

Jean Carlos Correia Peres Costa

**EFEITO DO TRATAMENTO TERMOQUÍMICO (ÓLEO  
ESSENCIAL E CALOR) NO CRESCIMENTO MICROBIANO  
DURANTE A VIDA ÚTIL DE MEXILHÕES (*Perna perna*)  
PROCESSADOS EM EMBALAGENS FLEXÍVEIS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gláucia Maria Falcão de Aragão.

Co-orientador: Prof. Dr. João Borges Laurindo

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Costa, Jean Carlos Correia Peres Costa  
EFEITO DO TRATAMENTO TERMOQUÍMICO (ÓLEO ESSENCIAL E  
CALOR) NO CRESCIMENTO MICROBIANO DURANTE A VIDA ÚTIL DE  
MEXILHÕES (Perna perna) PROCESSADOS EM EMBALAGENS FLEXÍVEIS  
/ Jean Carlos Correia Peres Costa Costa ; orientadora,  
Gláucia Maria Falcão de Aragão ; co-orientador, João  
Borges Laurindo. - Florianópolis, SC, 2013.  
186 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Microbiologia Preditiva.  
3. Mexilhão (Perna perna). 4. Óleos Essenciais. 5. Vida  
Útil. I. Aragão, Gláucia Maria Falcão de . II. Laurindo,  
João Borges. III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV.  
Título.

Jean Carlos Correia Peres Costa

**EFEITO DO TRATAMENTO TERMOQUÍMICO (ÓLEO  
ESSENCIAL E CALOR) NO CRESCIMENTO MICROBIANO  
DURANTE A VIDA ÚTIL DE MEXILHÕES (*Perna perna*)  
PROCESSADOS EM EMBALAGENS FLEXÍVEIS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos, área de Concentração de Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 30 de Abril de 2013.

---

Prof. João Borges Laurindo, Dr.  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Gláucia Maria Falcão de Aragão, Dr.<sup>a</sup>  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Cleide Rosana Werneck Vieira, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Sandra Regina Salvador Ferreira, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Franciny Campos Schmidt, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina



Dedico este trabalho as  
minhas três mães Adélia (a  
quem tem o título de fato),  
Erotides (avó) e Anilda  
(tia) por todo apoio e  
incentivo e pela espera de  
um dia me verem voltando  
para casa.



## AGRADECIMENTOS

Esses humildes agradecimentos são para todos que estiveram ao meu lado nessa importante etapa da minha vida, me apoiando na vida profissional e pessoal, mesmo que fosse na bancada do laboratório, congressos e até na mesa de um bar. Agradeço a todos, e mesmo correndo riscos da omissão de nomes, agradeço especialmente:

A Deus pelo dom da vida e por todas as oportunidades que foram criadas ao longo de toda caminhada. Por ter me amparado em todas as etapas, sempre me dando forças para continuar.

À minha mãe por ser o modelo da minha conduta, por todo esforço que foi dado para eu chegar até aqui. Obrigado mãe por se fazer presente nos momentos em que mais precisei. Desculpe pelos momentos em que não pude estar ao seu lado quando precisou de mim. Te amo!

À minha avó Erotides por toda compreensão e incentivo. Pelos seus ensinamentos e sugestões. Pela disponibilidade em me escutar por horas quando dizia do meu trabalho. Obrigado por ter feito com que a distância fosse apenas uma questão de tempo. A senhora é uma queridona.

À minha tia Anilda, pelo carinho e pelas palavras que incentivaram nos momentos difíceis. Por toda preocupação e dedicação que tem comigo. A senhora foi importante para concluir mais essa etapa da minha vida. Logo poderemos comemorar juntos. Beijo no coração!

Aos meus tios, em especial tio Arterino e tia Marli por todo carinho, incentivo e preocupação.

A duas criaturinhas especiais Davy e Sara, que mesmo sem saber o que é um mestrado, diziam que estavam na torcida.

À minha avó Maria Madalena, pelos conselhos que sempre levarei comigo. Obrigado pelo carinho.

Aos demais familiares, em especial minha prima Adriana.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Gláucia, por toda confiança, paciência, ensinamento, incentivo e amizade. Obrigado por todas as oportunidades que foram oferecidas e por ter deixado fazer parte do seu grupo de pesquisa, que tanto me fez crescer e amadurecer. Obrigado por ter acreditado em mim.

Ao meu co-orientador Prof. João pelas sugestões dadas para execução desse trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Débora pela amizade, conselhos, conversas e boas risadas. Obrigado pela confiança e ensinamentos na realização do estágio docência. Com certeza foi um grande aprendizado.

Às componentes da banca examinadora: Professoras Sandra e Cleide e Doutora Franciny pela disposição, sugestões e correções dadas para complementar esse trabalho.

Ao Prof. Carlos Riehl da UFRJ pela gentileza em realizar as análises para composição química dos óleos essenciais.

À Prof<sup>a</sup>. Marilde por ter me aceitado em seu laboratório quando precisei auxiliar em disciplinas da graduação. Obrigado pelos ensinamentos e o carinho.

À Darlene pela ajuda inicial do trabalho. Pelo incentivo, sugestões e por ter acreditado que tudo daria certo.

Ao Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos (PROFI) pela disponibilidade em emprestar os equipamentos. Aos seus integrantes, em especial ao meu amigo Giustino pela grande ajuda no termoprocessamento das bolsas de mexilhão. Tenho que te agradecer por todo apoio, sugestões, dedicação, confiança e por todo ensinamento. Sua ajuda foi essencial para finalização desse trabalho. Fica aqui o meu muito obrigado!

À Fran, Marlene e a Martinha pelos bons “bate papo” e boas risadas.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO): Américo, Andréia, Ana Paula, Carolina, Cleciene, Daniela, Denise, Glenise, Jonathan, Kellen, Kelin, Mara, MéloDi, Morgana, Rossana, Rosana, Raquel e Will e todos os alunos de IC, em especial Mariele, Camila, Geórgia, Maria Eduarda e Amábiles, que em tempos diferentes auxiliaram no andamento da pesquisa com a preparação de material. E aos professores, Agenor, Débora, Gláucia, Jorge, José Miguel e Willibaldo.

À Dê, pelo apoio, carinho e conselhos. Obrigado pela ótima amizade!

Ao meu amigo Sr. “Zé” pela amizade, e pelo grande interesse em saber da minha pesquisa. Obrigado pelo cafezinho que sempre estava passado pela manhã quando precisava passar a noite no laboratório.

À família que criei em Floripa: a minha amiga Daniela (Peque), pela amizade, por ter dividido todos os momentos e pelo

carinho constante. Pelas taças de vinho que nos faziam esquecer da árdua caminhada que estávamos enfrentando, Glenise por seu espírito acolhedor e pela adorável companhia, muito obrigado por te ter como amiga, Fernanda por ter sempre uma palavra amiga, mesmo com as dificuldades encontradas e pelas aventuras na Ilha da Magia, José Ricardo e Paulo Victor pela irmandade que surgiu nas primeiras semanas que cheguei aqui e que continuará entre nós. Com vocês passei momentos alegres e tristes, mas foram todos especiais.

À “doidinha” da Stéphanie pelo seu carinho e pelo seu pensamento sempre positivo, de que tudo vai dar certo.

Aos meus amigos de Mestrado Pedro Henrique, Gláucia, Daniele e Frederico.

À Andréia Tremarin por sua valiosa amizade, companheirismo e seu humor admirável. Pelos dias que ficava até mais tarde no laboratório para me ajudar nos plaqueamentos para que eu fosse embora mais cedo para casa. Obrigado por toda preocupação que tem comigo e por ter me escutado em momentos difíceis.

À Ana Paula (BAL) pelas ótimas noites que passamos juntos no laboratório. Pelos finais de semana lendo artigos, pelas milhões de conversas jogadas fora e infinitas discussões da microbiologia preditiva e culturas mistas. Obrigado por tudo!

À Carol por todo apoio na reta final dos experimentos. Obrigado por acreditar no meu potencial.

À Kellen minha “modelo” pelo ótimo companheirismo e as pelas “viagens” que fazíamos juntos pela vida.

À Kellin pelas ótimas jantinhas realizadas para descontrair as semanas pesadas de trabalho.

Ao Bork, pela amizade sincera, mesmo que muita das vezes nossos horários não eram compatíveis para aquela “papeada”. Aqui meu abraço!

Aos meus professores de graduação, Armando, Vêronica, Valéria e em especial Maria Isabel por ter me apresentado os transmisses da pesquisa. Obrigado pelo incentivo de vocês.

Aos meus amigos de Goiás Aline, Dalila, Cássia, Taís Capra, Taís Stevan, Luis Antônio, Mallony, Nice que mesmo e longe, estavam sempre me apoiando. Um obrigado especial a minha grande amiga Arlete, pela sincera e verdadeira amizade, pelas sugestões e longas horas no telefone me escutando, obrigado pela força.

Ao Phaollo pelo incentivo nos momentos de desânimo e pela sincera amizade.

Ao Carlos Alberto pela amizade e pelos bons feriados que passamos em Floripa, mesmo tendo que ir ao laboratório antes de fazer qualquer coisa.

Ao povo brasileiro por intermédio da CAPES e FINEP pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização do mestrado.

À secretária do Programa Raquel, por todo serviço prestado.

Às amigas que Florianópolis me proporcionou (os últimos aqui citados são tão especiais quanto os primeiros) Lindomar, André Polloni, Rafaela, Ricardo, Paula, Rafael Saldanha, Fellipe, Rodrigo, Nina, Danizinha, Dudu, Daiane, Fábio, Jaime, Lívia, Taciana, Patrícia, Tiago, Jéssica, Amanda e Luciane.

Aos meus  $x+1^n$  plaqueamentos realizados, sem eles, esse trabalho não teria sentido algum.

Ficam aqui os meus sinceros e humildes agradecimentos para vocês que caminharam junto comigo por esse tempo. Meu  
muito obrigado!

Jean Carlos Correia Peres Costa



“Um pouco de ciência nos afasta  
de Deus. Muito, nos aproxima”.  
(Louis Pasteur)



## RESUMO

O estado de Santa Catarina é o maior produtor de moluscos bivalves do Brasil. Por ser um alimento altamente perecível, estratégias para prolongar a sua vida útil têm motivado vários estudos. A aplicação de óleos essenciais como conservantes naturais é uma alternativa eficaz na conservação de alimentos, devido ao seu poder antimicrobiano. O tratamento térmico rigoroso, muitas vezes aplicado para garantir a estabilidade microbiológica dos alimentos, pode levar à perda de nutrientes e afetar as características sensoriais desses produtos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de tratamento termoquímico (óleo essencial de orégano (O.E.O.) e tratamento térmico (pasteurização)) sobre a vida útil de mexilhões processados em embalagens flexíveis. Primeiramente, comparou-se a eficácia do óleo essencial de orégano e do óleo essencial de manjerição (O.E.M) em diferentes concentrações (0,2 e 0,4 % (v/m)) sobre os microorganismos patogênicos e deteriorantes em mexilhões pré-cozidos. Quatro tratamentos foram realizados: P1 (controle), P2 (0,2 % de O.E.O.), P3 (0,4 % de O.E.O.) e P4 (0,4 % de O.E.M.). As análises para patogênicos foram realizadas para amostra P1 (controle) no primeiro e sétimo dia de armazenamento e para as demais no sétimo dia. Os resultados mostraram que nas duas concentrações testadas, os óleos apresentaram potencial antimicrobiano. O O.E.O. na concentração de 0,4 % (v/m) foi ligeiramente melhor no atraso do crescimento dos grupos microbianos estudados. Quatro tratamentos foram realizados para as amostras de mexilhão (*Perna perna*): A1 (controle, sem O.E. e sem tratamento térmico), A2 (tratamento térmico), A3 (O.E.O. sem tratamento térmico), A4 (O.E.O. com tratamento térmico). Os mexilhões foram massageados com O.E.O.(amostras A3 e A4), embalados em embalagens flexíveis e submetidos à pasteurização (80 °C/10 minutos) e armazenados a 4, 10 e 15 °C. A vida útil dos mexilhões foi

acompanhada pelo crescimento microbiano até as contagens atingirem  $10^7$  UFC/g (bactérias ácido lácticas, contagem total de mesófilos, psicrófilos e psicrotróficos), pelo pH e comparada sensorialmente (visual e olfativamente), além da análise de patógenos para amostra A1. As contagens de Coliformes termotolerantes (45 °C) e *E. coli*, entre o primeiro e o sétimo dia de armazenamento, não ocorreram mudanças no crescimento. As Contagens de Estafilococos Coagulase Positiva e *Vibrio parahaemolyticus* mantiveram-se constantes em  $<3\text{NMP/g}$ . Os resultados não foram conclusivos em relação à ação antimicrobiana de inativação da *Listeria monocytogenes* pelo O.E.O. Através da análise sensorial, foi possível identificar odor desagradável que aparecia em tempos correspondentes à contagem microbiana elevada. Houve um decréscimo de pH para todas as amostras analisadas. A segunda etapa do estudo foi ajustar o modelo preditivo de crescimento de Baranyi e Roberts para se obter os parâmetros de crescimento e prever a vida útil de mexilhões processados. A vida útil dos mexilhões armazenados a 4 °C foi de 21 dias para a amostra A1 (controle) e A2 (tratamento térmico), 31 e 51 dias para as amostras A3 (O.E.O. sem tratamento térmico) e A4 (O.E.O. com tratamento térmico), respectivamente. A vida útil dos mexilhões armazenados a 10 °C foi de 5 dias para as amostras A1 e A2, 8 dias para a amostra A3 e 12 dias para a amostra A4. As amostras armazenadas a 15 °C tiveram uma vida útil reduzida, sendo de 2 dias para amostra A1, 5 dias para a amostra A2 e A3 e de 10 dias para A4. Pode-se concluir que o O.E.O. teve efeito antimicrobiano nos microorganismos estudados e que o tratamento termoquímico prolongou a vida útil de mexilhões para mais 30 dias, quando armazenados a 4 °C. Os resultados obtidos nesse trabalho são úteis para descrever a variação dos parâmetros microbiológicos com a temperatura de armazenamento de produtos tratados termoquimicamente e torna-se uma ferramenta útil para as indústrias processadoras de mariscos.

