A ação dos óleos essenciais nas células bacterianas pode ser aumentada com a diminuição do pH dos alimentos (Burt, 2004). Em alimentos com um pH baixo, os óleos essenciais conseguem interagir mais facilmente com a membrana celular das bactérias, ou seja, têm o mesmo alvo que muitos ácidos orgânicos destabilizando a membrana celular (Faleiro, 2011, 2012). A ação mais eficaz das películas de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol e a de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ no controlo de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*, em comparação com a sua ação nas maçãs ‘Golden Delicious’ estará associada ao valor de pH mais baixo das maçãs ‘Bravo de Esmolfe’. É possível que, para além do valor de pH, as diferenças na composição química das duas cultivares também contribuam para as diferenças na sobrevivência das duas bactérias. É possível que, para além do ácido oxálico e málico, estejam presentes outros ácidos na maçã ‘Bravo de Esmolfe’ que contribuam para um menor pH destas contribuindo para o melhor controlo das bactérias em estudo.

Um dos primeiros estudos sobre a utilização de óleos essenciais em películas edíveis foi realizado em 2005 por Pranoto *et al.*. Estes autores reportaram o poder antibacteriano de películas à base de alginato suplementadas com óleo de alho (*Allium sativum* L.) contra o desenvolvimento de *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus* e *S. Typhimurium*. Apenas *S. aureus* e *B. cereus* foram sensíveis ao óleo essencial de alho.

Em 2007, Rojas-Graü *et al.*, estudou o efeito de óleos de orégão (*Origanum vulgare* L.), canela (*Cinnamomum zeylanicum* J. Presl) e erva-príncipe (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) e dos seus compostos ativos (carvacrol, cinamaldeído e citral, respetivamente) incorporados em películas edíveis à base de alginato e de puré de maçã na redução de *Listeria innocua* em maçãs ‘Fuji’. Concluiu então que as películas suplementadas com o óleo de erva-príncipe (1% v/v e 1,5% v/v) e com orégão (0,5% v/v) reduziram mais de 4 Log₁₀ UFC/g da população bacteriana. O estudo de Raybaudi-Massilia *et al.*, (2008) indicou que, a adição dos óleos de erva-príncipe (0,7% v/v), canela (0,7% v/v), citral (0,5% v/v) e cinamaldeído (0,5% v/v) em películas de alginato, aplicadas em maçãs ‘Fuji’ minimamente processadas aumentou o seu efeito antimicrobiano causando uma redução da população de *E. coli* superior a 4 Log₁₀ UFC/g ao fim de uma semana de armazenamento. O óleo de cravo-da-índia (0,7% v/v) e eugenol (0,5% v/v) também promoveram uma redução de mais de 4 Log₁₀ UFC/g, mas este resultado foi obtido entre 7 a 14 dias.

3.4 Sobrevivência da bactéria *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium* em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ revestidas com películas suplementadas com óleos essenciais, sujeitas à simulação de condições do trato gastrointestinal (suco gástrico com pH 2,5)

Os resultados dos ensaios anteriores apontaram para que, após o período de armazenamento de 24 h a 4°C, as bactérias *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* presentes nas maçãs cortadas revestidas com e sem películas experienciaram uma redução significativa da sua população, contudo nas 48 h seguintes manteve-se estável. É reconhecida a capacidade quer da bactéria *L. monocytogenes* quer de *S. Typhimurium* de montar respostas de tolerância quando expostas a condições subletais (Faleiro, 2012) e como qualquer bactéria de origem alimentar, mais cedo ou mais tarde,

vai enfrentar o sistema gastrointestinal do hospedeiro, onde as respostas de tolerância serão úteis para ultrapassar os efeitos prejudiciais dos sucos gástricos (baixo valor de pH) e sucos intestinais (diferenças osmóticas). Em virtude do exposto foi avaliada a sobrevivência das bactérias *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* quando sujeitas às condições do trato gastrointestinal após 24 h da sua inoculação em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ revestidas com as películas de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol e a de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral. O valor de pH no estômago em jejum é geralmente de 1-3 e dependendo do alimento ingerido o valor do pH varia de 4-5 (Cummings *et al.*, 2004).

Simulando um valor de pH do suco gástrico em jejum perto do limite mais elevado foi selecionado o valor de pH 2,5. O valor final de pH da mistura da maçã macerada e os respectivos sucos foi determinado e estes foram, para a amostra controle, de $5,69 \pm 0,15$, para a maçã revestida com a película de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol foi de $5,49 \pm 0,36$ e para a maçã revestida com a película de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral foi de $5,46 \pm 0,05$. Após a adição do suco intestinal os valores de pH foram $8,46 \pm 0,2$ (controle), $8,25 \pm 0,20$ (película de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol) e $8,32 \pm 0,11$ (película de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral).

3.4.1 *Listeria monocytogenes*

O processo de exposição das bactérias foi iniciado com a adição da saliva durante cinco minutos. Após este tempo a viabilidade de *L. monocytogenes* 12.04 foi de $7,64 \pm 0,61 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ (controle), $5,65 \pm 0,35 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ (película de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol) e $6,75 \pm 0,77 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$, (película de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral). Os valores de viabilidade após a adição da saliva foi significativamente diferente entre o controle e ambas as películas ($P < 0,05$), mas não foi observada qualquer diferença ($P > 0,05$) entre os valores de viabilidade nas amostras com as duas películas. Após a incubação em saliva foi realizada a adição dos sucos gástrico e intestinal com amostragens aos 0, 60 e 120 min. Os resultados da sobrevivência da bactéria *L. monocytogenes* 12.04 à exposição dos sucos gastrointestinais estão ilustrados na Figura 3.4.18A-B.

A adição do suco gástrico (pH 2,5) não afetou a viabilidade bacteriana, esta manteve-se constante ao longo do período de amostragem (2 h) verificando-se apenas uma ligeira redução ao fim de 60 min que se manteve até perfazer os 120 min (Figura 3.4.18A).

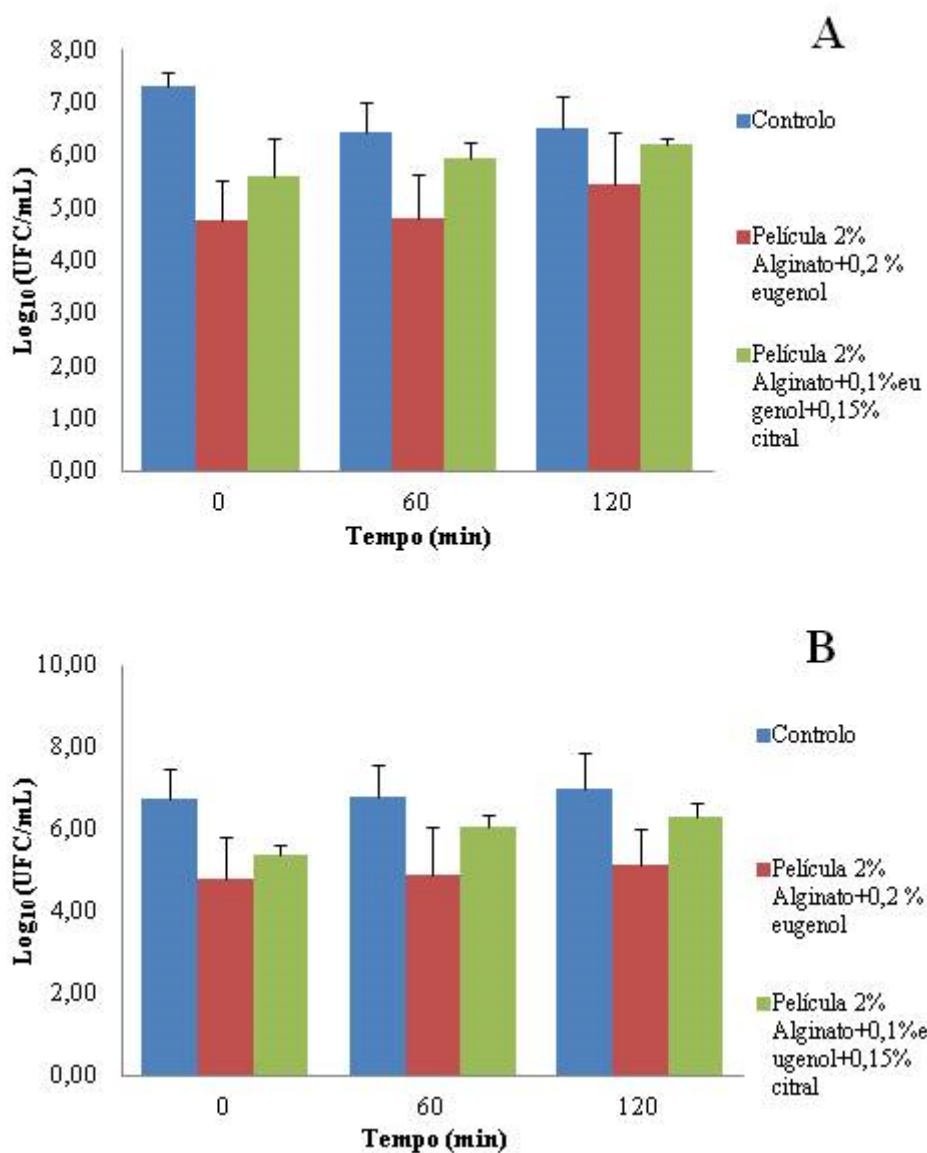


Figura 3.4.18. Sobrevivência da bactéria *Listeria monocytogenes* 12.04 quando exposta ao suco gástrico a pH 2,5 (A) e ao suco intestinal (B), em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ na ausência (controlo) e na presença da película de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol e de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral. Os dados são representativos de três ensaios independentes com determinações em duplicado (n=6). As barras de erro representam o desvio padrão.