**Palavras-chave:** *Perna perna*, óleo essencial, pasteurização, embalagens flexíveis, vida útil, microbiologia preditiva.

## ABSTRACT

Santa Catarina state is the largest producer of bivalve molluscs in Brazil. For being a perishable food, strategies to prolong shelf life have motivated several studies. The application of essential oils as natural preservatives is an effective alternative in food preservation due to its antimicrobial power. The strict heat treatment, often applied to ensure food microbiological stability, can lead to nutrients losses and affect the sensory characteristics of the products. The objective of this work was to evaluate the effect of thermochemical treatment (oregano essential oil (O.E.O.) and heat treatment (pasteurization)) on processed mussel shelf life in flexible packaging. First, it was compared the efficacy of the essential oil of oregano and basil essential oil (B.E.O.) in different concentrations (0.2 and 0.4 % (v/w)) on spoilage and pathogenic microorganisms in pre-cooked mussels. Four treatments were used: P1 (control), P2 (0.2 % O.E.O.), P3 (0.4 % O.E.O.) and P4 (0.4 % B.E.O.). Pathogens were analyzed for sample P1 (control) in the first and seventh day of storage and the other on the seventh day. The results showed that, at tested concentrations, oils exhibited antimicrobial activity. The O.E.O. in the concentration of 0.4 % (v/w) was slightly better in the delay the growth of microbial groups studied. Four associated treatments were performed for samples of mussel (*Perna perna*): A1 (control), A2 (heat treatment), A3 (O.E.O. without heat treatment), A4 (O.E.O. with heat treatment). The mussels were massaged O.E.O (samples A3 and A4), packaged in flexible packagings and submitted to pasteurization (80 °C/10 min) and stored at 4, 10 and 15 °C. The shelf life of mussels was accompanied by microbial growth until the counts reach  $10^7$  CFU/g (lactic acid bacteria, total count of mesophilic, psychrotrophic and psychrophiles), the pH and compared sensory (visual and olfactory), besides the analysis of pathogenic sample A1. Counts Thermotolerant coliforms (45 °C), and *E. coli*,

between the first and seventh days of storage there were no changes in growth. Counts for Coagulase Positive *Staphylococci* and *Vibrio parahaemolyticus* remained constant at <3NMP / g. Results were inconclusive regarding to O.E.O. antimicrobial effects on *Listeria monocytogenes*. Through sensory evaluation, it was possible to identify odor that appeared at times corresponding to elevated microbial counts. A decrease in the pH for all samples was observed. Baranyi and Roberts model was fitted to growth curves to obtain growth parameters and predict the shelf life of processed mussels. The shelf life of the mussels stored at 4 °C was 21 days for sample A1 (control) and A2 (heat treatment), 31 and 51 days for the samples A3 (O.E.O. without heat treatment) and A4 (O.E.O. with thermal treatment), respectively. The shelf life of the mussels stored at 10 °C was 5 days for samples A1 and A2, 8 days for the sample A3 and 12 days for sample A4. Samples stored at 15 °C had a reduced shelf life, being 2 days to sample A1, 5 days for sample A2 and A3 and 10 days for sample A4. It can be concluded that the O.E.O. had antimicrobial effect on micro-organisms studied and that the thermochemical treatment prolong the shelf life of mussels for another 30 days when stored at 4 °C. The results of this study are useful for describing the variation of microbiological parameters with temperature storage products thermochemically treated and it becomes a useful tool for the seafood processing industries.

**Keywords:** *Perna perna*, essential oils, pasteurization, flexible packaging, shelf life, predictive microbiology.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Características morfológicas do mexilhão <i>Perna perna</i> .....	39
<b>Figura 2</b> – Mexilhão da espécie <i>Perna perna</i> , a esquerda, espécime do sexo feminino e a direita, espécime do sexo masculino.....	39
<b>Figura 3</b> – Fórmula estrutural de alguns componentes presentes em óleos essenciais.....	57
<b>Figura 4</b> – Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para ação de compostos naturais na célula bacteriana.....	58
<b>Figura 5</b> – Curva típica de crescimento microbiano em função do tempo.....	64
<b>Figura 6</b> – Embalagens tipo <i>stand up pouches</i> utilizadas no acondicionamento de mexilhões.....	74
<b>Figura 7</b> – Aparato experimental para processamento térmico dos mexilhões.....	76
<b>Figura 8</b> – Suporte para acomodação das embalagens durante o tratamento térmico.....	77
<b>Figura 9</b> – <i>Stand up pouche</i> e dos termopares para o ensaio da distribuição de calor.....	78
<b>Figura 10</b> – <i>Stand up pouche</i> contendo mexilhão e termopar acoplado por um “niple”.....	79
<b>Figura 11</b> – Evolução do crescimento de BAL em mexilhões embalados a vácuo, tratados com óleo essencial de orégano e manjerição.....	92
<b>Figura 12</b> – Evolução do crescimento de CT em mexilhões embalados a vácuo tratados com óleo essencial de orégano e manjerição.....	93
<b>Figura 13</b> – Perfis de temperatura do produto na <i>stand up pouche</i> contendo 150 g de mexilhão, da evolução do meio de aquecimento/resfriamento e valor de $F_{\text{processo}}$ .....	94
<b>Figura 14</b> – Valores de pH para mexilhões pré-cozidos tratados termicamente com O.E.O. ou não e armazenados a 4 °C (a), 10 °C (b) e 15 °C (c).....	103
<b>Figura 15</b> – Efeito do tratamento térmico associado ou não ao O.E.O. sobre o crescimento de BAL em mexilhões pré-cozidos armazenados a 4 °C (a), 10 °C (b) e 15 °C (c). As linhas contínuas coloridas representam o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados	

experimentais. A linha preta indica a contagem final que define a vida útil de mexilhões pré-cozidos. ....	109
<b>Figura 16</b> – Efeito do tratamento térmico associado ou não ao O.E.O. sobre a curva de contagem total (CT) de mexilhões pré-cozidos armazenados a 4 °C (a), 10 °C (b) e 15 °C (c). As linhas contínuas coloridas representam o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais. A linha preta indica a contagem final que define a vida útil de mexilhões pré-cozidos.....	110
<b>Figura 17</b> – Efeito do tratamento térmico associado ou não ao O.E.O. sobre o crescimento de PSC em mexilhões pré-cozidos armazenados a 4 °C (a), 10 °C (b) e 15 °C (c). As linhas coloridas representam o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais. A linha preta indica a contagem final que define a vida útil de mexilhões pré-cozidos. ....	112
<b>Figura 18</b> – Efeito do tratamento térmico associado ou não ao O.E.O. sobre o crescimento de PST em mexilhões pré-cozidos armazenados a 4 °C (a), 10 °C (b) e 15 °C (c). As linhas coloridas representam o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais. A linha preta indica a contagem final que define a vida útil de mexilhões pré-cozidos. ....	113
<b>Figura 19</b> – Influência da temperatura nos parâmetros de crescimento ( $\lambda$ e $\mu$ ) de BAL e na vida útil de mexilhão. ....	125
<b>Figura 20</b> – Influência da temperatura nos parâmetros de crescimento ( $\lambda$ e $\mu$ ) de CT e na vida útil de mexilhão. ....	127
<b>Figura 21</b> – Influência da temperatura nos parâmetros de crescimento ( $\lambda$ e $\mu$ ) de PSC e na vida útil de mexilhão. ....	129
<b>Figura 22</b> – Influência da temperatura nos parâmetros de crescimento ( $\lambda$ e $\mu$ ) de PST e na vida útil de mexilhão. ....	131

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Composição centesimal da carne de mexilhões <i>Perna perna</i> cozidos e resfriados.....	41
<b>Tabela 2</b> – Principais componentes presentes em óleos essenciais que apresentam potencial antimicrobiano. ....	56
<b>Tabela 3</b> – Modelos secundários usados para descrever a influência da temperatura nos parâmetros do crescimento microbiano. ....	83
<b>Tabela 4</b> – Índices estatísticos utilizados para comparação dos modelos. ....	84
<b>Tabela 5</b> – Compostos identificados no O.E.O. <sub>p</sub> * antes e após esterilização com os tempos de retenção e concentração relativa (%) detectados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. ....	85
<b>Tabela 6</b> – Compostos identificados no O.E.M. antes e após esterilização, com os tempos de retenção e concentração relativa (%) detectados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. ....	87
<b>Tabela 7</b> – Compostos identificados no O.E.O. antes e após pasteurização, com os tempos de retenção e concentração relativa (%) detectados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.....	88
<b>Tabela 8</b> – Resultados das análises microbiológicas para patógenos em mexilhões pré-cozidos no primeiro dia de armazenamento. ....	89
<b>Tabela 9</b> – Efeito da atividade antibacteriana de O.E.O. e O.E.M. em micro-organismos patogênicos em mexilhões pré-cozidos nas diferentes concentrações no sétimo dia de armazenamento, comparado ao controle (sem tratamento) a 10 °C. ....	90
<b>Tabela 10</b> – Efeito do tratamento termoquímico (80 °C/10 minutos + 0,4 % de O.E.O) sobre micro-organismos patogênicos em mexilhões pré-cozidos no primeiro e sétimo dia de armazenamento a 10 °C. ....	95
<b>Tabela 11</b> – Tempo de vida útil de mexilhões pré-cozidos associados ao tratamento térmico e O.E.O. ou não resultante da contagem microbiológica e o tempode detectção de alterações sensoriais. ....	105
<b>Tabela 12</b> – Valores dos índices estatísticos para o modelo de Baranyi e Roberts obtidos pelo ajuste das curvas de crescimento de BAL nas três	

temperaturas estudadas para os quatro tratamentos aplicados em mexilhão.....	115
<b>Tabela 13</b> – Valores dos índices estatísticos para o modelo de Baranyi e Roberts obtidos pelo ajuste das curvas de CT nas três temperaturas estudadas, para os quatro tratamentos aplicados em mexilhão. ....	116
<b>Tabela 14</b> – Valores dos índices estatísticos para o modelo Baranyi e Roberts obtidos pelo ajuste das curvas de crescimento de PSC nas três temperaturas estudadas para os quatro tratamentos aplicados em mexilhão.....	117
<b>Tabela 15</b> - Valores dos índices estatísticos para o modelo de Baranyi e Roberts obtidos pelo ajuste das curvas de crescimento de PST nas três temperaturas estudadas para os quatro tratamentos aplicados em mexilhão.....	118
<b>Tabela 16</b> – Parâmetros de crescimento de BAL obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts.....	120
<b>Tabela 17</b> – Parâmetros de crescimento de CT obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts.....	121
<b>Tabela 18</b> – Parâmetros de crescimento de PSC obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts.....	122
<b>Tabela 19</b> – Parâmetros de crescimento de PST obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts.....	123
<b>Tabela 20</b> – Equações dos modelos secundários utilizados para descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento de BAL em mexilhão pré-cozido. O $R^2$ representa o valor do coeficiente de correlação para cada ajuste realizado.....	133
<b>Tabela 21</b> – Equações dos modelos secundários utilizados para descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento de CT em mexilhão pré-cozido. O $R^2$ representa o valor do coeficiente de correlação para cada ajuste realizado.....	134
<b>Tabela 22</b> – Equações dos modelos secundários utilizados para descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento de PSC em mexilhão pré-cozido. O $R^2$ representa o valor do coeficiente de correlação para cada ajuste realizado.....	134
<b>Tabela 23</b> – Equações dos modelos secundários utilizados para descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento de PST em mexilhão pré-cozido. O $R^2$ representa o valor do coeficiente de correlação para cada ajuste realizado.....	135





## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\mu$  - Velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ )
- A – Aumento da densidade microbiana
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AP – Alta pressão
- APC - Ágar Padrão para Contagem
- ATP - Adenosina trifosfato
- $a_w$  – Atividade de água
- B – Velocidade de crescimento relativa
- BAL – Bactérias ácido lácticas
- BOD – *Biological Oxygen Demand*
- CMI – Concentração mínima inibitória
- CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono
- CT – Contagem total
- D – Tempo de redução decimal (min)
- DHA – Ácido docosaheptaenóico
- $E_a$  – Energia de ativação ( $kJ\ mol^{-1}$ )
- EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- EPA – Ácido eicosapentaenoico
- FAO – Organização para Alimentação e Agricultura
- Kgha<sup>-1</sup> – Quilograma por hectare
- L – Litro
- M – Tempo requerido para alcançar a velocidade de crescimento máxima
- mL – Mililitro
- MRS – *Ágar De Man, Rogosa e Sharpe*
- MSE – Erro médio quadrático
- N – Contagem microbiana final
- N<sub>0</sub> – Contagem microbiana inicial
- N<sub>2</sub> – Nitrogênio
- NaCl – Cloreto de Sódio
- NMP – Número mais provável
- $\omega$  3 – Ômega 3
- O.E. – Óleo essencial
- O.E.A. – Óleo essencial de açafreão
- O.E.CL. – Óleo essencial de capim limão

O.E.M./B.E.O – Óleo essencial de manjeriço/*basil essential oil*

O.E.O. – Óleo essencial de orégano/*oregan essential oil*

O.Es – Óleos essenciais

O<sub>2</sub> – Oxigênio

OED – Organismos específicos de deterioração

pH – Potencial Hidrogeniônico

PSC – Psicrófilos

PST – Psicrotróficos

R – Constante universal dos gases ( $\text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ )

R<sup>2</sup> – Coeficiente de correlação

t – Tempo

T – Temperatura (°C)

UFC – Unidade Formadora de Colônia

VDR – Velocidade relativa de deterioração

z – Constante de resistência térmica (°C)

λ – fase lag (h)



## SUMÁRIO

<u>LISTA DE ABREVIACÕES</u> .....	15
<u>LISTA DE TABELAS</u> .....	17
<u>LISTA DE FIGURAS</u> .....	19
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>33</b>
1.2 OBJETIVO .....	37
1.2.1 Objetivos Específicos .....	37
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>38</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>38</b>
2.1 MEXILHÃO .....	38
2.1.1 O Mexilhão como Alimento.....	40
2.2 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE MOLUSCOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA.....	41
2.3 MICROBIOLOGIA DE MOLUSCOS .....	42
2.4 DETERIORAÇÃO DE MEXILHÕES .....	43
2.4.1 Bactérias Ácido Lácticas .....	44
2.4.2 Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em Placa .....	46
2.4.3 Contagem de Micro-organismos Psicrófilos e Psicrotróficos ....	47
2.5 TECNOLOGIA DE CONSERVAÇÃO DE MOLUSCOS .....	47
2.5.1 Embalagem a Vácuo.....	49
2.5.2 Tratamento Térmico .....	49
2.5.2.1 Letalidade do Processo e Letalidade Requerida para o Processo .....	50
2.5.3 Antimicrobianos Naturais.....	52
2.5.3.1 Óleos Essenciais .....	53
2.5.3.1.1 Composição química dos óleos essenciais.....	55
2.5.3.1.2 Mecanismo da ação antimicrobiana dos óleos essenciais .....	57
2.5.3.1.3 Óleo essencial de orégano.....	59
2.5.3.1.4 Óleo essencial de manjeriço .....	60
2.6 EMBALAGENS FLEXÍVEIS TERMOPROCESSÁVEIS .....	60
2.6.1 <i>Stand up pouches</i> .....	61
2.7 MICROBIOLOGIA PREDITIVA .....	61
2.7.1 Modelos Primários de Crescimento .....	63
2.7.1.1 Modelo de Gompertz .....	64
2.7.1.2 Modelo de Baranyi e Roberts .....	65
2.7.2 Modelos Secundários .....	68

2.7.2.1 Modelo de Arrhenius.....	68
2.7.2.2 Modelo da Raiz Quadrada ou Modelo de Bélerádek.....	69
2.8CAPACIDADE DE PREDIÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MODELOS.....	71
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>73</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>73</b>
3.1 MATÉRIAS-PRIMAS .....	73
3.1.1 Mexilhões.....	73
3.1.2 Óleos Essenciais de Orégano e Manjeriçao .....	73
3.1.3 Embalagens Flexíveis Termoprocessáveis (stand up pouche) .....	74
3.2 PROCESSOS E EQUIPAMENTOS .....	75
3.2.1 Avaliação e Seleção do Óleo Essencial com maior Eficácia sobre a Inibição do Crescimento Microbiano em Mexilhões.....	75
3.2.2 Efeito Combinado: O.E., Embalagem a vácuo e Tratamento Térmico.....	75
3.2.2.1 Aparato Experimental Utilizado para o Processamento Térmico de Mexilhões.....	76
3.2.2.2 Ensaio de penetração de calor e Monitoramento da temperatura dos mexilhões durante o tratamento térmico .....	77
3.2.3 Análise Microbiológica de Patógenos.....	79
3.2.4 Análises Microbiológicas de Deteriorantes.....	80
3.2.4.1 Contagem de bactérias ácido lácticas .....	80
3.2.4.2 Contagem total de aeróbios mesófilos em placa .....	81
3.2.4.3 Contagem de micro-organismos psicrófilos .....	81
3.2.4.4 Contagem de micro-organismos psicrotróficos.....	81
3.2.5 Determinação do pH .....	82
3.3 COMPARAÇÃO DA DETERIORAÇÃO SENSORIAL COM O CRESCIMENTO MICROBIANO.....	82
3.4 MODELAGEM MATEMÁTICA DAS CURVAS DE CRESCIMENTO MICROBIANO.....	82
3.4.1 Modelos Primários de Crescimento .....	82
3.4.2 Modelos secundários.....	83
3.4.3 Análise Estatística.....	83
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>85</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
4.1 COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORÉGANO E MANJERICÃO.....	85

4.2 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORÉGANO E MANJERICÃO SOBRE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS E DETERIORANTES .....	89
4.2.1 Efeito dos óleos essenciais de orégano e manjerição na cinética de crescimento microbiano em mexilhões embalados a vácuo.....	91
4.3 EFEITO TERMOQUÍMICO (ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO E CALOR) SOBRE A VIDA ÚTIL DE MEXILHÕES .....	93
4.3.1 Processamento Térmico .....	94
4.3.2 Efeito do tratamento termoquímico sobre micro-organismos patogênicos presentes em mexilhões embalados a vácuo .....	95
4.3.3 Efeito do tratamento termoquímico sobre os micro-organismos deteriorantes de mexilhões embalados a vácuo.....	97
4.3.4 pH.....	102
4.4 COMPARA�O ENTRE A DETERIORA�O SENSORIAL E O CRESCIMENTO MICROBIANO.....	104
4.5 EFEITO COMBINADO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO, VÁCUO E TRATAMENTO TÉRMICO SOBRE OS MICRO-ORGANISMOS DETERIORANTES DE MEXILHÃO DESCONCHADO ARMAZENADO A DIFERENTES TEMPERATURAS: MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO MICROBIANO.....	108
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>137</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>140</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>170</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>173</b>
<b>ANEXO C.....</b>	<b>175</b>



## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO

A mitilicultura, cultivo de mexilhões, é uma atividade que tem adquirido importância em diversos países de vasto litoral, como fornecedora de proteína animal. Isso se dá em decorrência dos baixos custos de produção e do fato de proporcionar boa rentabilidade. O caráter pioneiro do Estado de Santa Catarina na produção comercial de moluscos bivalves tornou o estado como maior produtor do Brasil. Os dados atuais mostram que a produção de mexilhões em 2011 foi de 15.965 toneladas, representando um aumento de 16,53 % em relação à safra de 2010 (EPAGRI, 2012; FAO, 2010; SILVA, 2011).

Além da sua importância econômica, o mexilhão é uma rica fonte de vitaminas, proteínas, aminoácidos essenciais e ácidos graxos poliinsaturados, principalmente ômega-3, tornando-se um alimento com grandes características nutricionais (CAGLAK, CAKLI e KILINC, 2008; FURLAN, 2011).

Os mexilhões são moluscos bivalves e sua qualidade está diretamente relacionada com as águas de cultivo, pois esses se alimentam pelo bombeamento e filtração da água, retendo a matéria orgânica e partículas em suspensão presentes na água que podem incluir bactérias, vírus, substâncias químicas entre outras partículas. Para que se possa assegurar a qualidade desses moluscos produzidos, é necessário que eles provenham de locais com água em condições adequadas (CAVALHEIRO, 2010; SANTOS, 2009; VERNOCCHI, 2007).

A comercialização dos mexilhões ocorre localmente, logo após a colheita nas formas *in natura* (na concha) ou na desconchada, sendo processados por cooperativas de beneficiamento e distribuídos para mercados, peixarias, restaurantes e consumidores. Em geral, o mexilhão no Brasil é comercializado na forma de carne refrigerada ou congelada e em outros países, encontra-se também na forma defumada e enlatada. O consumo de mexilhões sofre efeito na sazonalidade sendo maior nos meses de verão do que nos meses de inverno, porém a produção é estável durante o ano. O Estado de Santa Catarina além de abastecer os mercados e restaurantes locais é responsável por abastecer capitais como São Paulo, Porte Alegre, Rio de Janeiro e Curitiba. Os principais atributos que afetam a decisão de compra do consumidor para esse tipo de alimento é a qualidade (aparência) e a reduzida vida útil (associada à

segurança do produto) (BARNI et al., 2003; LIMA, 2010; MARQUES, 1998).

Nas unidades de processamento locais, uma das etapas do processamento consiste no pré-cozimento dos mexilhões, facilitando o desconchamento dos mesmos. Após o cozimento, o produto segue para o resfriamento por imersão em água gelada. Esta fase do processo é uma das mais críticas, pois além de necessitar de um resfriamento rápido após o cozimento, a água e o gelo são potenciais recontaminantes do produto, o que requer um rígido controle da qualidade desses insumos. Desta forma, por ser uma atividade incipiente no Brasil, há a necessidade do melhoramento dos processos e produtos, visando a disponibilidade de mexilhões com qualidade e sanidade asseguradas (CAVALHEIRO, 2010; HUBER, 2004).

Durante o armazenamento de frutos do mar, a microbiota muda devido a diferentes capacidades dos micro-organismos tolerarem as condições de conservação. Os micro-organismos deteriorantes são aqueles que causam deterioração no produto em virtude do seu metabolismo. Esses micro-organismos são capazes de provocar a deterioração devido à sua capacidade proteolítica, pectinolítica, lipolítica, entre outras. A intensa competição das indústrias por uma maior participação no mercado, aliada à crescente expectativa dos consumidores por alimentos mais seguros, tem pressionado os fabricantes a produzirem produtos de alta qualidade. Diante da variação que pode ocorrer nos alimentos, a necessidade de preservação, mantendo as suas propriedades sensoriais e nutricionais, bem como a exigência dos consumidores para produtos convenientes e fáceis de preparar conduziram ao desenvolvimento de tecnologias de conservação inovadoras, alternativas às técnicas de conservação tradicional. São exemplos, o uso de alta pressão, pulsos elétricos, utilização de substâncias naturais, com propriedades antimicrobianas e antioxidantes, entre outros (DEVLIEGHERE et al., 2004; GONÇALVES, 2010; VIANEI, 2008; WAN et al., 2009).

A utilização de conservantes químicos é uma alternativa utilizada no controle da multiplicação de micro-organismos nos alimentos. A sua utilização compromete a aceitação por parte dos consumidores, que nos dias atuais vêm mudando seus hábitos alimentares, exigindo produtos com mais qualidade e livres de conservantes sintéticos (BISCOLA, 2007; PRANOTO et al., 2005).

Os óleos essenciais são compostos complexos naturais, voláteis, caracterizados por um forte odor constituído por metabólitos secundários de plantas aromáticas. Devido à sua atividade

antimicrobiana, o uso desses conservantes naturais, é destacada como uma nova tendência na preservação de alimentos nos últimos anos. Entre os mais estudados na inibição do crescimento de micro-organismos deteriorantes de alimentos, destacam-se o óleo essencial de orégano, manjeriço, canela, cravo da Índia, mostarda, alho entre outros. O óleo essencial de orégano é reportado na literatura como um dos mais efetivos do ponto de vista antimicrobiano. O mecanismo de ação dos óleos essenciais sobre as células microbianas deve-se aos seus constituintes fenólicos, como o carvacrol e o timol, que apresentam características hidrofóbicas, com atuação em diversos sítios da célula microbiana. No entanto, a sua utilização efetiva em alimentos tem sido limitada, pois altas concentrações são necessárias para se alcançar a atividade antimicrobiana desejada, o que resulta em alterações sensoriais indesejáveis no produto (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004; HABERBECK et al., 2012; HYLDGAARD et al., 2012 ; OUSSALAH, et al., 2006).

O tratamento térmico é um dos métodos mais comuns para a conservação de alimentos, tendo como principal objetivo provocar a inativação microbiana durante a sua aplicação. Por outro lado, esse tipo de processamento pode ocasionar alterações indesejáveis nas propriedades nutricionais e sensoriais do alimento. Segundo a teoria dos obstáculos, a utilização de óleos essenciais e seus constituintes têm sido estudados em combinação com outros métodos de conservação, como por exemplo, o tratamento térmico, que pode, desta forma ser mais brando devido à ação antimicrobiana do óleo essencial. Desta forma, tratamentos termoquímicos que combinam métodos de conservação podem resultar em melhores resultados na manutenção das propriedades de alimentos frescos, bem como garantir a segurança e também o aumento da vida útil desses produtos (ESPINA et al., 2013 ; LEISTNER e GORRIS, 1995 ; PELEG, 2006 ).

A microbiologia preditiva é uma área multidisciplinar emergente na microbiologia de alimentos e está baseada na hipótese de que o efeito das propriedades dos alimentos, como pH, potencial redox e atividade de água, sobre o crescimento microbiano pode ser previsto com a aplicação de modelos matemáticos derivados de estudos quantitativos dos micro-organismos. Dentre estes, os modelos primários descrevem o comportamento dos micro-organismos com o tempo e os modelos secundários descrevem como os parâmetros obtidos nos modelos primários se comportam com a variação de um ou mais fatores ambientais. Os modelos terciários são combinações dos modelos

primários e secundários inseridos em pacotes computacionais capazes de gerar respostas do comportamento microbiano sob condições específicas. A aplicação dessa ferramenta na microbiologia de alimentos foi estimulada pela necessidade de se garantir alimentos com qualidade, pois tanto à espécie, quanto o comportamento dos micro-organismos no alimento depende desses fatores e das condições ambientais às quais o alimento está sujeito (DALCANTON, 2010; LI, XIE, EDMONDSON, 2008; MARKS, 2008; NAKASHIMA et al., 2000, WHITING, 1995).