A adição do suco intestinal também não provocou qualquer alteração na viabilidade de *L. monocytogenes* 12.04 (Fig 3.4.18B), quer no controlo quer nas

amostras com as películas, embora se observe uma tendência das células de *L. monocytogenes* para aumentarem a sua viabilidade, contudo as diferenças não são significativas ($P > 0,05$).

A tolerância a baixos valores de pH e a condições de elevada osmolaridade é uma das características da bactéria *L. monocytogenes*, o que explica a sua capacidade de sobrevivência em alimentos de elevada acidez e presença de sal (Faleiro *et al.*, 2003). A sua sobrevivência neste tipo de alimento pode permitir uma maior resistência durante a passagem pelo trato gastrointestinal (Gahan & Hill, 2014; Melo *et al.*, 2013; Samara & Koutsonamis, 2009).

No estudo de Melo *et al.*, (2013), várias estirpes de *L. monocytogenes* sobreviveram à exposição do mesmo processo de simulação do trato gastrointestinal utilizado no presente estudo, mantendo a sobrevivência entre 98-100%.

No estudo realizado por Samara & Koutsonamis (2009) foi observada uma rápida diminuição da população de *L. monocytogenes* Scott A, em alface fresca quando exposta ao suco gástrico (pH 2,5). Esta diminuição foi mais acentuada quando a alface foi armazenada a 5°C quando comparada com o seu armazenamento a 20°C. Estes resultados levaram os investigadores a concluir que a temperatura de armazenamento dos alimentos pode, também, afetar a tolerância bacteriana à acidez. No presente estudo esta redução não foi observada, o que pode estar associado ao tipo de alimento e diferenças entre as estirpes.

3.4.2 *Salmonella* Typhimurium

A viabilidade da bactéria *S. Typhimurium* ATCC 14028 após a exposição à saliva foi de $6,88 \pm 0,56 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ (controlo), $7,37 \pm 0,66 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ (película de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol) e $7,22 \pm 0,26 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ (película de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral), após à exposição de 5 min da saliva. Estes valores de viabilidade foram semelhantes ($P > 0,05$).

A viabilidade da bactéria *S. Typhimurium* ATCC 14028 após a exposição aos sucos gastrointestinais está ilustrada na Figura 3.4.19A-B. Foi observado que as células bacterianas que estiveram expostas à película de alginato de sódio (2%) com 0,1%

eugenol e 0,15% citral sofrem uma redução, que é significativa, ao fim de 2 h de exposição ao suco gástrico, em comparação com o controlo ($P < 0,05$) e com os valores obtidos com a película de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol ($P < 0,05$) (Figura 3.4.19A). A maior suscetibilidade das células expostas à película de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral foi igualmente observada após a adição do suco intestinal (Figura 3.4.19B). Apesar desta maior susceptibilidade foi observada a capacidade de sobrevivência de *S. Typhimurium* quando exposta aos sucos intestinais, quer nas amostras controlo quer nas amostras tratadas com as películas. Esta capacidade de sobrevivência à exposição ao sistema de simulação do trato gastrointestinal foi comum assim às duas bactérias em estudo.

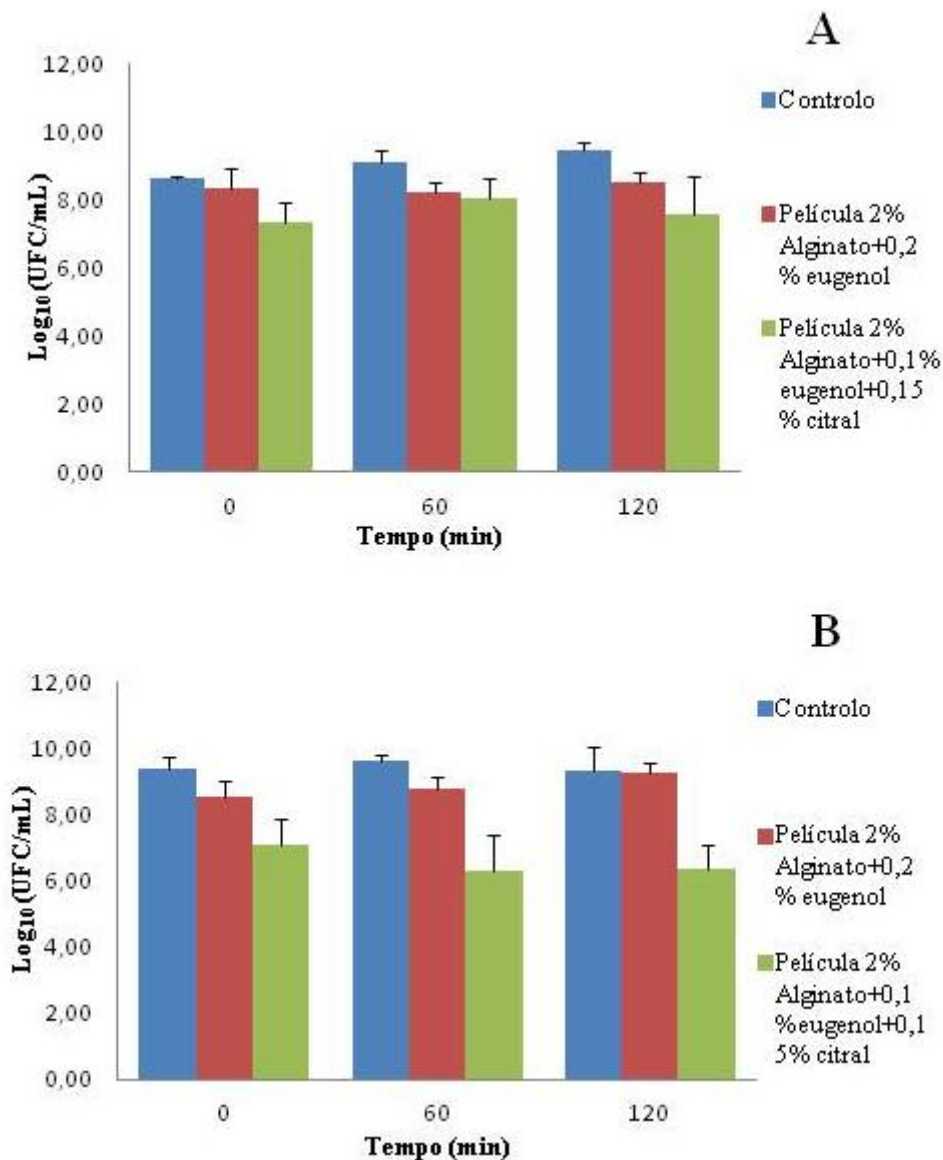


Figura 3.4.19. Sobrevivência da bactéria *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 quando exposta ao suco gástrico a pH 2,5 (A) e ao suco intestinal (B) em maçãs 'Bravo de Esmolfe' na ausência (controlo) e na presença das película de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol e de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral. Os dados são representativos de três ensaios independentes com determinações em duplicado (n=6). As barras de erro representam o desvio padrão.

Tal como a bactéria *L. monocytogenes*, a bactéria *S. Typhimurium* também possui mecanismos de resposta de tolerância ao ácido, o que permite a sua sobrevivência quando exposta a condições de elevada acidez, como os sucos gástricos, bem como a levada osmolaridade do sistema intestinal (Faleiro, 2012).

Os resultados são concordantes com o estudo de Oliveira *et al.*, (2011), onde uma incubação sequencial de *S. Typhimurium* DT104 no solo e depois em alfaces,

causou um ligeiro aumento da viabilidade da bactéria quando exposta ao suco gástrico (pH 3,5) e igual aumento no suco intestinal. A capacidade de resistir à exposição ao suco gástrico foi igualmente observada no estudo de He & Ahn (2011), onde o valor de pH do suco gástrico foi de 3,0 e as duas estirpes de *S. Typhimurium* foram capazes de manter a sua viabilidade por cerca de 4 h.

De modo a esclarecer se a sobrevivência das bactérias *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* nas maçãs cortadas e revestidas com as películas de alginato de sódio suplementadas com os óleos essenciais se mantém independentemente do valor de pH do suco gástrico foi elaborado o mesmo ensaio diminuindo o valor de pH do suco gástrico para 1,5.

3.5 Sobrevivência das bactérias *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium* em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ revestidas com películas suplementadas com óleos essenciais, sujeitas à simulação de condições do trato gastrointestinal (suco gástrico com pH 1,5)

Como foi referido atrás, os valores de pH do suco gástrico humano em jejum pode variar entre 1 e 3 (Cummmings *et al.*, 2004) pelo que o valor de pH do suco gástrico nesta abordagem (pH 1,5) está próximo do valor mínimo simulando a ingestão de maçã como primeiro alimento. O valor final de pH da mistura da maçã macerada com os respetivos sucos foi determinado e estes foram de $3,58 \pm 0,07$ para o controlo, $3,52 \pm 0,07$ para a maçã revestida com a película de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol e $3,55 \pm 0,06$ para a maçã revestida com a película de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral. A adição do suco intestinal provocou a alteração do valor de pH para $8,71 \pm 0,07$ para o controlo, $8,65 \pm 0,09$ para a maçã revestida com a película de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol e $8,68 \pm 0,06$ para a maçã revestida com a película de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral.

3.5.1 *Listeria monocytogenes*

A viabilidade da bactéria *L. monocytogenes* 12.04 nas maçãs maceradas com a saliva e após uma incubação de 5 min foi de $7,28 \pm 0,55 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ para o controlo, para as maçãs revestidas com a película de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol a viabilidade bacteriana foi de $5,53 \pm 0,47 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ e por fim, nas maçãs revestidas com a película de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral foi registado o valor de $5,61 \pm 0,32 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$.

Relativamente às diferenças entre os valores de viabilidade de *L. monocytogenes* nas amostras após a adição da saliva, estas foram significativas entre o controlo e os valores determinados nas duas películas testadas ($P < 0,05$), mas a viabilidade bacteriana foi similar nas maçãs revestidas com qualquer uma das películas ($P > 0,05$).

Após a adição do suco gástrico e suco intestinal, a viabilidade da bactéria *L. monocytogenes* 12.04 exposta à ação das películas não foi recuperada, enquanto que as células controlo mantiveram a sua viabilidade ao longo da exposição, quer no suco gástrico, quer no suco intestinal (Figura 3.5.20A-B).

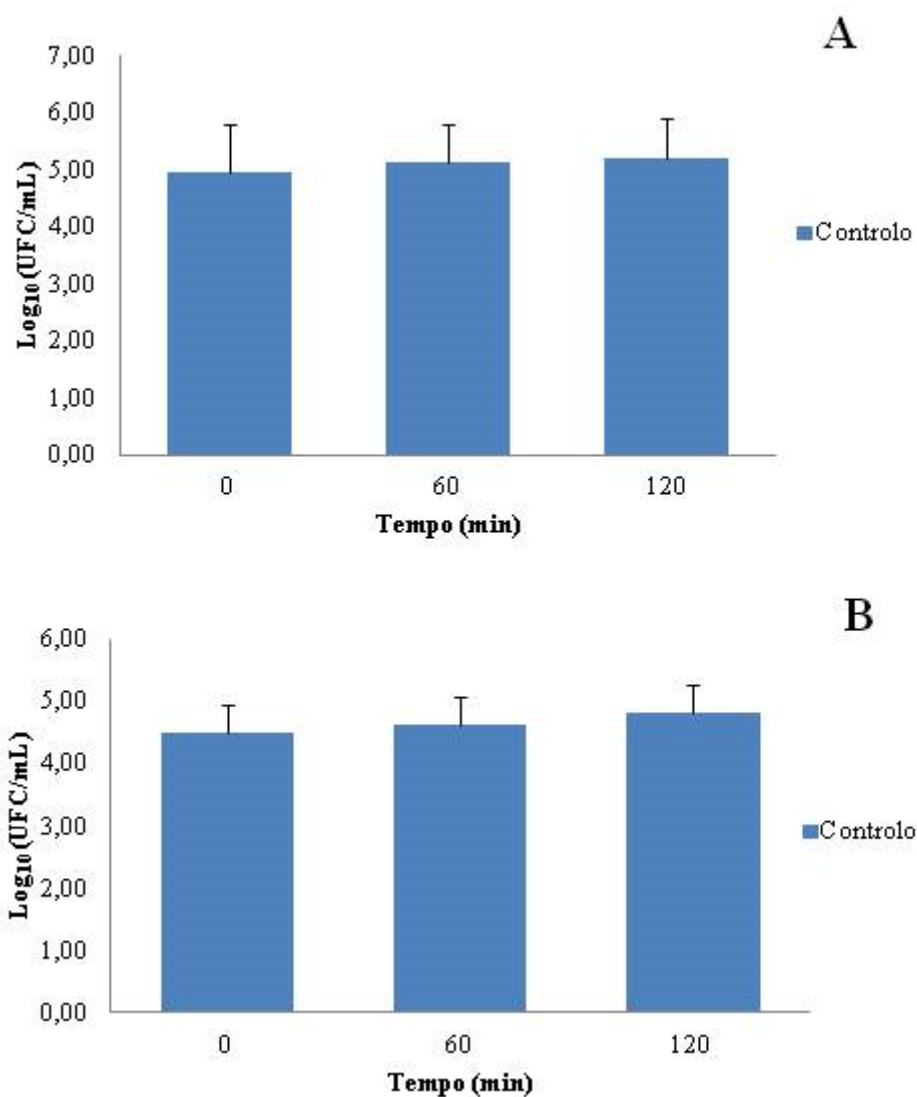


Figura 3.5.20. Sobrevivência da bactéria *Listeria monocytogenes* 12.04 quando exposta suco gástrico a pH 1,5 (A) e ao suco intestinal (B), em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ sem revestimento (controle) e revestidas com a película de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol e com a película de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral. Os dados são representativos de três ensaios independentes com determinações em duplicado (n=6). As barras de erro representam o desvio padrão.

A não recuperação das células de *L. monocytogenes* 12.04 nas maçãs com o revestimento das duas películas evidencia a sua maior suscetibilidade permitindo a sua eliminação com a adição do suco gástrico. Em contrapartida, a viabilidade da bactéria *L. monocytogenes* 12.04 nas maçãs sem revestimento (controle) ao longo do processo de simulação do sistema gastrointestinal que foi cerca de 5 Log₁₀ UFC/mL indicia a

elevada capacidade da bactéria em suportar ambientes com valores de pH baixo, nomeadamente o sistema gástrico.

A diferente suscetibilidade de *L. monocytogenes* a alimentos com diferentes valores de acidez e o efeito destes na sua sobrevivência após exposição aos sucos gástricos foi reportada por vários estudos (Peterson *et al.*, 2007; Roering *et al.*, 1999; Stopforth *et al.*, 2005). No estudo de Roering *et al.*, (1999) a incubação das células de *L. monocytogenes* 101M, CLIP 23485 e F6854 em cidra de maçã pasteurizada e não pasteurizada (pH 3,3-3,5) durante 21 dias a 4 e a 10°C causou uma redução da viabilidade da bactéria abaixo do limite de deteção após 48 h. Quando à cidra de maçã foi adicionado o suco gástrico (pH 1,5), a população de *L. monocytogenes* foi eliminada ao fim de 5 a 30 min (com uma redução de 5,5-6 Log₁₀ UFC/mL). Em contraste, a estirpe *L. monocytogenes* F2365 (estirpe epidémica) demonstrou uma maior resistência à exposição ao suco gástrico (pH 3,5, 5,0 e 7,0) após crescimento num produto cárneo (à base de carne de peru) tipo pronto-a-comer em comparação com as células crescidas no meio de cultura “Brain Heart Infusion” (Peterson *et al.*, 2007).

Deste modo podemos dizer, pelos nossos resultados em conjunto com os dos estudos atrás referidos, que o tipo de alimento (e respetivos fatores intrínsecos e extrínsecos) e as características da estirpe contribuem para o seu sucesso durante a passagem pelo sistema gastrointestinal.

3.5.2 *Salmonella* Typhimurium

Como foi comprovado anteriormente, a *Salmonella* Typhimurium resiste a condições extremas como ambientes de pH baixo. Após 5 min expostas à saliva, a sobrevivência de *S. Typhimurium* foi de $8,00 \pm 0,00$ Log₁₀ UFC/mL para o controlo e $7,00 \pm 0,00$ Log₁₀ UFC/mL para ambas as películas. Observando as Figuras 3.5.21A-B, a bactéria sobreviveu, quer à adição do suco gástrico a pH 1,5 quer à adição do suco intestinal. Na exposição das células *S. Typhimurium* nas maçãs controlo ao suco gástrico foi registada uma redução ~ 2 Log₁₀ UFC/mL, em que na saliva registou-se uma viabilidade de $8,00 \pm 0,00$ Log₁₀ UFC/mL que reduziu para $5,79 \pm 0,00$ Log₁₀ UFC/mL quando exposta ao suco gástrico. Já as amostras contendo as películas registou-se uma

redução de $\sim 2,5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$, ou seja, quando expostas ao suco gástrico, reduziu de $7,00 \pm 0,00 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ para $4,52 \pm 0,00 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ e $4,21 \pm 0,00 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$, respetivamente à película de alginato de sódio (2%) suplementada com 0,2% eugenol e à película de alginato de sódio (2%) suplementada com 0,1% eugenol e 0,15% citral.

A viabilidade das três amostras manteve-se constante ao longo de toda a simulação, como se pode comprovar observando as Figuras 3.5.21A-B.