Muitos modelos matemáticos são baseados em condições ambientais constantes para se determinar os valores dos parâmetros cinéticos de crescimento. Quando a temperatura é o fator ambiental que tem mais influência sobre o crescimento, os outros fatores como atividade de água, pH ou a composição da atmosfera gasosa podem ser considerados constantes. Devido a isso, a modelagem matemática do crescimento microbiano está orientada para obtenção de modelos dinâmicos, ou seja, modelos que permitem prever a segurança ou a vida útil dos alimentos sob condições que variam com o tempo, conhecidos como modelos não isotérmicos (DANNENHAUER, 2010; PELEG, 2006).

## 1.2 OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento termoquímico (calor e óleo essencial) na vida útil de mexilhões (*Perna perna*) processados em embalagens flexíveis.

### 1.2.1 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são:

- Determinar a composição química do óleo essencial de orégano (O.E.O.) e do óleo essencial de manjeriço (O.E.M.) utilizados no presente trabalho.
- Avaliar o efeito da adição de óleos essenciais (orégano e manjeriço) sobre o crescimento de micro-organismos patogênicos presentes nos mexilhões.
- Analisar a cinética de crescimento de micro-organismos deteriorantes (bactérias lácticas, contagem total, psicrófilos e psicrotróficos) ao longo da vida útil de mexilhões tratados com O.E.O. e O.E.M. em temperatura constante (10 °C), com o objetivo de selecionar o que apresentar maior poder antimicrobiano.
- Analisar a cinética de crescimento de micro-organismos deteriorantes (bactérias lácticas, contagem total, psicrófilos e psicrotróficos) ao longo da vida útil de mexilhões tratados termoquimicamente (óleo essencial (O.E.) selecionado associado a tratamento térmico), armazenados a diferentes temperaturas.
- Relacionar a deterioração microbiana dos mexilhões sob tratamento termoquímico e armazenados a diferentes temperaturas com a deterioração sensorial (análise visual e olfativa), para definir os principais aspectos que determinam a vida útil do produto.
- Modelar o crescimento microbiano visando prever a vida útil de mexilhões tratados termoquimicamente (O.E. e calor) processados em embalagens flexíveis.
- Obter os parâmetros primários de crescimento de micro-organismos deteriorantes pelo ajuste do modelo primário de Baranyi e Roberts.
- Modelar a influência da temperatura sobre os parâmetros primários de crescimento microbiano, na faixa estudada.

## CAPÍTULO 2

### 2. REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1 MEXILHÃO

A classe Bivalvia abrange animais como mariscos, ostras e mexilhões. Os bivalves são comprimidos nas laterais e possuem uma concha composta por duas valvas, encaixadas em dobradiça dorsalmente. O pé como o restante do corpo é lateralmente comprimido, além disso, possui cabeça mal desenvolvida. As brânquias nesta classe assumem outro papel além de trocas gasosas e captação de alimentos (RUPPERT, FOX e BARNES, 2005).

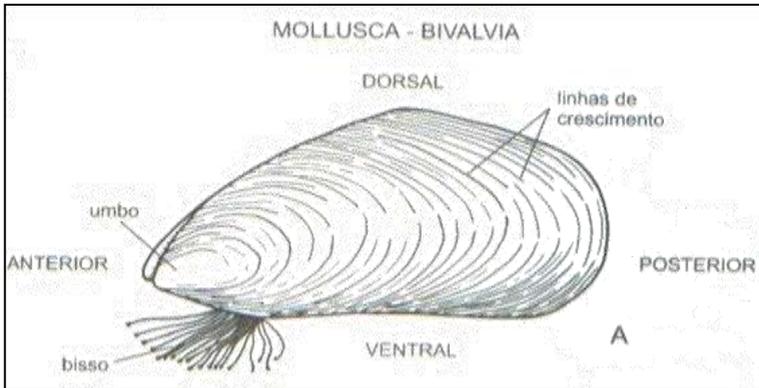
Mexilhão é o termo utilizado para denominar as diversas espécies de moluscos bivalves da família *Mytilidae*, sendo os gêneros mais comuns *Mytilus*, *Perna* e *Mytella*. Seu comprimento varia entre 5 e 8 cm podendo atingir 14 cm; possui 3 a 4 cm de largura e 2 a 3 cm de espessura. Em Santa Catarina, destaca-se a espécie *Perna perna*, ocorrendo amplamente nos costões rochosos e amplamente cultivado no litoral do estado (MARQUES, 1998; RIBEIRO-COSTA e ROCHA, 2006).

Com relação às características morfológicas, o mexilhão *Perna perna* apresenta duas valvas de conchas iguais, lisas, com linhas de crescimento concêntricas, possuem uma dobradiça que permite a movimentação, o músculo adutor posterior é responsável por abrir e fechar concha do mexilhão. Entre as valvas uma grande camada de tecido tem destaque, o manto, que recobre todo o corpo do animal e está em contato direto com a concha. A concha é equivalve possuindo três margens: dorsal, ventral e posterior. A margem dorsal possui suave angulação próxima á metade da concha, a margem ventral é ligeiramente côncava e a margem posterior é arredondada. O umbo define a região anterior do mexilhão e pela região ventral saem os filamentos do bisso. Externamente observa-se o bisso, que são filamentos protéicos, secretados por um conjunto de glândulas bissogênicas, que estão localizadas no interior do pé do organismo, que serve para fixação do mexilhão ao substrato. Podem romper-se e posteriormente ser reconstruída, permitindo assim o deslocamento do organismo. A Figura 1 ilustra a representação das características morfológicas do mexilhão *Perna perna* (CALIXTO, 2010; FERREIRA e MAGALHÃES, 2005; RESGALLA JR, WEBER e CONCEIÇÃO,

2008; RIBEIRO-COSTA e ROCHA, 2006, RUPPERT, FOX e BARNES, 2005).

**Figura 1** – Características morfológicas do mexilhão *Perna perna*.

**Fonte:** Ribeiro-Costa e Rocha, (2005).



O mexilhão é uma espécie dióica, ou seja, são animais de sexos separados, sendo raros os casos de hermafroditismo. Interiormente, a diferenciação sexual é possível a partir da coloração dos tecidos gonádicos dos animais. As glândulas sexuais, ou folículos, encontram-se espalhadas por todo o manto. Durante a maturação sexual, esses folículos vão sendo preenchidos pelos gametas e produzidos pelas gônadas, conferindo ao manto uma coloração típica, branco leitoso nos machos e laranja-salmão nas fêmeas, como apresentado na Figura 2 (CAVALHEIRO, 2011; MANZONI, 2005; MARQUES, 1998).

**Figura 2** – Mexilhão da espécie *Perna perna*, a esquerda, espécime do sexo feminino e a direita, espécime do sexo masculino.

**Fonte:** Manzoni, (2005).



Muitos moluscos aquáticos, principalmente os bivalves, como os mexilhões são animais filtradores que se alimentam de micro-organismos capturados pela corrente de água que é produzida pelo batimento das brânquias. A seletividade do seu alimento ocorre pelo tamanho da partícula. Esses animais filtram de 0,5 a 4 L/h dependendo do tamanho, temperatura, salinidade, salubridade, e das condições ambientais que o molusco habita (BRASIL, 1985; BUSSANI, 1990; FERREIRA e MAGALHÃES, s/d).

### 2.1.1 O Mexilhão como Alimento

Por muitos anos, frutos do mar (moluscos e crustáceos) e pescados têm sido foco de atenção quanto à composição nutricional. Os nutricionistas consideram que esse tipo de alimento é uma importante fonte de minerais, proteínas de alta qualidade e ácidos graxos essenciais, e, portanto, são componentes ideais de para uma dieta saudável e equilibrada, embora apenas metade da população segue recomendações para consumir pescados pelo menos duas vezes por semana (LEBLANC et al., 2006).

Os mexilhões *Perna perna* apresentam teores proteicos médio de 9,9 % em relação ao peso fresco, sendo que os animais sexualmente maduros apresentam teores proteicos mais elevados. Segundo Marques (1998), esse valor é superior ao da ostra (5,7 %) e ao de muitos peixes marinhos. A carne dos mexilhões é rica em selênio, cálcio, ferro, magnésio, fósforo e vitaminas (A, B1, B2, B6, B12 e C). Medeiros et al., (2001), analisando ácidos graxos de mexilhão *Perna perna* detectaram grande proporção de EPA – ácido eicosapentaenoico (11,27 %) e DHA – ácido docosahexaenóico (12,53 %) na fração lipídica. Esses autores também verificaram a presença do ácido palmítico (22 %). Podendo-se, portanto, recomendar a ingestão deste alimento como fonte de  $\omega$ -3, importante à prevenção de doenças cardiovasculares (MAGALHÃES, 1985; VARELTZIS, 1996 *apud* CAGLAK et al., 2008; ORBAN et al., 2002).

A Tabela 1 apresenta a composição centesimal da parte comestível de mexilhões, provenientes da mesma empresa fornecedora das amostras utilizadas no presente trabalho.

**Tabela 1-** Composição centesimal da carne de mexilhões *Perna perna* cozidos e resfriados.

Componentes	%*
Umidade	76,4 ± 0,2
Proteínas	14,0 ± 0,1
Carboidratos (Fração Nifext)	5,3 ± 0,3
Lipídios	2,2 ± 0,1
Resíduo mineral fixo (Cinzas)	2,1 ± 0,2

\*Os valores percentuais dos componentes representam o valor médio ± desvio padrão de determinações em triplicata.

**Fonte:** Lima, (2010).

O mexilhão, no entanto, é considerado uma iguaria, não fazendo parte do cardápio diário da população e, sua aceitação, restringe-se a uma camada muito pequena de consumidores. Trata-se de um produto, cuja perecibilidade exige muito cuidado no manuseio e conservação (FURLÁN et al., 2007).

## 2.2 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE MOLUSCOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA

Durante as últimas duas décadas, o cenário global do comércio internacional de frutos do mar tem mudado em tamanho e estruturação. Em 2008, a Organização para Alimentação e Agricultura (FAO) e as Nações Unidas, revelaram suas pesquisas um aumento na produção anual de mariscos no mundo. A produção foi estimada em cerca de 142.287.124 toneladas. O Brasil tem tido condições favoráveis para o desenvolvimento da aquicultura, uma vez que tem grandes recursos aquáticos para esse tipo de cultivo, além de uma vasta costa produtiva (BOROSKI et al., 2011; FAO, 2010).

O Estado de Santa Catarina é o principal produtor de moluscos bivalves. A produção total de moluscos comercializados em 2011 no Estado (mexilhões, ostras e vieiras) foi de 18.253,8 toneladas, representando um aumento de 16,75 % em relação a 2010 e abastece, além do mercado local, grandes mercados como Rio de Janeiro e São Paulo. Esse montante representa cerca de 95 % da produção nacional e posiciona o estado como o segundo maior produtor da América Latina, ficando atrás apenas do Chile (EPAGRI, 2012).

A comercialização de mexilhões (*Perna perna*) na safra de 2011 foi de 15.965 toneladas, representando um aumento de 16,53 % em relação a safra de 2010. Atuou na produção um total de 599 mitilicultores, e o maior número de produtores está concentrada nos municípios de Palhoça (213), Governador Celso Ramos (109) e Bombinhas (93) (EPAGRI, 2012).

Na mesma grandeza de sua produção está a responsabilidade que Santa Catarina vem assumindo em relação à segurança alimentar de moluscos produzidos (SOUZA et al., 2009).

### 2.3 MICROBIOLOGIA DE MOLUSCOS

O ecossistema aquático representa uma fonte de recursos naturais, favorecendo o cultivo de mexilhões, animais micrófagos que se alimentam particularmente de micro-organismos em suspensão na água. O nível de absorção de nutrientes depende da temperatura, salinidade e salubridade do meio ambiente de cultivo ou extração de mexilhões. Dessa forma, seu consumo pode representar risco para o homem quando oriundos de áreas poluídas ou contaminadas (WEST, 1989).

Os moluscos marinhos e bivalves, como os mexilhões, apresentam características microbiológicas que variam muito, dependendo da qualidade da água de onde foram retirados, da qualidade da água de lavagem e a forma de como são tratados no processamento, armazenamento, distribuição e conservação. A maioria das bactérias associadas aos moluscos bivalves são Gram-negativas, entre as quais são encontradas espécies *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Vibrio*. Em menor número, os micro-organismos Gram-positivos são normalmente representados por espécies de *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Micrococcus*. Gêneros de bactérias como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Lactobacillus* foram isolados em ostras deterioradas. Mexilhões e vieiras possuem deterioração semelhante a das ostras (ARASAKI, 2002; JAY, 2005).

A necessidade do estudo de micro-organismos que oferecem risco não apenas em relação às intoxicações alimentares, mas também em relação à conservação do produto é necessária, a fim de avaliar a vida útil do produto, evitando a deterioração, que traz como consequência características sensoriais indesejáveis. O estudo dos micro-organismos alvo é capaz de mostrar qual microbiota é mais abundante no produto e com isso, medidas de controle podem ser adotadas (LIMA, 2010).