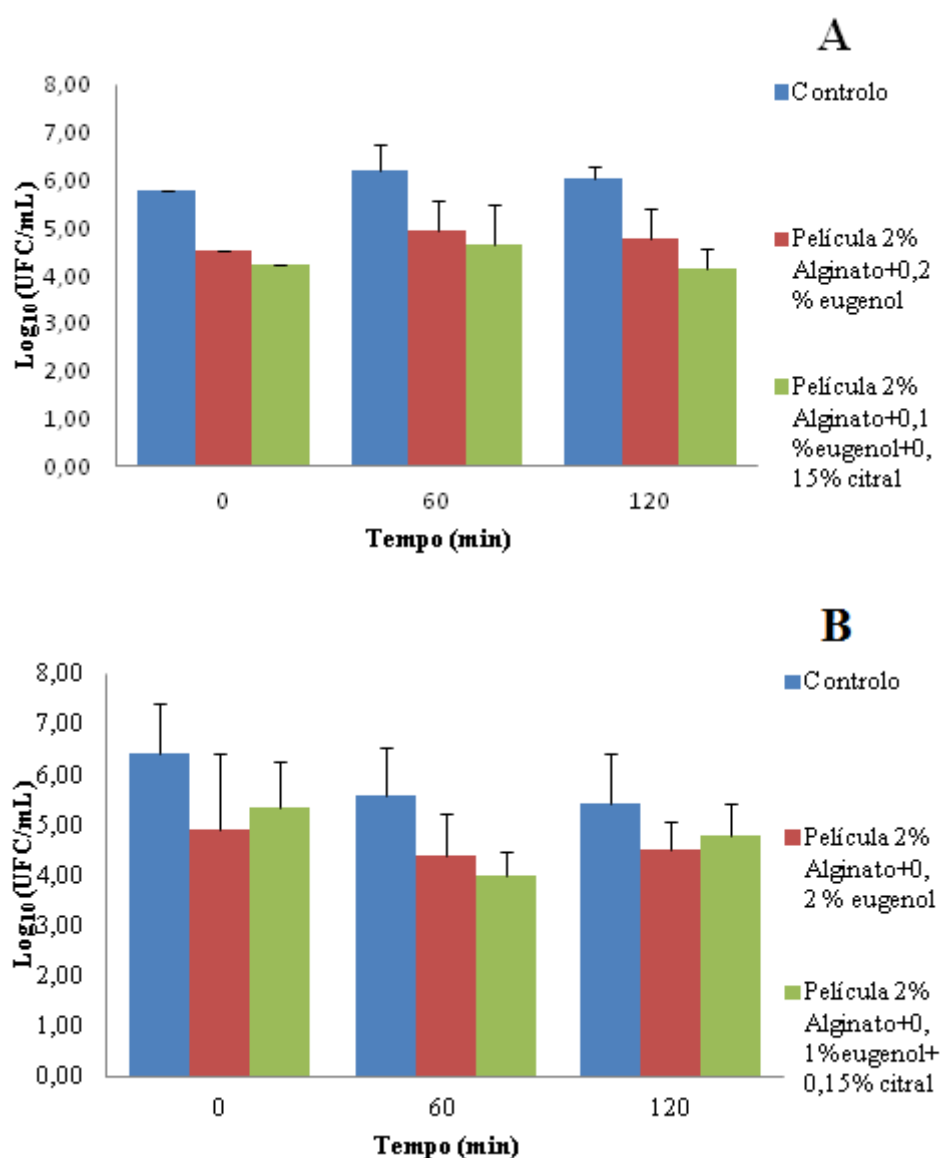


Figura 3.5.21. Sobrevivência da bactéria *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 quando exposta ao suco gástrico a pH 1,5 (A) e ao suco intestinal (B), em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ sem revestimento (controlo) e revestidas com a película de alginato de sódio (2%) com 0,2% eugenol e com a película de alginato de sódio (2%) com 0,1% eugenol e 0,15% citral. Os dados são representativos de três ensaios independentes com determinações em duplicado (n=6). As barras de erro representam o desvio padrão.

O estudo de Roering *et al.*, (1999) evidenciou a eliminação de *S. Typhimurium* em cidra de maçã (pH 3,3-3,5) pasteurizada e não pasteurizada (redução de 5,5-6,0 Log₁₀ UFC/mL) após apenas 5 min de exposição ao suco gástrico a pH 1,5. He & Ahn (2011) indicou a diminuição da viabilidade celular de *S. Typhimurium* ao diminuir o pH do suco gástrico (pH 5,0, 3,0 e 2,0) e, também, o aumento da viabilidade quando exposta ao suco intestinal. Duas estirpes diferentes de *S. Typhimurium* (sensível a antibiótico e resistente a antibiótico), quando expostas ao suco gástrico (pH 2,0), registaram uma redução atingindo valores abaixo dos limites de detecção (10 UFC/mL) em 1-4 h (He & Ahn, 2011). Contudo, mostrou-se bastante resistente ao suco intestinal (He & Ahn, 2011). No estudo de Perez *et al.*, (2010) também foi observada uma redução significativa após apenas 2 min de exposição ao suco gástrico (pH 1,5).

Estes estudos reportaram um comportamento diferente do obtido no presente estudo que reportaram reduções elevadas da viabilidade bacteriana ou a completa eliminação que pode estar associado ao tipo de alimento e às diferenças entre estirpes.

3.6 Atividade antioxidante

Relativamente às quatro películas edíveis avaliadas, estas mostraram possuir boas propriedades de preservação das maçãs cortadas, em comparação com as maçãs controlo (Figura 3.6.22.), nomeadamente o revestimento com as películas de alginato de sódio (2%) suplementadas com os óleos essenciais (Figura 3.6.22B-D) protege as maçãs da oxidação que pode ser observada na maçã revestida apenas com a película sem adição de óleo (Figura 3.6.22A) e nas maçãs controlo (Figura 3.6.22E).

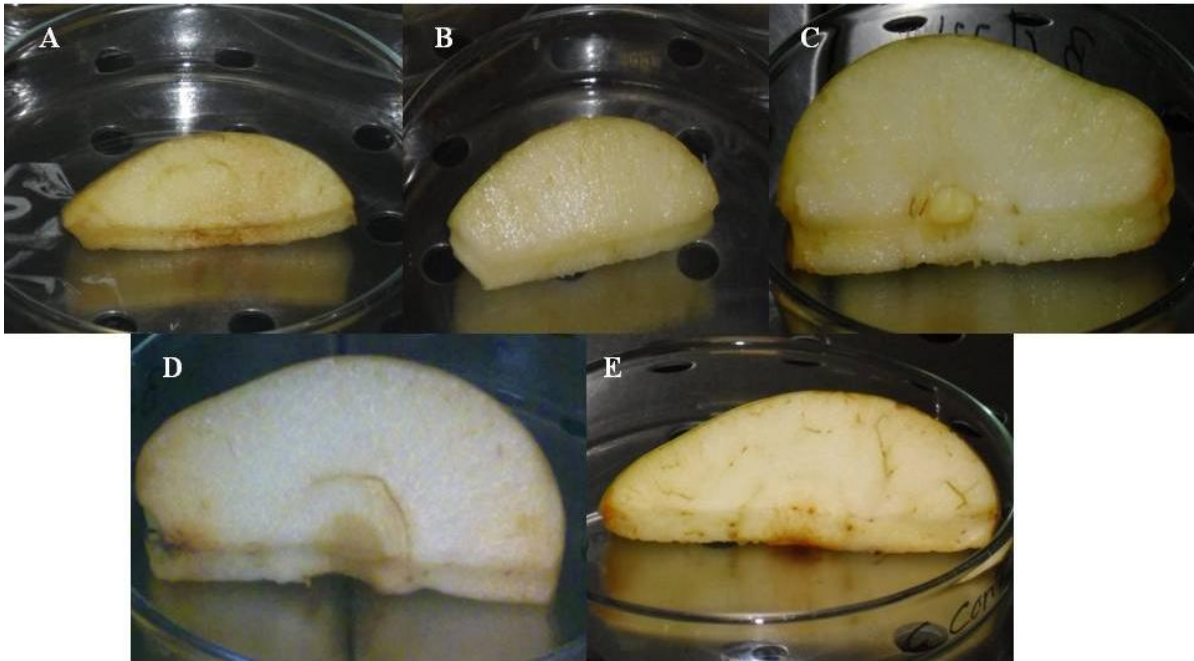


Figura 3.6.22. Maçãs 'Bravo de Esmolfe' cortadas e revestidas A- Película alginato de sódio (2%) sem óleo essencial, B- Película alginato de sódio (2%) suplementada com 0,1% eugenol, C- Película alginato de sódio (2%) suplementada com 0,2% eugenol, D- Película alginato de sódio (2%) suplementada com 0,1% eugenol e 0,15% citral, E- sem revestimento (controle) ao fim de 3 dias de armazenamento a 4°C.

A aplicação das películas nas maçãs cortadas de 'Golden Delicious' impediu o desenvolvimento da oxidação do fruto durante o período de armazenamento, como pode ser observado na Figura 3.6.23A-D.

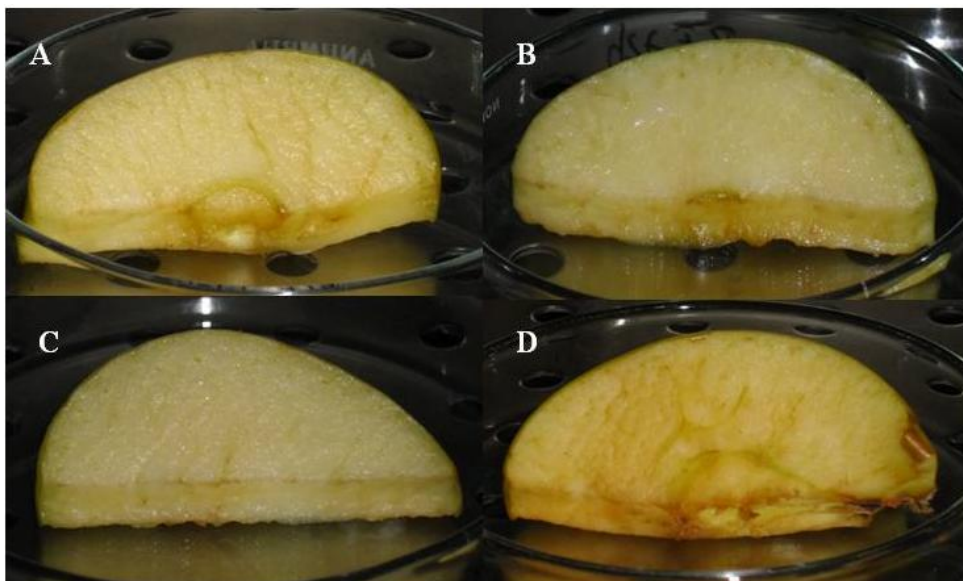


Figura 3.6.23. Aspeto das maçãs 'Golden Delicious' minimamente processadas com a aplicação das três diferentes películas após 3 dias armazenadas a 4°C. A – Película sem óleo essencial; B – Película com 0,2% eugenol; C – Película com 0,1% eugenol e 0,15% citral; D – Controle.