A contagem de micro-organismos viáveis em crustáceos e moluscos refere-se geralmente ao animal inteiro ou à carne separada da

concha e alcançam populações entre  $10^3$  e  $10^7$  UFC/g. Existe uma relação estabelecida entre cargas microbianas altas ou baixas e a procedência dos animais de águas frias ou quentes. Os moluscos, devido ao seu tipo de vida sedentária, apresentam contagens bacterianas que refletem o estado microbiológico das águas de cultivo, podendo ser observadas variações sazonais, cujas contagens aumentam nos meses de verão (ICMSF, 1988; JAY, 2005).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da resolução RDC nº 12, estabelece para moluscos bivalves *in natura*, resfriados ou congelados, e que não serão consumidos crus, que o valor para estafilococos coagulase positiva/g seja inferior a  $10^3$  UFC/g e a ausência de *Salmonella sp/25g*. Para moluscos bivalves cozidos, temperados e não, industrializados, resfriados ou congelados deve-se acrescentar as determinações anteriores, coliformes a 45 °C/g, devendo ser menor que 50 NMP/g (BRASIL, 2001).

## 2.4 DETERIORAÇÃO DE MEXILHÕES

A população de micro-organismos associadas com pescado e frutos do mar reflete na microbiota do ambiente de captura, mas é modificada pela capacidade de diferentes micro-organismos se multiplicarem, principalmente as bactérias. Moluscos procedentes de águas localizada próximas à de habitações humanas tendem a ter uma maior carga microbiana e uma diversa microbiota, comparada com aqueles moluscos retirados de áreas isoladas. O tecido muscular e órgãos internos de pescado e moluscos saudáveis recém capturados são normalmente estéreis, mas bactérias podem ser encontradas na pele, concha, bem como no trato intestinal desses (ICMSF, 1986).

Os micro-organismos deteriorantes são aqueles que causam deterioração no produto em virtude do seu metabolismo. Esses micro-organismos são capazes de provocar a deterioração devido à sua capacidade proteolítica, pectinolítica, lipolítica, entre outras. Alguns destes micro-organismos crescem à temperatura ambiente, outros, podem se desenvolver sob temperatura de refrigeração (YOKOYAMA, 2007).

Os mecanismos de deterioração nos moluscos diferem dos demais frutos do mar, devido à grande quantidade de carboidratos na forma de glicogênio, o que acarreta atividades fermentativas como parte da deterioração microbiana (JAY, 2005).

Durante o armazenamento de frutos do mar, a microbiota muda devido a diferentes capacidades dos micro-organismos tolerarem as condições de conservação. Bactérias fermentativas Gram-negativas (*Vibrionaceae*) deterioram peixes sem conservantes, enquanto bactérias psicrotolerantes Gram-negativas (*Pseudomonas* spp. e *Shewanella* spp.) crescem em peixes refrigerados. A redução de CO<sub>2</sub> inibe o crescimento de organismos respiratórios e favorece o crescimento de *Photobacterium phosphoreum* e bactérias ácido lácticas. Bactérias respiratórias Gram-negativas são normalmente inibidas em produtos do mar quando mantidos sob refrigeração, vácuo e conservados com adição de baixo nível de cloreto de sódio (NaCl). Sob essas condições, a microbiota fica praticamente dominada por bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus* e *Carnobacterium*), com uma associação de bactérias Gram-negativas fermentativas tais como *Photobacterium phosphoreum* e *Enterobacteriaceae* psicrotróficas.

#### 2.4.1 Bactérias Ácido Lácticas

As bactérias ácido lácticas (BAL) representam um grupo de diversos micro-organismos em *habitats* ricos em nutrientes como os alimentos, particularmente produtos lácteos, carnes e vegetais, sendo também constituintes naturais da cavidade oral, trato intestinal e vagina de mamíferos. Devido à sua capacidade de produzir compostos aromáticos, as bactérias lácticas são bastante utilizadas na fabricação de vários alimentos e bebidas, com sua aplicação como culturas *starters* nos derivados de leite, como em diferentes tipos de queijos, manteiga, iogurte, bem como pela preservação de uma ampla variedade de produtos fermentados, conferindo a esses produtos características sensoriais únicas (CARR, CHILL & MAIDA, 2002; NASCIMENTO, MORENO & KUAYE 2008; SCHROETER & KLAENHAMMER, 2009).

As BAL compreendem um grupo amplo de micro-organismos, mas que apresentam características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. No entanto, não existe uma definição única do termo “bactéria láctica”. A definição mais encontrada é aquela que diz que essas bactérias são Gram positivas, não tem motilidade, podem ser cocos ou bacilos não esporulados, catalase negativa, desprovidas de citocromos, anaeróbias, aerotolerantes, ácido tolerantes, fastidiosas, que exigem substratos complexos como nucleotídeos, aminoácidos, carboidratos e vitaminas, principalmente a vitamina B1 com destaque para o pantotenato de cálcio, niacina e tiamina, e possuem metabolismo

estritamente fermentativo, sendo o ácido láctico o principal produto da fermentação de carboidratos. Desenvolve-se em meio ligeiramente ácido, com pH entre 4,4 e 6,4 e em condições microaerófilas (ALVARENGA, 2008; AXELSSON, 2004; MASSAGUER, 2005; PFEILER & KLAENHAMMER, 2007).

Muitos estudos foram desenvolvidos para identificar bactérias ácido lácticas, na maioria dos casos não foram identificados ao nível de espécie. As linhagens não identificadas foram divididas em 2 grupos: (i) homofermentativas que utilizam a via glicolítica de *Embden-Meyerhof* e convertem glicose quase que totalmente a ácido láctico (80 %). Dois moles de ácido láctico são formados para cada mol de glicose fermentado, por exemplo, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e alguns *Lactobacillus*, (ii) heterofermentativas que produzem menos ácido láctico (50 %). Um mol de glicose é convertido a 1 mol de ácido láctico, mais 1 mol de etanol e, em alguns casos, ácido acético, fumárico e dióxido de carbono, por exemplo, *Weissella*, *Leuconostoc* e alguns *Lactobacillus* (FORSYTHE, 2002; MASSAGUER, 2005).

Por várias décadas, foram considerados como verdadeiros componentes do grupo láctico os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e os recém denominados *Lactococcus*. Levando em consideração as desagregações, as agregações e o aparecimento de novos gêneros, segundo Ferreira (2003), são 15 os constituintes desse grupo: *Aerocococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. Mogensen et al., (2003) avaliaram os benefícios de bactérias lácticas a saúde e acrescentaram ao grupo das BAL o gênero *Lactosphaera*. Mohania et al., (2008), em estudo das abordagens moleculares para identificação e caracterização de BAL incluíram no grupo gêneros de *Melissococcus*, *Microbacterium* e *Propionibacterium*.

As BAL apresentam efeitos benéficos na indústria de alimentos, agindo como inibidor da multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas, por meio de mecanismos como: processo de produção de ácido láctico, competição de oxigênio, substâncias antagônicas, especialmente bacteriocinas entre outras (AMMOR, et al., 2006; FRANÇOISE, 2010).

O crescimento incontrolável de algumas espécies de BAL ocasionalmente têm um impacto negativo como contaminantes, causando a deterioração de produtos embalados a vácuo, em atmosfera

modificada, além de produtos cárneos processados armazenados sob temperatura de refrigeração. A deterioração por essas bactérias é principalmente devido à produção de metabólitos, que influenciam na aparência, textura e produção de *off-flavors* no alimento, causando sabores e odores desagradáveis, além da formação de limo na superfície do produto (CARR, CHILL & MAIDA, 2002; NYCHAS et al., 2008).

#### 2.4.2 Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em Placa

A contagem total em placas (CT) é uma medida grosseira do conteúdo bacteriano, das condições de abuso de temperatura e da sanitariedade do processo. Esta contagem detecta, em um alimento, o número de bactérias aeróbias ou facultativas mesófilas (35-37 °C), presentes tanto sob a forma vegetativa quanto esporulada. Esse método tem sido utilizado como um dos indicadores microbiológicos para avaliar a qualidade de alimentos com base em sua condição sanitária. A contagem da população microbiana capaz de crescer como colônias visíveis sob as condições testadas laboratorialmente é estimada em Unidades Formadoras de Colônias por grama ou mililitro de alimentos (UFC/g ou UFC/mL) (ELLIOTT, 1980; MASSAGUER, 2005; NASCIMENTO e NASCIMENTO, 2000; NASCIMENTO, OLIVEIRA e NASCIMENTO, 2005).

Espécies de mesófilos podem ser observadas em diversos tipos de alimentos, inclusive aqueles armazenados em temperatura de refrigeração. Nestas, aparentemente, tais micro-organismos não se multiplicarão, contudo assim o farão quando esses alimentos forem colocados em temperaturas da faixa dos mesófilos e se as outras condições também foram favoráveis. As bactérias aeróbias mesófilas são constituídas de espécies da família *Enterobacteriaceae*, dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, dentre outros (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2001).

As bactérias aeróbias mesófilas não são usadas na avaliação dos riscos de toxinfecções alimentares, porém constituem um dos maiores grupos de indicadores de qualidade microbiológica, indicando se a limpeza, a desinfecção e o controle da temperatura durante os processos de tratamento industrial, transporte e armazenamento foram realizados de forma adequada. Esta determinação permite também obter informações sobre a alteração incipiente dos alimentos, sua provável vida útil, a falta de controle no descongelamento dos alimentos ou desvios na temperatura de refrigeração (RAY, 2004; SANTANA, CONCEIÇÃO e AZEVEDO, 2002; SILVA, 2002).

### **2.4.3 Contagem de Micro-organismos Psicrófilos e Psicrotróficos**

Os psicrófilos constituem o grupo de micro-organismos que possuem a capacidade de crescer e se multiplicar em baixas temperaturas. Por esse motivo, Morita (1975) definiu os psicrófilos como organismos que têm temperatura ótima de crescimento inferior a 15 °C e temperatura máxima de crescimento de 20 °C e uma temperatura mínima de crescimento a 0 °C. Na área de microbiologia de alimentos, os organismos capazes de se desenvolver na faixa de temperatura considerada adequada para os psicrófilos mesmo que essa temperatura não seja ótima para o seu crescimento, são denominados psicrotróficos e são assim denominados por crescerem entre temperaturas de 0 a 40 °C (COLLINS, 1981; SANTANA, 2001).

O metabolismo dos micro-organismos é mais lento que o dos micro-organismos mesófilos e são assim poucos competitivos nos alimentos mantidos à temperatura ambiente. Frequentemente minoritários na microbiota de contaminação, tornam-se rapidamente dominante após uma permanência nos alimentos em frigorífico, câmara fria ou armazém frigorífico (VASUT e ROBECCI, 2009).

Os micro-organismos psicrófilos têm uma importância considerável como agentes de deterioração de alimentos, no entanto poucas espécies patogênicas pertencem a este grupo (SILVA, 2012).

O termo psicrotrófico tem confundido os microbiologistas desde o começo do século XX. Outros termos são usados, tais como: psicrófilos, psicrófilos facultativos, tolerantes ao frio ou psicrotolerantes (GOUNOT, 1986). Segundo Collins (1981), de acordo com as normas da *International Dairy Federation*, os psicrotróficos foram definidos como sendo micro-organismos que podem crescer a 7 °C ou menos, independente da temperatura ótima de crescimento. Este grupo é extremamente importante em produtos alimentícios que são conservados ou armazenados em condições de refrigeração por períodos longos (1 a 4 semanas).

## **2.5 TECNOLOGIA DE CONSERVAÇÃO DE MOLUSCOS**

A competição entre as empresas pelo aumento da fatia de mercado faz da qualidade uma das principais armas para garantir o sucesso de uma empresa ou produto. Com a intensificação dos órgãos fiscais de inspeção, a indústria de alimentos não pode deixar a garantia de qualidade de seus produtos em segundo plano (CHAVES, 1998).

A indústria processadora de alimentos amadureceu ao longo dos anos, com um recorde impressionante na segurança e um mercado vibrante para o desenvolvimento de novos produtos. Atualmente o consumidor está ampliando sua consciência quanto às características dos alimentos que escolhe consumir, buscando maior diversificação, praticidade e, acima de tudo, qualidade. Isso tem inspirado pesquisadores e a indústria de alimentos a explorar métodos alternativos em substituição aos métodos de processamento tradicional. A indústria de alimentos está pronta para adotar custos e tecnologias eficazes que oferecem melhor qualidade e segurança em seus produtos (AWUAH, 2007; BIEDRZYCKI, 2008; VIANEI, 2008).

Os mexilhões são geralmente comercializados como matéria-prima, com casca, ou a carne refrigerada e/ou congelada em embalagens a vácuo. Esse tipo de produto, também pode ser vendido como produtos transformados, como mexilhões em conserva e defumado. Atualmente, há uma tendência crescente no consumo de mexilhões frescos devido à sua qualidade superior, quando comparada à de mexilhões congelados (GOULAS et al., 2005).

No Brasil, a comercialização dos mexilhões se dava basicamente de duas maneiras: na concha ou desconchado, em embalagens plásticas de 500 gramas ou um quilograma. Atualmente, com o aumento da competitividade entre os produtores ocorreu uma diversificação nas formas de apresentação do mexilhão para comercialização, através do processamento do produto e conseqüentemente agregando valor (SANTOS 2009).

A disponibilidade de produtos seguros necessita do desenvolvimento de tecnologias de conservação, pois os moluscos em geral, como outros produtos pesqueiros são altamente susceptíveis à deterioração (CALIXTO, 2010).