3.6.1 TEAC

A atividade antioxidante nas maçãs revestidas com as películas e sob exposição aos sucos gastrointestinais foi determinada pelo método TEAC. Os resultados são apresentados na Tabela 3.6.4.

As amostras na presença da saliva apresentaram uma atividade antioxidante baixa ou a sua inexistência. Os resultados obtidos com as amostras de maçãs revestidas com as películas demonstraram que não existe qualquer indício de atividade antioxidante, o que se acredita ser devido à complexidade da saliva que provoca a anulação desta atividade.

Quando expostas ao suco gástrico, as amostras registaram um aumento da atividade antioxidante. As maçãs controlo registaram uma atividade antioxidante superior ($P < 0,05$) à observada nas maçãs revestidas com as duas películas testadas. Contudo, esta diminuiu na presença do suco intestinal. As amostras controlo e película de alginato de sódio (2%) suplementada com 0,1% eugenol e 0,15% citral mostraram possuir diferenças significativas ($P < 0,05$), mas não se observou o mesmo entre o controlo e a amostra película de alginato de sódio (2%) suplementada com 0,2% eugenol e, também, entre as amostras das películas ($P > 0,05$).

Tabela 3.6.4. Atividade antioxidante determinada pelo método TEAC das amostras de maçã 'Bravo de Esmolfe' na ausência e presença das películas de alginato de sódio (2%) suplementadas com 0,2% eugenol e com 0,1% eugenol e 0,15% citral quando expostas aos sucos gastrointestinais.

	Saliva	Suco gástrico	Suco intestinal
Maçãs controlo	7,00 ± 1,83	45,76 ± 1,06 ^a	20,97 ± 2,60 ^c
Maçãs revestidas com a película suplementada com 0,2% eugenol	Negativo*	41,97 ± 0,70 ^b	14,44 ± 2,58 ^c
Maçãs revestidas com a película suplementada com 0,1% eugenol e 0,15% citral	Negativo*	39,40 ± 0,21 ^b	10,48 ± 5,21 ^d

Os valores resultam da média do valor de duas réplicas ± desvio padrão da média. Os resultados são expressos em percentagem de inibição (%). Negativo* - os valores foram negativos. Em cada coluna para cada amostra de maçã, os valores assinalados com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

3.6.2 ORAC

Ao contrário do que se observou pelo método TEAC, a atividade antioxidante determinada pelo método ORAC não mostrou qualquer diferença entre os sucos gastrointestinais ($P > 0,05$). Ou seja, a presença das películas não contribuiu para um elevado efeito antioxidante. Como se pode observar na Tabela 3.6.5, os valores são semelhantes com os obtidos na ausência das películas.

Tabela 3.6.5. Atividade antioxidante determinada pelo método ORAC das amostras de maçã ‘Bravo de Esmolfe’ na ausência e na presença das películas de alginato de sódio (2%) suplementadas com 0,2% eugenol e com 0,1% eugenol e 0,15% citral quando expostas aos sucos gastrointestinais.

	Saliva	Suco gástrico	Suco intestinal
Maçãs controle	27,34 ± 8,98 ^a	21,57 ± 0,47 ^a	21,99 ± 0,15 ^a
Maçãs revestidas com a película suplementada com 0,2% eugenol	21,92 ± 0,16 ^a	21,19 ± 0,79 ^a	21,67 ± 0,73 ^a
Maçãs revestidas com a película suplementada com 0,1% eugenol e 0,15% citral	22,14 ± 0,10 ^a	21,92 ± 0,15 ^a	21,10 ± 0,04 ^a

Os valores resultam da média do valor de duas réplicas ± desvio padrão da média. Os resultados são expressos em μM Trolox. Em cada coluna para cada amostra de maçã, os valores assinalados com mesma letra são significativamente iguais ($P > 0,05$).

O estudo de Serra *et al.*, 2010 demonstrou a elevada atividade antioxidante presente nas maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ determinada pelo método ORAC. Neste estudo, a atividade de $1503 \pm 48 \mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$. Este valor, como se pode verificar, é muito superior quando comparado com os valores obtidos no presente estudo, isto pode ser explicado pela diferença de elaboração do método e, também, pelas práticas culturais e diferentes estados de maturação do fruto.

Os resultados obtidos pelos métodos TEAC e ORAC foram distintos e isto deve-se à diferença de ação entre os métodos. Mas, em ambos, é necessário considerar a possibilidade da interferência dos sucos intestinais em cada uma das técnicas.

Capítulo IV – Conclusões

4.1 Conclusões

As películas edíveis suplementadas com óleos essenciais, para além de contribuírem para a preservação dos frutos, possuem características antibacterianas protegendo os frutos ao inibir o crescimento de bactérias de deterioração.

O estudo da sobrevivência das bactérias *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ armazenadas a 20°C demonstrou que estas possuem capacidades de sobrevivência diferentes. A bactéria *L. monocytogenes* conseguiu sobreviver durante 7 dias, ao contrário da bactéria *S. Typhimurium*, cuja viabilidade não foi recuperada, ao fim dos 7 dias.

Quando foi realizada a avaliação do revestimento das maçãs com a película suplementada com 0,1% eugenol e com a película sem adição de óleos essenciais, em maçãs ‘Bravo de Esmolfe’, os resultados evidenciaram que a presença de eugenol (0,1%) não foi suficiente para controlar a presença das duas bactérias em estudo. Pelo que foi necessário aumentar a concentração de eugenol e adicionar uma outra película suplementada com a mistura de eugenol e citral, na proporção de 0,1% de eugenol e 0,15% de citral.

A avaliação da película suplementada com 0,2% de eugenol e da película suplementada com 0,1% eugenol e 0,15% citral evidenciou um efeito antibacteriano superior ao observado no estudo anterior. Estas possuem um efeito antibacteriano semelhante, acompanhado de uma redução das bactérias patogénicas. No entanto, a sua ação foi mais significativa no controlo da bactéria *S. Typhimurium*, em comparação com a bactéria *L. monocytogenes*.

Ao contrário do que se observou nas maçãs ‘Bravo de Esmolfe’, a película suplementada com 0,2% eugenol e a película suplementada com 0,1% eugenol e 0,15% citral não se mostraram eficazes no controlo de ambas as bactérias em maçãs ‘Golden Delicious’. Apesar de apresentarem uma redução significativa em relação ao observado na ausência de tratamento, observou-se um efeito antibacteriano semelhante entre as películas testadas e a película sem a presença de qualquer óleo essencial. Este fato leva à conclusão que a presença dos óleos essenciais (eugenol e citral) nas películas, quando testadas nesta cultivar, não tem qualquer efeito no controlo do desenvolvimento das

bactérias. A ineficácia das películas nesta cultivar pode ser explicada pelo seu elevado pH, o que difere da maçã ‘Bravo de Esmolfe’.

Em relação ao efeito da simulação do sistema gastrointestinal na sobrevivência das bactérias nas maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ revestidas com as películas em estudo, foi observada que a viabilidade bacteriana dependeu do valor de pH do suco gástrico, nomeadamente em comparação com a sobrevivência das bactérias nas maçãs não revestidas com as películas. Quando o pH do suco gástrico foi de pH 2,5, tanto a bactéria *L. monocytogenes* como a bactéria *S. Typhimurium* apresentaram uma elevada resistência, conseguindo sobreviver nestas condições. As diferenças entre as bactérias foram mais pronunciadas quando foi avaliado o efeito do pH de 1,5 do suco gástrico na sobrevivência das bactérias. A viabilidade da bactéria *L. monocytogenes* nas maçãs revestidas com qualquer uma das películas estudadas não foi recuperada após a exposição ao suco gástrico, ao contrário da viabilidade das células que estavam presentes nas maçãs controlo que se manteve estável ao longo do processo de simulação do sistema gastrointestinal. O mesmo não se verificou com a bactéria *S. Typhimurium*, pois esta conseguiu sobreviver a estas condições mesmo nas maçãs revestidas com qualquer uma das películas.

Conclui-se, então, que a utilização das películas nas maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ é benéfica no controlo da bactéria *L. monocytogenes*, mas tem limitações no controlo da bactéria *S. Typhimurium*.

Quando avaliada a atividade antioxidante, das maçãs revestidas com as películas suplementadas com os óleos essenciais (eugenol e citral) sob exposição aos sucos gastrointestinais evidenciou uma ausência desta atividade pelos métodos TEAC e ORAC.

4.2 Perspetivas futuras

Uma vez que foi observada a não recuperação da bactéria *L. monocytogenes* 12.04 nas maçãs revestidas com as películas suplementadas com os óleos essenciais sujeitas à exposição ao suco gástrico a pH 1,5 será útil verificar se esta suscetibilidade se confirma noutras estirpes com origem alimentar. Por outro lado, a elevada

sobrevivência da bactéria *S. Typhimurium* nas mesmas condições sugere uma futura avaliação da sua capacidade de adesão e invasão de células Caco-2.

Outro aspeto que poderá ser alvo de futura avaliação será a interferência dos sucos gastrointestinais na atividade antioxidante determinada pelos métodos TEAC e ORAC, bem como utilizar outros métodos, tais como o método 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) com o fruto sem e com revestimento e, em condições de exposição aos sucos gastrointestinais (digerido) e sem exposição aos sucos (não digerido).