Diante da variedade de alterações que podem ocorrer na carne fresca, e, conseqüentemente, afetar sua qualidade e vida útil, diferentes tecnologias de conservação têm sido utilizadas e novas tecnologias propostas. Em geral essas tecnologias atuam no controle dos principais fatores de influência, tais como temperatura, umidade, compostos antimicrobianos, atmosfera modificada ou diretamente por processos inibitórios de micro-organismos. Entre as novas tecnologias existentes destacam-se atmosfera modifica, alta pressão, processos de irradiação (AYMERICH, PICOUE; LAWRIE, 2005; ZHOU, XU, LIU, 2010).

### **2.5.1 Embalagem a Vácuo**

O sistema de embalagem a vácuo consiste na remoção do ar do espaço livre associado ao fechamento hermético, utilizando-se filmes com barreira ao vapor d'água e outros gases. A redução da concentração de oxigênio inibe o desenvolvimento de micro-organismos aeróbios, a descoloração, a oxidação de lipídios e da mioglobina, aumentando a vida útil do produto (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

Ainda que os sistemas a vácuo tenham custo acessível e sejam bastante efetivos na conservação de carnes, devido a inibição do crescimento microbiano anaeróbio, as carnes embaladas nesse tipo de atmosfera apresentam como desvantagem o fato de não aparentarem característica de frescor aos consumidores. Além disso, devido à dificuldade em se retirar totalmente o O<sub>2</sub> dessas embalagens, há uma crescente preocupação com o crescimento ou sobrevivência de micro-organismos psicrotóxicos microaerófilos patogênicos em carnes embaladas nesse sistema e mantidas sob refrigeração. Resíduos de O<sub>2</sub> em embalagens a vácuo também podem resultar na formação de metamioglobina na superfície da carne, com conseqüente desenvolvimento da cor marrom (GARCIA DE FERNANDO et al., 1995; HUFFMAN; RILLEY, 2007; JOHN et al., 2005) .

Ao se utilizar o vácuo, a carne se apresenta com uma coloração arroxeada ou amarronzada, devido ao baixo nível de O<sub>2</sub> existente no micro ambiente, que contribui principalmente para o desenvolvimento de bactérias ácido lácticas que causam alterações na qualidade da carne (LABADIE, 1999; SARANTÓPOULOS, OLIVEIRA e CANAVESI, 2001).

### **2.5.2 Tratamento Térmico**

A conservação pelo uso do calor é um dos principais métodos aplicado na indústria de alimentos, visando melhorar a qualidade microbiológica e prolongar a vida útil dos produtos alimentícios, além de desenvolver propriedades sensoriais (PARKER, 2001; ANSORENA e SALVADORI, 2011).

Durante o processamento de alimentos, variáveis físicas importantes, como tempo e temperatura de cozimento influenciam na sobrevivência dos micro-organismos, ou na persistência de toxinas responsáveis por doenças alimentares. O binômio tempo-temperatura de cozimento é um fator importante para assegurar a qualidade sanitária dos alimentos (ANSORENA e SALVADORI, 2011).

A pasteurização é uma forma de processamento térmico que utiliza temperaturas moderadas para destruir bactérias patogênicas e organismos vegetativos, bem como reduzir a atividade enzimática, causando menores alterações nas propriedades sensoriais e nutricionais do alimento, prolongando a vida útil por dias ou semanas, sendo necessário que os produtos pasteurizados sejam refrigerados após o tratamento térmico (SMITH, 2003).

O tratamento térmico tem como finalidade o desconchamento de mexilhões após a sua colheita. Os moluscos bivalves são submetidos ao vapor durante um tempo que varia de acordo com a o seu tamanho e as condições de aquecimento. Segundo esses autores, o binômio tempo-temperatura necessário para destruir bactérias patogênicas é 70 °C por 4,5 min. Após o tratamento térmico, os mexilhões são desconchados manualmente, o que requer uma temperatura inferior a 40 °C. A carne cozida de mexilhão pode ser destinada à fabricação de conservas (enlatamento em salmoura) ou passar por processos de resfriamento e/ou congelamento, seguida de embalagem e comercialização. (HUBER et al., 2006; WOOD, 1979).

Antoniolli (1999) estudando a vida útil de mexilhões *Perna perna* processados e mantidos sob refrigeração, avaliou diferentes tempos de cozimento, desde 15 até 30 minutos, obtendo temperaturas finais que variaram de 80 a 96 °C, e observou que todos os tratamentos térmicos aplicados foram satisfatórios quanto a eliminação de micro-organismos. Neste estudo, foi também observado que o cozimento dos mexilhões por 30 minutos, atingindo a temperatura final de 96 °C apresentou melhores características sensoriais, bem como melhorou o processo de desconchamento dos mexilhões.

### **2.5.2.1 Letalidade do Processo e Letalidade Requerida para o Processo**

A caracterização da cinética de morte microbiana em termos do tempo de redução decimal (D) e da constante de resistência térmica (z) é o primeiro passo na especificação do processo térmico, sendo que estes valores dependem do micro-organismo alvo (CAVALHEIRO, 2010).

A letalidade requerida para o processo ( $F_{\text{requerido}}$ ) é definida como o tempo requerido, à determinada temperatura, para reduzir a população do micro-organismo alvo presente no alimento até níveis seguros. Considerado a natureza logarítmica da destruição dos micro-organismos pela ação do calor, o valor de  $F_{\text{requerido}}$  é obtido pela Equação 1 (DAVID,

GRAVES e CARLSON, 1996; ORDÓÑEZ-PEREDA, 2005; STUMBO, 1973).

$$F_{requerido} = D_T (\log N_0 - \log N_t) \text{ ou } F_{requerido} = D_T \cdot \gamma \quad (1)$$

onde:

F = tempo requerido para atingir o grau de redução da população microbiana até o nível desejado (minutos);

$D_T$  = tempo de redução decimal do micro-organismo alvo do processo, na temperatura de referência (minutos);

$N_0$  = número inicial de micro-organismos (UFC/g);

$N_t$  = número de micro-organismos em um tempo t (UFC/g);

$\gamma$  = número de reduções decimais.

Através do conceito de letalidade, é possível determinar o efeito global do processo térmico ( $F_{processo}$ ), cuja temperatura varia com o tempo, em termos de tempo equivalente de processo a uma temperatura de referência. Para o cálculo de  $F_{processo}$  pode se utilizar o método geral. A partir dos dados de temperatura (no ponto frio), a cada intervalo de tempo, é possível calcular a taxa letal pela Equação 2. Se  $F_{processo}$  é maior que  $F_{requerido}$ , o tratamento térmico aplicado está apropriado (DAVID, GRAVES e CARLSON, 1996; RODRIGUES et al., 1998; SMITH, 2003).

$$L = 10^{-(T_R - T) / z} \quad (2)$$

onde:

L = taxa letal;

$T_R$  = temperatura de referência (°C);

T = temperatura de processo (°C);

z = incremento de temperatura necessário para que o tempo de redução decimal diminua a um décimo (°C), para o micro-organismo alvo.

Calculando a taxa letal em função da temperatura e plotando os valores em função do tempo de processo, sendo as letalidades aditivas, a área abaixo da curva é a medida da destruição dos micro-organismos em todo processo o qual pode ser calculada pela Equação 3 (SMITH, 2003):

$$F_{processo} = \int_{t=0}^{t=t} L dt \quad (3)$$

### 2.5.3 Antimicrobianos Naturais

A indústria alimentícia busca técnicas alternativas para substituir os métodos tradicionais de controle de micro-organismos nos alimentos, como tratamentos intensos de calor, acidificação, congelamento, desidratação, e adição de sal e agentes químicos. Nos últimos anos, as tecnologias mais estudadas são as de inativação de micro-organismos por métodos não-térmicos, como o uso de alta pressão hidrostática, utilização de pulsos eletromagnéticos, sistemas de embalagens ativas ou com atmosfera modificada, utilização de compostos antimicrobianos naturais e bioconservação (DEVLIEGHERE, VERMEIREN, DEBEVERE, 2004).

Segundo Rodgers (2001) a utilização de agentes químicos na conservação de alimentos não é compatível com a imagem de produto “fresco” ou natural. Uma alternativa seria a utilização de agentes antimicrobianos naturais. Vários são os exemplos de agentes antimicrobianos presentes em animais, plantas e micro-organismos. Esses agentes têm suas propriedades relacionadas a modificações na membrana dos micro-organismos provocando o aparecimento de poros (DEVLIEGHERE, VERMEIREN, DEBEVERE, 2004; KRUGER, 2006).

Em consequência ao aumento do interesse dos consumidores por produtos naturais ou minimamente processados, o uso de antimicrobianos naturais pode ser uma alternativa aos métodos utilizados atualmente na indústria de alimentícia. Uma alternativa seria o uso combinado de diferentes tipos de tratamentos considerados subletais para promover a proteção dos alimentos e consumidores contra micro-organismos deteriorantes e/ou patogênico, através do efeito sinérgico apresentado com os tratamentos. Uma das vantagens do uso destes compostos em alimentos é a imagem de produto natural. Porém, a eficiência de seu uso depende de diversos fatores, como difusão em matrizes sólidas, solubilidade em meio aquoso, interação com os componentes do alimento (proteínas, carboidratos e lipídeos), eficácia como agente antimicrobiano e alterações nas características sensoriais (sabor e textura principalmente). Outro aspecto a ser levado em

consideração é o espectro de atividade antimicrobiana e o surgimento de bactérias resistentes ao composto antimicrobiano natural (BRUL e COOTE, 1999; DEVLIEGHIERE, VERMEIREN, DEBEVERE, 2004).

### 2.5.3.1 Óleos Essenciais

Aumentar a vida útil dos produtos, sem afetar sua qualidade, funcionalidade e propriedades físico-químicas, modificando e desenvolvendo novos tipos de processos para a preservação microbiológica dos alimentos é um desafio constante para a indústria. A aplicação de conservantes naturais, como óleos essenciais de plantas e especiarias, é percebida como uma nova tendência na preservação dos alimentos nos últimos anos (HABERBECK, 2011).

Os óleos essenciais (O.Es) são misturas complexas de compostos voláteis com odor forte que são sintetizados em diversos órgãos, incluindo broto, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira ou casca, e armazenado em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Esses compostos voláteis têm diversas funções ecológicas, na qualidade de substâncias de defesa contra micro-organismos. Os óleos essenciais podem ser extraídos por uma variedade de métodos, sendo a destilação a vapor o mais empregado na indústria (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008; FRANZ e NOVAK, 2010).

O uso de óleos essenciais em alimentos com objetivo de melhorar suas características sensoriais é muito comum, porém sua atividade antiviral, antiparasítica, antioxidante, antimicrobiana, inseticida, pesticida e antibacteriana, quando aplicados em alimentos, é pouco conhecida (ABO-EL SEOD et al., 2005; BURT, 2004; CASTRO et al., 2005; EVANGELISTA et al., 2005; LIMA et al., 2005; POTENZA et al., 2005a; POTENZA et al., 2005b;).

Özkan, Sagdiç e Özcan (2003), estudaram o efeito do óleo essencial de cominho, erva doce, louro, manjerona, orégano, sálvia, segurelha, tomilho (preto) e tomilho em três concentrações (0,2, 0,4, 1 e 2 %) contra *Enterobacter aerogene*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus gallinarum*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Corynebacterium xerosis*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*. Os óleos essenciais foram avaliados pelo método de difusão em disco. Todos os óleos apresentaram atividade

antibacteriana contra pelo menos uma ou mais bactérias. Os óleos de tomilho, manjerona e orégano foram os mais efetivos, apresentando efeito inibitório em concentrações de 1 e 2 %.

Teixeira et al. (2013) estudaram o efeito inibitório de óleos essenciais de manjerição, sementes de cenoura, sementes de aipo, citronela, cravo, coentro, alho, toranja, limão, cebola, orégano, salsa, alecrim, salvia, estragão e tomilho contra sete micro-organismos deteriorantes e patogênicos (*Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella typhimurium* e *Shewanella putrefaciens*) pelo método de difusão em disco e pelo efeito da concentração mínima inibitória (CMI) em meio líquido (20 µL). Todos os óleos essenciais testados inibiram o crescimento de pelo menos quatro espécies bacterianas, os baixos valores de concentração mínima inibitória (<3,0 mg mL<sup>-1</sup>), necessária para inibir *Pseudomonas putida*. As maiores reduções (8,0 UFC mL<sup>-1</sup>), foram alcançadas para os óleos de coentro, alecrim e orégano para *Listeria innocua*, bem como para o óleo essencial de tomilho para ambas cepas de *Listeria*.

No Brasil foram realizadas algumas pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais. Pimenta-Rodrigues et al., (2005) avaliaram a atividade antibacteriana de óleo essencial de folhas de pitanga sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e *Proteus vulgaris* pelo método de difusão em poços, e observaram atividade contra todas as cepas testadas.

Silva (2007) avaliou o efeito antimicrobiano de óleo essencial de orégano (0,2%), EDTA e nisina individualmente e a combinação de nisina com EDTA e nisina com óleo essencial de orégano no controle da multiplicação *Salmonella enteritidis* em saladas de legumes com maionese. Os resultados da avaliação *in vitro* indicaram que o óleo essencial de orégano usado individualmente teve melhor efeito antimicrobiano contra *Salmonella enteritidis* do que quando empregado em combinação com nisina, constituindo-se em uma barreira adicional para a multiplicação do patógeno nesse produto. Nem a nisina nem o EDTA, quando testados isoladamente ou combinados apresentaram efeito sobre *Salmonella enteritidis*.