Capítulo V - Bibliografía

Abadias, M., Alegre, I., Usall, J., Torres, R., Viñas, I., 2011. Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apple. *Postharvest Biology and Technology* 59, p. 289-297;

Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Viñas, I., 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology* 123, p. 121-129;

Adams, M. R., Moss, M. O., 2008. Food Microbiology. 3ª edição. Inglaterra. *The Royal Society of Chemistry*;

Alegre, I., Abadias, M., Anguera, M., Oliveira, M., Viñas, I., 2010. Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples. *Food Microbiology* 27, p. 70-76;

Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M., Altisent, R., Abadias, M., 2013. Antagonistic effect of *Pseudomonas graminis* CPA-7 against foodborne pathogens in fresh-cut apples under simulated commercial conditions. *Food Microbiology* 33, p. 139-148;

Allerberger, F., 2003. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 35, p. 183-189;

Allerberger, F., Wagner, M., 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, p. 16-23;

Álvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Prieto, M., Messens, W., López, M., Bernardo, A., Hill, C., 2011. *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology* 157, p. 3268-3281;

Antunes, M.D.C., Cavaco, A.M., 2010. The use of essential oils for postharvest decay

control. A review. *Flavour Fragr. J.* 25, p. 351–366;

Apolónio, J., Faleiro, M. L., Miguel, M. G., Neto, L., 2014. No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. *FEMS Microbiol Lett*, p.1-10;

Assis, O. B. G., Britto, D. de, 2011. Evaluation of the antifungal properties of chitosan coating on cut apples using a non-invasive image analysis technique. *Polym Int* 60, p. 932-936;

Aviles, B., Klotz, C., Eifert, J., Williams, R., Ponder, M., 2013. Biofilms promote survival and virulence of *Salmonella enterica* sv. Tennessee during prolonged dry storage and after passage through an in vitro digestion system. *International Journal of Food Microbiology* 162, p. 525-259;

Bachiega, T. F., Sousa, J. P. B. de, Bastos, J. K., Sforcin, J. M., 2012. Clove and eugenol in noncytotoxic concentrations exert immunomodulatory/anti-inflammatory action on cytokine production by murine macrophages. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 64, p. 610-616;

Bakker, H. C. den, Cummings, C. A., Ferreira, V., Vatta, P., Orsi, R. H., Degoricija, L., Barker, M., Petrauskene, O., Furtado, M. R., Wiedmann, M., 2010. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics* 11, p. 1471-2164;

Bakker, H. C. den, Manuel, C. S., Fortes, E. D., Wiedmann, M., Nightingale, K. K., 2013. Genome sequencing identifies *Listeria fleischmannii* subsq. *coloradonensis* subsq. nov., isolated from a ranch. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, p. 3257-3268;

Barbau-Piednoir, E., Botteldoorn, N., Yde, M., Mahillon, J., Roosens, N. H., 2013. Development and validation of qualitative SYBR®Green Real-Time PCR for detection and discrimination of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology* 97, p. 4021-4037;

- Baron, S., 1996. Medical Microbiology. 4ª edição. Texas. Universidade do Texas;
- Bassolé, I., Juliani, H., 2012. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules* 17, p. 3989-4006;
- Bearson, S. M. D., Bearson, B. L., Rasmussen, M. A., 2006. Identification of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Genes Important for Survival in the Swine Gastric Environment. *Applied and Environmental Microbiology* 72(4), p. 2829-2836;
- Berdanier, C. D., Dwyer, J., Feldman, E. B., 2008. Handbook of Nutrition and Food. 2ª edição. Boca Raton. *CRC Press, Taylor & Francis Group*;
- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M. R., Haug, M. C., Lawson, P. A., Lacroix, C., Meile, L., 2013. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, p. 526-532;
- Bhattacharyya, L., Rohrer, J. S., 2012. Applications of Ion Chromatography for Pharmaceutical and Biological Products. *John Wiley & Sons, Inc.*, p. 450-453;
- Boerlin, P., Rocourt, J., Grimont, F., Grimont, P. A. D., Jacquet, C., Piffaretti, J., 1992. *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42(1), p. 69-73;
- Boyer, J., Liu, R. H., 2004. Apple phytochemicals and their health benefits – Review. *Nutrition Journal* 3(5), p. 1-15;
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., Mietzner, T. A., 2010. Microbiologia Médica. 25ª edição. Brasil. *The McGraw-Hill Companies, Inc.*;
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, p. 223-253;
- Canizalez-Roman, A., Gonzalez-Nuñez, E., Vidal, J. E., Flores-Villaseñor, H., León-Sicairos, N., 2013. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheogenic

Escherichia coli strains isolated from food items in northwestern México. *Int. J. Food Microbiol.* 164, p. 36–45;

Center for Disease Control and Prevention 2011. Multistate outbreak of listeriosis associated with Jensen Farms Cantaloupe. *MMWR* 60(39):1357-1358;

Centers for Disease Control and Prevention, 2012. Multistate Outbreak of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Newport Infections Linked to Cantaloupe (Final Update) (disponível em <http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-cantaloupe-08-12/index.html>) [Acedido a 07.08.2014];

Centers for Disease Control and Prevention, 2006. Multistate Outbreak of *Salmonella* Typhimurium Infections Linked to Tomatoes (Final Update) (disponível em <http://www.cdc.gov/salmonella/typh2006/>) [Acedido a 07.08.2014];

CERTIF, Associação para a Certificação. (disponível em <http://www.certif.pt/haccp.asp>) [Acedido a 03.09.2014];

Chambel, L., Sol, M., Fernandes, I., Barbosa, M., Zilhão, I., Barata, B., Jordan, S., Perni, S., Shama, G., Adrião, A., Faleiro, L., Requena, T., Peláez, C., Andrew, P. W., Tenreiro, R., 2007. Occurrence and persistence of *Listeria* spp. In the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. *International Journal of Food Microbiology* 116, p. 52-63;

Chiumarelli, M., Hubinger, M. D., 2012. Stability, solubility, mechanical and barrier properties of cassava starch – Carnauba wax edible coatings to preserve fresh-cut apples. *Food Hydrocolloids* 28, p. 59-67;

Conway, W. S., Leverentz, B., Saftner, R. A., Janisiewicz, W. J., Sams, C. E., Leblanc, E., 2000. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut apple slices and its interaction with *Glomerella cingulata* and *Penicillium expansum*. *Plant Disease* 84, p. 177-181;

Cummings, J. H., Antoine, J. M., Azpiroz, F., Bourdet-Sicard, R., Brandtzaeg, P., Calder, P. C., Gibson, G. R., Guarner, F., Isolauri, E., Pannemans, D., Shortt, C., Tuijtelaars, S., Watzl, B., 2004. PASSCLAIM-gut health and immunity. *Eur J Nutr* 43 Sp 2: II/118 II/173;

Danyluk, M. D., Friedrich, L. M., Schaffner, D. W., 2014. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* on cut cantaloupe, honeydew and watermelon. *Food Microbiology* 38, p. 52-55;

Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., Pandian, S. K., 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology* 130, p. 107-115;

Dewamitta, S. R., Nomura, T., Kawamura, I., Hara, H., Tsuchiya, K., Kurenuma, T., Shen, Y., Daim, S., Yamamoto, T., Qu, H., Sakai, S., Xu, Y., Mitsuyama, M., 2010. Listeriolysin O-Dependent Bacterial Entry into the Cytoplasm Is Required for Calpain Activation and Interleukin-1 α Secretion in Macrophages Infected with *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* 78(5), p. 1884-1894;

Dhall, R. K., 2013. Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53, p. 435-450;

Divergiliis G., Barile S., Perozzi G., 2011. Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota. *Genes Nutr.* 6, p. 275–284;

Drogoudi, P. D., Pantelidis, G., 2011. Effects of position on canopy and harvest time on fruit physic-chemical and antioxidant properties in different apple cultivars. *Scientia Horticulturae* 129, p. 752-760;

Du, W. X., Olsen, C. W., Avena-Bustillos, R. J., Friedman, M., McHugh, T. H., 2011. Physical and Antibacterial Properties of Edible Films Formulated with Apple Skin Polyphenols. *Journal of Food Science* 76(2), p. 149-155;

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., Stackebrandt, E., 2006. The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3ª edição. Singapura, *Springer*;

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., Stackebrandt, E., 2006. The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. 3ª edição. Singapura, *Springer*;

Embuscado, M. E., Huber, K. C., 2009. Edible Films and Coatings for Food Applications. Nova Iorque, *Springer*;

Espina, L., Somolinos, M., Ouazzou, A. A., Condón, S., García-Gonzalo, D., Pagán, R., 2012. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices by combined treatments of citrus fruit essential oils and heat. *International Journal of Food Microbiology* 159, p. 9-16;

Fàbrega, A., Vila, J., 2013. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. *Clinical Microbiology Reviews* 26(2), p. 308-341;

Faleiro, M.L., 2012. Response of Foodborne Bacteria to Acid Shock In: Stress Response of Foodborne Microorganisms, Ed. Wong, HC. *Nova Science Publishers*, pp.35-70, Inc. ISBN 978-1-61122-810-6;

Faleiro, M. L., 2011. The mode of antibacterial action of essential oils. A. Méndez-Vilas, edição. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz: FORMATEX, p.1143-1156;

Faleiro, M. L., 2011. Response of Foodborne Bacteria to Acid Shock. In Stress Response of Foodborne Microorganisms, Ed. Wong, HC. *Nova Science Publishers*, Inc. ISBN 978-1-61122-810-6;