Barbosa (2010) verificou a ação de óleos essenciais de orégano, tomilho, manjerição e manjerona em amostras de carne moída e hambúrguer bovino inoculados com *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Enteritidis*. Sobre a carne moída, o O.E. de manjerona (0,8 % v/v) reduziu a contagem de *Listeria monocytogenes* à não

detectável, enquanto que para o hambúrguer, os O.Es. de manjerona e tomilho eliminaram totalmente a bactéria em concentrações de 0,8 % v/v. Para *Salmonella enteritidis*, os óleos de orégano e manjerona apresentaram a mesma eficácia na carne (1,6 % v/v) e no hambúrguer (1,2 % v/v), o O.E. de manjerição apresentou pior desempenho.

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) classifica os óleos essenciais como aromas naturais. Sob a Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, a ANVISA os regulamenta como “...produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste de vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado)”... (BRASIL, 2007).

#### 2.5.3.1.1 Composição química dos óleos essenciais

A composição dos óleos essenciais varia devido a fatores como localização geográfica do cultivo, espécie, clima, solo, parte da planta utilizada e técnica de extração. Como a composição molecular do extrato determina o seu poder antimicrobiano, é de grande importância a identificação de suas moléculas. Geralmente, os óleos essenciais contêm entre 20 e 60 componentes sendo quatro moléculas majoritárias (entre 20 a 70%) e traços de outras moléculas. Diversos estudos comparam a atividade antimicrobiana dos O.Es com a das suas principais moléculas. A maior parte conclui que, o poder antimicrobiano do O.Es são consequência da sinergia entre todas as moléculas constituintes e não função somente das moléculas predominantes (BURT, 2004; BAGAMNOULA, UYTTENDAELE e DEBEVERE, 2004; BAKKALI et al., 2008).

A atividade antimicrobiana intrínseca de um óleo essencial pode ser diretamente relacionada com a configuração química individual de seus componentes, a proporção em que se apresentam e a interação entre eles. Os óleos essenciais podem ter vários componentes antimicrobianos individuais, mas os compostos fenólicos são os responsáveis primários pela ação antimicrobiana e antioxidante, podendo atuar inclusive com efeito sinérgico (BURT, 2004; KRUGER, 2006).

Os compostos fenólicos, responsáveis pelo aroma característico dos óleos essenciais, são hidrofóbicos e contém estruturas aromáticas similares aos solventes (tolueno) e conservantes clássicos (ácido benzóico). Essa importante característica, permite a ligação desses componentes aos lipídeos da membrana celular, modificando sua estrutura e aumentando sua permeabilidade. O efluxo de íons e outros

constituintes celulares podem provocar a morte da célula. Geralmente, os óleos essenciais que possuem maior atividade antimicrobiana apresentam maiores concentrações de carvacrol, eugenol e timol, sendo que a estrutura química dos componentes individuais dos O.Es afeta o seu modo de ação na célula (BURT, 2004; BRUL e COOTE, 1999; DAVDSION e NAIDU, 2000). A Tabela 2 apresenta os principais componentes dos O.Es mais comumente utilizados em alimentos.

**Tabela 2** – Principais componentes presentes em óleos essenciais que apresentam potencial antimicrobiano.

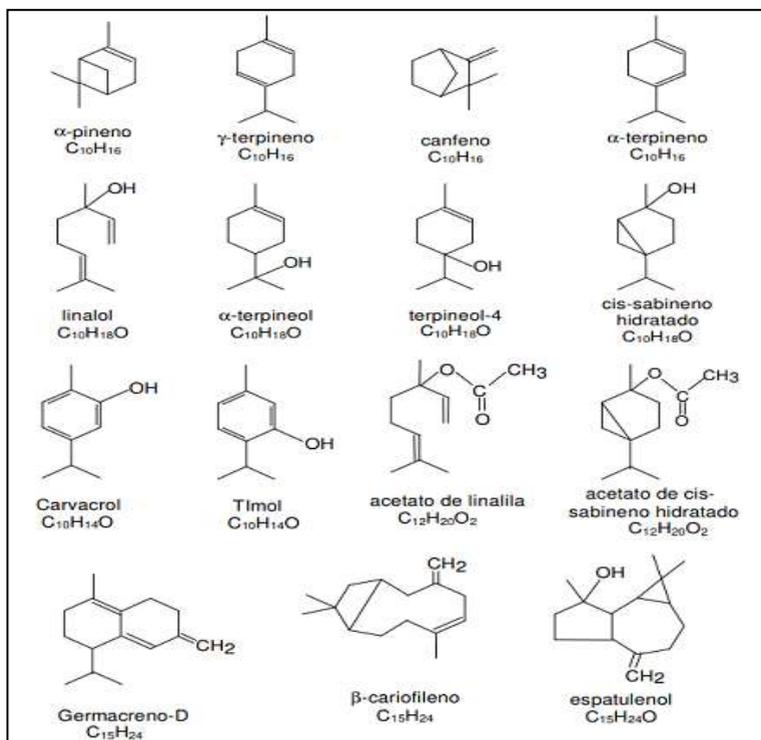
Nome comum de OE	Nome científico de origem vegetal	Os principais componentes	Composição aproximada (%)
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i> (sementes)	Linalol E-2-decanal	70% -
Canela	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	Trans-cinamaldeído	65%
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol Timol $\gamma$ -terpineno p-cimeno	Traço-80% Traço de 64% 2-52% Traço-52%
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	$\alpha$ -pineno Acetato debornilo Cânfora	2-25% 0-17%  2-14%
Sálvia	<i>Salvia officinalis</i> L.	1,8-cineol Cânfora $\alpha$ -Pineno $\beta$ -pineno 1,8-cineol $\alpha$ -tujone	3-89% 6-15% 4-5% 2-10% 6-14% 20-42%
Cravo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol Acetato eugenilo	75-85% 8-15%
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol Carvacrol $\gamma$ -terpineno p-cimeno	10-64% 2-11% 2-31% 10-56%

**Fonte:** Adaptado de Burt (2004).

Geralmente, os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais. Os componentes abrangem dois grupos de origem biossintética distinta. O principal grupo é composto de terpenos e terpenóides e outro de constituintes aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por baixo peso molecular (BETTS, 2001; PICHERSKY, NOEL, e DUDAREVA, 2006). Na Figura 3 é apresentada a estrutura das principais moléculas presentes nos óleos essenciais.

**Figura 3** – Fórmula estrutural de alguns componentes presentes em óleos essenciais.

**Fonte:** Simões e Spitzer (1999); Ugaz, (1994).



### 2.5.3.1.2 Mecanismo da ação antimicrobiana dos óleos essenciais

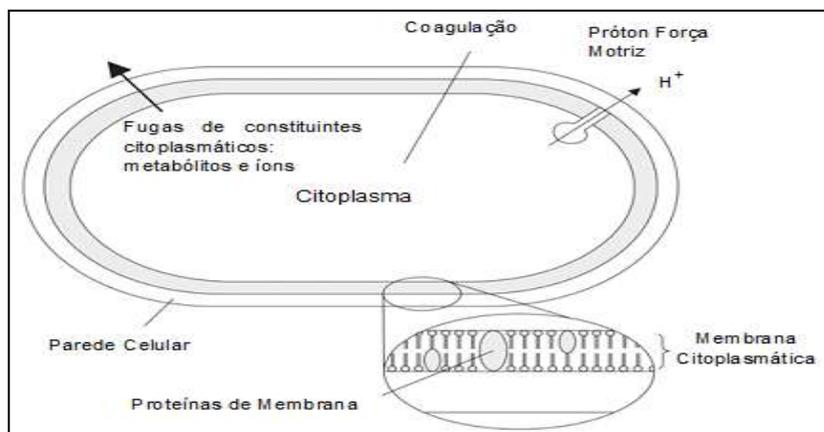
A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é clara, mas o mecanismo de ação antimicrobiana ainda não está completamente entendido. Há consenso de que grande maioria dos compostos

aromáticos e fenólicos exerce seus efeitos antimicrobianos diretamente na membrana citoplasmática, provocando alterações na sua estrutura e funções (HOLLEY e PATEL, 2005).

Considerando o número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, é muito provável que a sua atividade antibacteriana não seja atribuível a um mesmo mecanismo específico, mas que existem vários alvos na célula, como alterações da membrana citoplasmática, perturbações sobre a força motriz, no fluxo de elétrons, no transporte ativo e na coagulação do conteúdo da célula. Os locais ou estruturas da célula bacteriana que são considerados sítios de ação para os componentes de produtos naturais são ilustrados na Figura 4. Nem todos esses mecanismos atingem alvos separados, podendo alguns ocorrer em consequência de outro mecanismo. Dois mecanismos foram propostos até o momento para explicar a ação dos componentes fenólicos na membrana celular: essas moléculas de hidrocarbonetos cíclicos podem se acumular na bicamada lipídica da membrana e distorcer a interação lipídeo-proteína, ou ainda, pode haver uma interação direta com compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas das proteínas da membrana (BURT, 2004; NAZER et al., 2005; YUSTE e FUNG, 2003).

**Figura 4** – Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para ação de compostos naturais na célula bacteriana.

**Fonte:** Adaptado por Burt, 2004.



Muitos estudos que avaliaram a ação dos O.Es sobre micro-organismos deteriorantes e patogênicos concordam que esses compostos

têm maior ação contra bactérias Gram-positivas. Uma explicação para menor suscetibilidade dos organismos Gram-negativos é a presença da membrana externa que restringe a difusão dos compostos hidrofóbicos através dos lipopolissacarídeos. (BURT, 2004; RATLEDGE e WILKINSON, 1988; VAARA, 1992).

#### 2.5.3.1.3 Óleo essencial de orégano

O orégano (*Origanum vulgare* L.) é uma erva pertencente à família *Lamiacea* e possui uma grande variedade de espécies destacando-se a *Origanum vulgare*, a *Origanum marjoram*, e a *Origanum dictamnus* entre as mais importantes. É distribuída e cultivada principalmente na região do Mediterrâneo e também em muitas áreas de climas temperados como Europa, Ásia, Norte da África e América. No Brasil, seu cultivo é principalmente nas regiões sul e sudeste. Entretanto, o mercado brasileiro de orégano basicamente importa essa matéria-prima. A Turquia é o maior produtor mundial de orégano seguida do México, Grécia e outros países do Mediterrâneo (DORMAN et al., 2003; PIRIGHARNAEI et al., 2011; SALEHI-SURMAGHI, 2010; VERMA et al., 2011).

O óleo essencial de orégano (O.E.O.) tem atividade antimicrobiana contra diversas bactérias gram-positivas, gram-negativas, leveduras e fungos. A alta atividade antimicrobiana do O.E.O. é devida à sua grande concentração de carvacrol e timol, como componentes dominantes, seguido de  $\gamma$ -terpineno, p-cimeno, linalol, terpinen-4-ol e sabineno hidrato. Os resultados de vários estudos indicaram que os efeitos antimicrobianos, antioxidantes e antiinflamatórios do orégano podem estar relacionados com seus componentes dominantes incluindo, carvacrol e timol presente no óleo essencial (D'ANTUONO et al., 2000; SKOULA et al., 2002; ZHELJAZKOV, ASTATKIE e SCHLEGEL, 2012).

Estudos com óleo essencial de orégano como aditivo alimentar em conjunto com diversas tecnologias revelou ser uma vantajosa aplicação para o aumento da vida útil de alimentos. Atrea et al., (2009) avaliaram o efeito combinado de O.E.O. e embalagem a vácuo na vida útil de polvos armazenados 4 °C. O O.E.O. foi aplicado diretamente sobre as carnes de polvo nas concentrações de 0, 2000 e 4000 ppm. A vida útil do polvo, armazenados sob refrigeração, embalado somente à vácuo foi de 9 dias, enquanto que para aqueles adicionados de 2000 e 4000 ppm de O.E.O., foi de 17 e 23 dias, respectivamente.

#### 2.5.3.1.4 Óleo essencial de manjeriço

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L., Lamiaceae) é planta anual ou perene com cerca de 60 variedades, cultivada no sudeste da Ásia e na África Central, foi introduzida no Brasil pelos italianos. Esta planta destaca-se por apresentar substâncias de interesse para indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, tornando-se importante o conhecimento das suas propriedades químicas e a concentração de cada componente em seu óleo essencial. Segundo Lubbe e Verpoorte (2011) a produção mundial de óleo essencial de manjeriço (O.E.M.) varia de 50 a 100 toneladas. O rendimento de O.E.M. pode variar de 132,0 a 162,5 kg $ha^{-1}$ . Assim como outros óleos, o O.E.M. é usado na produção de aromas, incluindo confeitarias e produtos condimentados, como molhos picantes, cathup, massas de tomate, molhos para saladas, picles e alguns vinagres, além de carnes condimentadas e salsichas. O óleo também serve para aromatizar e perfumar produtos de higiene oral e também é usado em produtos de perfumaria (BLANK et al., 2012; LUBBE e VERPOORTE, 2011; SINGH et al., 2010; SCANAVINI, 2006).

As propriedades antimicrobianas de O.E.M. foram estudadas em bactérias gram-negativas incluindo *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e em bactérias gram-positivas, como *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, assim como para fungos e leveduras, mostrando a presença de efeitos bacteriostáticos e fungistáticos sobre esses microorganismos. O O.E.M. apresenta em sua composição componentes altamente valiosos como linalol, componente marjoritário, metilo chevicol, eugenol, timol, 1,8-cineol, eugenol de metilo, cânfora, p-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, mirceno e  $\alpha$ -thujen (BENITEZ et al., 2009; KOBAYASHI et al., 2009; MOGHADDAM et al., 2011).