- Faleiro, M. L., Andrew, P. W., Power, D., 2003. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *International Journal of Food Microbiology* 84, p. 207-216;
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., Ibarz, A., 2011. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology* 22, p. 292-303;
- Feliciano, R. P., Antunes, C., Ramos, A., Serra, A. T., Figueira, M. E., Duarte, C. M. M., Carvalho, A. de, Bronze, M. R., 2010. Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1 – Nutritional, phytochemical and sensory evaluation. *Journal of Functional Foods* 2, p. 35-45;
- Fernandes, P. É., São José, J. F. B., Zerdas, E. R. M. A., Andrade, N. J., Fernandes, C. M., Silva, L. D., 2014. Influence of the hydrophobicity and surface roughness of mangoes and tomatoes on the adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and evaluation of cleaning procedures using surfactin. *Food Control* 41, p. 21-26;
- Flessa, S., Lusk, D. M., Harris, L. J., 2005. Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. *International Journal of Food Microbiology* 101, p. 255-262;
- Francis, G. A., Gallone, A., Nychas, G. J., Sofos, J. N., Colelli, G., Amodio, M. L., Spano, G., 2012. Factors Affecting Quality and Safety of Fresh-Cut Produce. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52, p. 595-610;
- Franklin, K., Lingohr, E. J., Yoshida, C., Anjum, M., Bodrossy, L., Clark, C. G., Kropinski, A. M., Karmali, M. A., 2011. Rapid Genoserotyping Tool for Classification of *Salmonella* Serovars. *Journal of Clinical Microbiology* 49(8), p. 2954-2965;
- Freitag, N. E., Port, G. C., Miner, M. D., 2009. *Listeria monocytogenes* – from saprophyte to intracellular pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 7;
- Gahan, C. G. M & Hill, C., 2014. *Listeria monocytogenes*: survival and adaptation in the gastrointestinal tract. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4(9);

Gandhi, M., Chikidas, M.L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113, p. 1-15;

Garlough, Robert (2011). *Modern Food Service Purchasing*. Estados Unidos da América. *Delmar, Cengage Learning*;

Gill, A. O., and Holley, R. A., 2006. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int. J. Food Microbiol.* 111, p. 170–174;

Goodburn, C., Wallace, Carol A., 2013. The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review. *Food Control* 32, p. 418-427;

Gray, M. L., Killinger, A. H., 1966. *Listeria monocytogenes* and Listeric Infections. *Bacteriological Reviews* 30(2), p. 309-382;

Guerreiro, A., Gago, C., Miguel, M. G. C., Antunes, M. D. C., 2013. The effect of temperature and film covers on the storage ability of *Arbutus unedo* L. fresh fruit. *Scientia Horticulturae* 159, p. 96-102;

Guo, X., Chen, J., Brackett, R. E., Beuchat, L. R., 2001. Survival of Salmonellae on and in Tomato Plants from the Time of Inoculation at Flowering and Early Stages of Fruit Development through Fruit Ripening. *Applied and Environmental Microbiology* 67(10), p. 4760-4764;

Halter, E. L., Neuhaus, K., Scherer, S., 2013. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, p. 641-647;

Hassan, A. N., & Frank, J. F., 2004. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 grown in tryptic soy broth and nutrient broth to apple and lettuce surfaces as related to cell hydrophobicity, surface charge, and capsule production. *International Journal of Food Microbiology* 96, p. 103-109;

He, X. & Ahn, J., 2011. Survival and virulence properties of multiple antibiotic-resistant *Salmonella* Typhimurium under simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Science & Technology* 46, p. 2164-2172;

Hemaiswarya, S., Doble, M., 2009. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine* 16(11), p. 997-1005;

Ho, P., Vieira, M., 2006. Case Studies in Food Safety and Environmental Health. Portugal, *Springer*;

Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Prior, R. L., 2002. High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *J. Agric. Food Chem.* 50, p. 4437-4444;

Hui, Y. H., Barta, J., Cano, M., Gusek, T., Sidhu, J. S., Sinha, N., 2006. Handbook of Fruits and Fruit Processing. 1^a Edição, Iowa, *Blakwell Publishing*;

Hur, J., Jawale, C., Lee, J. H., 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Research International* 45, p 819-830;

Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. L., 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 3(12);

Ito, M., Murakami, K., Yoshino, M., 2005. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food and Chemical Toxicology* 43, p. 461-466;

Jackson, B. R., Griffin, P. M., Cole, D., Walsh, K. A., Chai, S. J., 2013. Outbreak-associated *Salmonella enterica* Serotypes and Food Commodities, United States, 1998-2008. *Emerging Infectious Diseases* Volume 19, p. 1239- 1244;

Jaradat, Z. W., Bhunia, A. K., 2003. Adhesion, Invasion, and Translocation Characteristics of *Listeria monocytogenes* Serotypes in Caco-2 Cell and Mouse Models. *Applied and Environmental Microbiology* 69(6), p. 3640-3645;

Jin, D., Luo, Y., Zhang, Z., Fang, W., Ye, J., Wu, F., Ding, G., 2012. Rapid molecular identification of *Listeria* species by use of real-time PCR and high-resolution melting analysis. *FEMS microbiology Letters* 330(1), p. 72-80;

Jong, H., Parry, C. M., Poll, T., Wiersinga, W. J., 2012. Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLOS Pathogens* 8(10);

Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H., 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76, p. 626–631;

Kalia, A., Parshad, V. R., 2013. Novel Trends to Revolutionize Preservation and Packaging of Fruits/Fruit Products: Microbiological and Nanotechnological Perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55, p. 159-182;

Lang, G., Buchbauer, G., 2012. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 27, p. 13-39;

Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A. D., Flèche-Matéos, A. L., Roche, S. M., Buchrieser C., Cadet-Daniel, V., Monnier, A. L., Lecuit, M., Allerberger, F., 2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, p. 2210-2214;

Lecuit, M., 2007. Human listeriosis and animal models. *Microbes and Infection* 9, p. 1216-1225;

Lee, S. Y., 2004. Microbial safety of pickled fruits and vegetables and hurdle technology. *J. Food Safety* 4, p. 21-32;

Leff, J. W., Fierer, N., 2013. Bacterial Communities Associated with the Surfaces of Fresh Fruits and Vegetables. *Plos One* 8(3);

Liu, D., 2008. Handbook of *Listeria monocytogenes*. Boca Raton. *CRC Press, Taylor & Francis Group*;

Liu, J., Dong, H., Chen, B., Zhao, P., Liu, R. H., 2009. Fresh Apples Suppress Mammary Carcinogenesis and Proliferative Activity and Induce Apoptosis in Mammary Tumors of the Sprague-Dawley Rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(1), p. 297-304;

Lomonaco, S., Verghese, B., Gerner-Smidt, P., Tarr, C., Gladney, L., Joseph, L., Katz, L., Turnsek, M., Frace, M., Chen, Y., Brown, E., Meinersmann, R., Berrang, M., Knabel, S., 2013. Novel Epidemic Clones of *Listeria monocytogenes*, United States, 2011. *Emerging Infectious Diseases* 19(1), p. 147-150;

López-Casado, G., Matas, A. J., Domínguez, E., Cuartero, J., Heredia, A., 2007. Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit cuticles: the role of the cutin matrix and polysaccharides. *Journal of Experimental Botany* 58(14), p. 3875-3883;

Low, J. C., Donachie, W., 1997. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *The Veterinary Journal* 153, p. 9-29;

Mehyar, G. F., Al-Qadiri, H. M., Abu-Blan, H. A., Swanson, B. G., 2011. Antifungal Effectiveness of Potassium Sorbate Incorporated in Edible Coatings Against Spoilage Molds of Apples, Cucumbers, and Tomatoes during Refrigerated Storage. *Journal of Food Science* 76(3), p. 210-217;

Melo, J., Schrama, D., Hussey, S., Andrew, P. W., Faleiro, M. L., 2013. *Listeria monocytogenes* dairy isolates show a different proteome response to sequential exposure to gastric and intestinal fluids. *International Journal of Food Microbiology* 163, p. 51-63;

Miles, A., Misra, S., Irwin, I., 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene* 38, p. 732-749;

Miliotis, M., Bier, J. W., 2003. International Handbook of Foodborne Pathogens. Estados Unidos, *Marcel Dekker, Inc.*;

Moldão-Martins, M., Beirão-da-Costa, S. M., Beirão-da-Costa, M. L., 2003. The effects of edible coatings on postharvest quality of the “Bravo de Esmolfe” apple. *Eur. Food Res. Technol.* 217, p. 325-328;

Moon, S., Kim, H., Cha, J., 2011. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Archives of Oral Biology* 56(9), p. 907-916;

Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfäuer M. A., 2010. Medical Microbiology, 6ª edição. *Elsevier Inc Chap IV*;

Nagasako-Akazome, Y., Kanda, T., Ohtake, Y., Shimasaki, H., Kobayashi, T., 2007. Apple polyphenols influence cholesterol metabolism in healthy subjects with relatively high body mass index. *Journal of Oleo Science* 56(8), p. 417-428;

Nazer, A. I., Kobilinsky, A., Tholozan, J. L., Dubois-Brissonnet, F., 2005. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect?. *Food Microbiology* 22(5), p. 391-398;

Olaimat, Amin N., Holley, Richard A., 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology* 32, p. 1-19;

Olivas, G. I. & Barbosa-Cánovas, G. V., 2005. Edible Coatings for Fresh-Cut Fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, p. 657-670;

Oliveira, M., Wijnands, L., Abadias, M., Aarts, H., Franz, E., 2011. Pathogenic potential of *Salmonella* Typhimurium DT104 following sequential passage through soil,

packaged fresh-cut lettuce and a model gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology* 148, p. 149-155;

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49, p. 4619-4626;

Pádua, M. M., 2009. Patologia Clínica para Técnicos, Bacteriologia. 2ª edição. Loures. Lusociência;

Perez, K. J., Ceccon, R. V., Malheiros, P. S., Jong, E. V., Tondo, E. C., 2010. Influence of Acid Adaptation on the survival of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in simulated gastric fluid and in *Rattus norvegicus* intestine infection. *Journal of Food Safety* 30, p. 398-414;

Perez-Rodriguez, F., Begum, M., Johannessen, G. S., 2014. Study of the cross-contamination and survival of *Salmonella* in fresh apples. *International Journal of Food Microbiology* 184, p. 92-97;

Peterson, L.D., Faith, N.G., Czuprynski, C. J., 2007. Resistance of *Listeria monocytogenes* F2365 cells to synthetic gastric fluids is greater following growth on ready to eat deli turkey meat than in Brain Heart Infusion Broth. *J. Food Protection* 70, p. 2589-2595;

Pilgrim, S., Kolb-Mäurer, A., Gentshev, I., Goebel, W., Kuhn, M., 2003. Deletion of the Gene Encoding p60 in *Listeria monocytogenes* Leads to Abnormal Cell Division and Loss of Actin-Based Motility. *Infection and Immunity* 71(6), p. 3473-3484;

Pizarro-Cerdá, J., Kühbacher, A., and Cossart, P. (2012). Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2;

Pranoto, Y., Salokhe, V., Rakshit, K.S., 2005. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International* 38, p. 267–272;

Pui, C. F., Wong, W. C., Chai, L. C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Hidayah, M. S., Ubong, A., Farinazleen, M. G., Cheah, Y. K., Son, R., 2011. *Salmonella*: A foodborne pathogen, Review Article. *International Food Research Journal* 18, p. 465-473;

Qi, H., Hu, W., Jiang, A., Tian, M., Li, Y., 2011. Extending shelf-life of Fresh-cut ‘Fuji’ apples with chitosan-coatings. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, p. 62-66;

Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P., 2010. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *J. Biosci. Bioeng.* 110, p. 614–619;

Raybaudi-Massilia, R., Calderón-Gabaldón, M. I., Mosqueda-Melgar, J., Tapia, M. S., 2013. Inactivation of *Salmonella enterica* ser. Poona and *Listeria monocytogenes* on fresh-cut “Maradol” red papaya (*Carica papaya* L) treated with UV-C light and malic acid. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 8, p. 37-44;

Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O., 2009. Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobials. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety* 8, p. 157-180;

Raybaudi-Massilia, R., Rojas-Graü, M., Mosqueda-Melgar, J., Martín-Belloso, O., 2008. Comparative Study on Essential Oils Incorporated into an Alginate-Based Edible Coating To Assure the Safety and Quality of Fresh-Cut Fuji Apples. *Journal of Food Protection* 71(6), p. 1150-1161;

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant Activity Applying an improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26(9/10), p. 1231-1237;

- Reis, S. F. A. R., Rocha, S. M., Barros, A. S., Delgadillo, I., Coimbra, M. A., 2009. Establishment of the volatile profile of 'Bravo de Esmolfe' apple variety and identification of varietal markers. *Food Chemistry* 113, p. 513-521;
- Rhen, M., Maskell, D., Mastroeni, P., Threlfall, J., 2007. *Salmonella: Molecular Biology and Pathogenesis*. Inglaterra. *Horizon Bioscience*;
- Roberts, A., Nightingale, K., Jeffers, G., Fortes, E., Kongo, J. M., Wiedmann, M., 2006. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology* 152, p. 685-693;
- Rocha, A. M. C. N., Barreiro, M. G., Morais, A. M. M. B., 2004. Modified atmosphere package for apple 'Bravo de Esmolfe'. *Food Control* 15, p. 61-64;
- Roering, A. M., Luchansky, J. B., Ihnot, A. M., Ansay, S. E., Kaspar, C. W., Ingham, S. C., 1999. Comparative survival of *Salmonella typhimurium* DT 104, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in preservative-free apple cider and simulated gastric fluid. *International Journal of Food Microbiology* 46, p. 263-269;
- Rojas-Graü, M. Raybaudi-Massilia, R., Soliva-Fortuny, R., Avena-Bustillos, R., McHugh, T., Martín-Belloso, O., 2007. Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology* 45(2), p. 254-264;
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O., 2009. Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology* 20, p. 438-447;
- Ryser, E. T., Marth, E. H., 2007. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. 3ª edição. Boca Raton. *CRC Press, Taylor & Francis Group*;
- Saddiq, A. A., Khayyat, S. A., 2010. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98, p. 89-93;

Samara, A. & Koutsoumanis, K. P., 2009. Effect of treating lettuce surfaces with acidulants on the behavior of *Listeria monocytogenes* during storage at 5 and 20 °C and subsequent exposure to simulated gastric fluid. *International Journal of Food Microbiology* 129, p. 1-7;

Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M., 2001. Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings. *Food Eng. Rev.* 3, p. 1-16;

Sanla-Ead, N., Jangchud, A., Chonhenchob, V., Suppakul, P., 2012. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-based Packaging Films. *Packaging Technology and Science* 25, p. 7-17;

Serra, A. T., Matias, A. A., Frade, R. F. M., Duarte, R. O., Feliciano, R. P., Bronze, M. R., Figueira, M. E., Carvalho, A. de, Duarte, C. M. M., 2010. Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 2 – Antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Functional Food* 2, p. 46-53;

Serra, A. T., Rocha, J., Sepodes, B., Matias, A. A., Feliciano, R. P., Carvalho, A. De, Bronze, M. R., Duarte, C. M. M., Figueira, M. E., 2012. Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties – Correlation of response with composition. *Food Chemistry* 135, p. 2378-2386;

Skandamis, P.N. & Nychas, G. J., 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology* 91, p. 1011 –1022;

Smith, J. L., Liu, Y., Paoli, G., 2013. How does *Listeria monocytogenes* combat acid conditions?. *Can. J. Microbiol.* 59, p. 141-152;

Somolinos, M., García, D., Condón, S., Mackey, B., Pagán, R., 2010. Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology* 108, p. 1928-1939;

Stopforth, J. D., Yoon, Y., Barmpalia, I. M., Samelis, J., Skandamis, P. N., Sofos, J. N., 2009. Reduction of *Listeria monocytogenes* populations during exposure to a simulated

gastric fluid following storage of inoculated frankfurters formulated and treated with preservatives. *International Journal of Food Microbiology* 99, p. 309-319;

Strawn, L. K., Danyluk, M. D., 2010. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. On fresh and frozen cut mangoes and papayas. *International Journal of Food Microbiology* 138, p. 78-84;

Sun, J., Liu, R. H., 2008. Apple Phytochemical Extracts Inhibit Proliferation of Estrogen-Dependent and Estrogen-Independent Human Breast Cancer Cells through Cell Cycle Modulation. *Journal Agricultural and Food Chem.* 56(24), p. 11661-11667;

Tassou, C., Drosinos, E. H., Nychas, G. J., 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 degrees and 10 degrees C. *Journal of Applied Bacteriology* 78(6), p. 593–600;

Tassou, C., Drosinos, E.H., Nychas, G. J., 1996. Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish fillets in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere or air. *Journal of Food Protection* 59 (1), p. 31 – 34;

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., Nunes, M. L., 2013. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products* 43, p. 587-595;

Thévenot, D., Dernburg, A., Vernozy-Rozand, C., 2006. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology* 101, p. 7-17;

Tian, J., Bae, Y., Lee, S., 2013. Survival of foodborne pathogens at different relative humidities and temperatures and the effect of sanitizers on apples with different surface conditions. *Food Microbiology* 35, p. 21-26;

Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., Bisignano, G., 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(6), p. 2474–2478;

Tsigarida, E. & Skandamis, P., Nychas, G. J., 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. *Journal of Applied Microbiology* 89, 901 –909;

Upadhyay, A., Upadhyaya, I., Kollanoor-Johny, A., Venkitanarayanan, K., 2013. Antibiofilm effect of plant derived antimicrobials on *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 36(1), p. 79-89;

Velge, P., Wiedemann, A., Rosselin, M., Abed, N., Boumart, Z., Chaussé, A. M., Grépinet, O., Namdari, F., Roche, S. M., Rossignol, A., Virlogeux-Payant, I., 2012. Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. *Microbiology Open* 1(3), p.243-258;

Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Kamp, E. Van de, Rompelberg, C. J. M., Sips, A. J. A. M., 2005. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology* 43, p. 31-40;

Wang, H., Feng, H., Liang, W., Luo, Y., Malyarchuk, V., 2009. Effect of Surface Roughness on Retention and Removal of *Escherichia coli* O157:H7 on Surfaces of Selected Fruits. *Journal of Food Science* 74(1);

Wang, X. M., Lu, X. F., Yin, L., Liu, H. F., Zhang, W. J., Si, W., Yu, S. Y., Shao, M. L., Liu, S. G., 2013. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria* isolates from retail raw foods. *Food Control* 32, p. 153–158;

Ward, T. J., Ducey, T. F., Usgaard, T., Dunn, K. A., Bielawski, J. P., 2008. Multilocus Genotyping Assays for Single Nucleotide Polymorphism-Based Subtyping of *Listeria monocytogenes* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 74(24), p. 7629-7642;

Wattiau, P., Boland, C., Bertrand, S., 2011. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Subtyping: Gold Standards and Alternatives. *Applied and Environmental Microbiology* 77(22), p. 7877-7885;

Wendakoon, C. N., and Morihiko, S., 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J. Food Prot.* 58, p. 280–283;

Wolfe, K., Wu, X., Liu, R. H., 2003. Antioxidant Activity of Apple Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, p. 609-614.