Poucos estudos têm sido reportados na literatura com o uso de O.E.M. no aumento da vida útil de frutos do mar, pescados e derivados. Busatta et al. (2008) estudaram a atividade antimicrobiana do O.E.M. sobre bactérias em salsicha. Os resultados mostraram que adição do óleo essencial exerceu efeito bacteriostático nas concentrações abaixo da concentração mínima inibitória (CMI) (0,069-2,3 mg/mL) e efeitos bactericidas, quando utilizadas em concentrações elevadas do óleo, o que provocou alterações no sabor da salsicha.

## 2.6 EMBALAGENS FLEXÍVEIS TERMOPROCESSÁVEIS

As embalagens flexíveis termoprocessáveis ou “*retort pouch*” como é comercialmente conhecida, consiste em uma bolsa flexível

formada por filme plástico multicamada, dotada de propriedades de barreira, principalmente a gases e vapor de água e que é capaz de suportar um tratamento térmico entre 116 e 135 °C objetivando a esterilidade do produto nela acondicionado, resultando um produto com de maior estabilidade (HOLDSWORTH e SIMPSON, 2007; JUN, COX e HUANG, 2006).

As embalagens termoprocessáveis devem ser construídas com materiais inertes e atóxicos, com baixa permeabilidade a gases e umidade, baixa hidrofiliçidade, ter resistência a óleos e gorduras e outros alimentos, resistência física a impactos e abrasão e proporcionar uma perfeita termosoldagem, mantendo assim a hermeticidade após o tratamento térmico (CARVALHO FILHO, 1996).

### 2.6.1 *Stand up pouches*

O sucesso das embalagens flexíveis termoprocessáveis tem avançado na tecnologia de embalagens. Enquanto as embalagens flexíveis convencionais são geralmente estilo “travesseiro”, as *stand up pouches* são embalagens capazes de manter um posicionamento ereto em prateleiras, em virtude de uma base plana, tendo melhor capacidade de exibir seu conteúdo e a característica de permanecer plano antes do acondicionamento do produto – que traz economia no transporte e no espaço utilizado para armazenagem. A parte inferior é formada por várias estruturas: um painel separado é aderido à parede do corpo da embalagem, uma cantoneira em forma de “W” é formada a partir de uma parte da face flexível, e um painel dobrável é aderido com reforços nas laterais formando um bloco (BRODY, 2001; BRODY, 2002; COLTRO, 2002).

Alguns trabalhos com pescados e frutos do mar têm sido realizados, estimulando o estudo do processamento de mexilhões em embalagens flexíveis termoprocessáveis. Entre as aplicações pode-se destacar o uso das *retort pouches* para salmão, camarão, tilápia, mexilhões, vôngoles, atum entre outros. Atualmente, no Brasil, o uso destas embalagens já é realizado na comercialização de atum (BINDU et al., 2007; BYUN et al., 2010; CRISTIANINI, 1998; CAVALHEIRO, 2010; DHANAPAL et al., 2010; MOHAN, 2008; VELIZ, 2008).

## 2.7 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A microbiologia preditiva é um campo promissor na microbiologia de alimentos, tem enfoque interdisciplinar em que se

conjugam conhecimentos da microbiologia, matemática, computação e ciência de alimentos, podendo ser definida como a utilização de expressões matemáticas capazes de descrever o comportamento microbiano e um alimento (WHITING e BUCHANAN, 1994; ZWIETERING et al., 1990).

A microbiologia preditiva surgiu descendendo de duas linhas de pesquisas isoladas. Uma delas é o controle da deterioração de peixe fresco, e a segunda área é a prevenção de botulismo e outras intoxicações microbianas. O conceito da microbiologia preditiva está baseado na premissa da resposta microbiana a mudanças ambientais, sendo possível prever, através de observações passadas, a resposta dos micro-organismos em um novo ambiente similar. Esse conhecimento pode ser descrito e resumido em modelos matemáticos que pode ser utilizados para prever quantitativamente o comportamento de populações microbianas em alimentos, por exemplo, crescimento, inativação e produção de toxina, a partir do conhecimento das propriedades ambientais dos alimentos ao longo do tempo (COSTA e KRISTBERGSSON, 2009; ROSS e McMEEKIN, 1994).

Classicamente, os modelos podem ser divididos em três grupos, os modelos primários, descrevem o comportamento do número de micro-organismos ao longo do tempo, sob um conjunto de dados e condições. Quando estas condições são favoráveis para os micro-organismos, o modelo primário será um modelo de crescimento, enquanto que sob condições estressantes, o modelo será um modelo de inativação. Os modelos secundários demonstram como os parâmetros obtidos nos modelos primários se comportam com variações ambientais, como atividade de água, pH, temperatura, pressão e concentração de um determinado aditivo, por exemplo. Os modelos terciários são descritos, como a união dos modelos anteriores implementados em pacotes computacionais de fácil utilização (COSTA e KRISTBERGSSON, 2009; WHITING e BUCHANAN, 1994).

Existem muitos modelos matemáticos que permitem prever o crescimento de uma ampla classe de micro-organismos patogênicos e deteriorantes sobre combinações distintas de fatores ambientais, intrínsecos e extrínsecos. Vários modelos mostram o efeito da temperatura sobre os parâmetros cinéticos de crescimento de micro-organismos distintos e são construídos supondo que a temperatura se mantém constante com o tempo. Na prática, entretanto, as variações de temperatura ocorrem frequentemente, especialmente durante o armazenamento e distribuição de alimentos. Assim, a validação sob mudanças de temperatura (condições dinâmicas) é de grande

importância para avaliar o desempenho do modelo na precisão da vida útil sob condições reais da cadeia do frio (GIANNUZZI, et al., 1998; KOUTSOUMANIS et al., 2006).

A base de desenvolvimento de um modelo de crescimento não isotérmico é dado por duas etapas, em que a primeira consiste na obtenção de dados de crescimento microbiano em diferentes temperaturas constantes, ajustando o modelo primário aos dados para obtenção dos parâmetros de crescimento. A segunda etapa, a influência da temperatura nestes parâmetros é descrita pelos modelos secundários. Assim, para estimar o crescimento microbiano em condições em que ocorre a flutuação de temperatura, a forma do modelo primário de crescimento deve ser usada, com inclusão dos modelos secundários (CORRADINI e PELEG, 2005; DALCANTON, 2010).

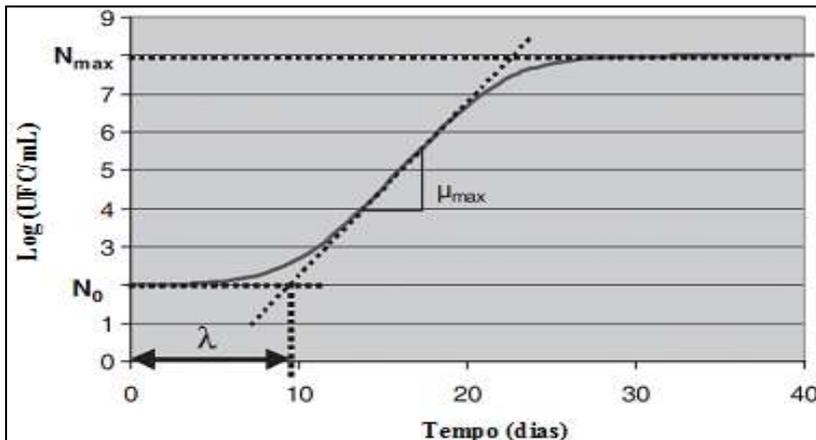
Na literatura alguns modelos, modelos não isotérmicos são propostos, entre eles o modelo de Corradini e Peleg (2005) descrito a seguir e o modelo de Van Impe (1992).

### **2.7.1 Modelos Primários de Crescimento**

Os modelos primários descrevem a evolução microbiana em função do tempo para um determinado conjunto de condições ambientais. A modelagem cinética centra-se na concentração de células bacterianas em função do tempo. Normalmente, esta pode ser descrita por uma curva de crescimento sigmoideal, caracterizada por quatro parâmetros principais: (1) a fase *lag*  $\lambda$  (h), que é o tempo que um micro-organismo tem para se adaptar ao seu novo ambiente; (2) velocidade específica de crescimento  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ), que está correlacionada com a inclinação log-linear da curva de crescimento; (3) concentração inicial de células  $N_0$  (UFC/mL ou UFC/g), e (4) a concentração máxima de células  $N_{\text{máx}}$  (UFC/mL ou UFC/g), como apresentado na Figura 5 (COSTA e KRISTBERGSSON, 2009; DALCANTON, 2010; McKELLAR e LU, 2004).

**Figura 5** – Curva típica de crescimento microbiano em função do tempo.

**Fonte:** Costa e Kristbergsson, 2009.



Entre os modelos primários de crescimento comumente utilizados na literatura são o modelo de Gompertz ou Gompertz Modificado e o modelo de Baranyi e Roberts (DALCANTON, 2010).

### 2.7.1.1 Modelo de Gompertz

Os modelos não lineares foram propostos em 1980. Gibson et al., (1987), introduziu o modelo de Gompertz na microbiologia de alimentos, tornando-se possível expressar Log (UFC/mL) em função do tempo, utilizando uma forma sigmoide e esta apresentado na Equação 4. A base deste modelo é que, devido a limitação no espaço e/ou nutriente bem como a produção de metabólitos tóxicos, a velocidade de crescimento microbiano não é constante. Tipicamente, a velocidade máxima de crescimento aumentaria até um máximo e depois diminuiria. Desta maneira, a velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) é determinada no ponto de inflexão na curva (COSTA e KRISTBERGSSON, 2009; McKELLAR e LU, 2004).

$$\text{Log}N = \text{Log}N_0 + A \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad (4)$$

onde Log N é o logaritmo decimal da densidade microbiana no tempo t, Log  $N_0$  é o valor da assíntota inferior (equivalente ao log da densidade microbiana inicial). A é o aumento da densidade microbiana

(equivalente ao log da contagem microbiana máxima durante a fase estacionária menos o log da contagem inicial), B é a velocidade de crescimento relativa no tempo M ( $h^{-1}$ ) e M é o tempo requerido para alcançar a velocidade de crescimento máxima (h). A partir destes parâmetros, a velocidade de crescimento máxima ( $\mu$ ) ( $h^{-1}$ ) (Equação 5) e a duração da fase lag ( $\lambda$ ) (h) (Equação 6) podem ser calculadas ( $e= 2,7182$ ) (DALCANTON, 2010; MCMEEKIN et al., 1993).

$$\mu = \frac{A.B}{e} \quad (5)$$

$$\lambda = M - \frac{1}{B} \quad (6)$$

Zwietering et al., (1990) propuseram a reparametrização da função de Gompertz (Equação 7) para obter a representação direta dos parâmetros de interesse biológico,  $\lambda$  e  $\mu$ , resultando no modelo de Gompertz Modificado. Por ser uma reparametrização, os dois modelos apresentam ajustes similares.

$$\text{Log} \frac{N}{N_0} = A \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{\mu}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (7)$$

Como exemplos da utilização deste modelo, temos a avaliação da vida útil de peixe embalado e uso da alta pressão hidrostática em presunto fatiado (DALGAARD et al., 1997; KOUTSOUMANIS e NYCHAS, 2000; SLONGO, 2009).

### 2.7.1.2 Modelo de Baranyi e Roberts

Baranyi e Roberts (1994) estabeleceram um modelo para fornecer uma base mais mecanística ou biológica. O modelo é baseado em uma equação diferencial ordinária de primeira ordem (Equação 8):

$$\frac{dx}{dt} = \mu(x)x(t)$$

onde  $x(t)$  é a concentração celular no tempo  $t$  e  $\mu(x)$  é a velocidade específica de crescimento. Se  $\mu(x) = \mu_{max} = \text{constante}$ , então a equação descreve o puro crescimento exponencial.

Esta equação diferencial de primeira ordem foi ampliada com duas funções de ajuste: uma a função de adaptação  $\alpha(t)$ , que descreve a transição suave entre o nível do inoculo para a fase de crescimento exponencial e uma função de inibição  $u(x)$ , que descreve a transição da fase de crescimento exponencial e da fase estacionária. Assim, a estrutura do modelo de crescimento de Baranyi e Roberts é descrita pela Equação 9 é:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{max} \alpha(t) u(x) x(t) \quad 9$$

O modelo básico de Baranyi e Roberts é dado pela Equação 9, mas para aplicar o modelo, os ajustes das funções  $\alpha(t)$  (Equação 10) e  $u(x)$  têm que ser definidos. A função de adaptação é baseada em um parâmetro adicional  $q(t)$ , representando uma combinação do estado fisiológico das células e da adaptação ao novo ambiente. Se as células não estão preparadas para crescer ou adaptação é lenta, a fase lag será estendida. Uma vez que as células tenham se adaptado ao novo ambiente, elas crescerão exponencialmente até atingir a fase estacionária, ditada por restrições do meio de crescimento. O processo de ajuste (que é o período de atraso) é caracterizado por um gradual incremento de  $\alpha(t)$  a partir de um valor abaixo de 1:

$$\alpha(t) = \frac{q(t) dx}{1 + q(t)} \quad 10$$

A inibição da função  $u(x)$  foi baseada na diminuição de nutrientes, o que resulta no modelo de Monod (Equação 11):

$$u(x) = \frac{S}{K_S + S} \quad 11$$

A diminuição de nutrientes só é limitante em altas concentrações de células e, por vezes, a inibição é iniciada muito cedo. Portanto, uma simples inibição da função foi criada, baseado na densidade máxima de células, parâmetro  $\mu_{max}$  e na curvatura parâmetro  $m$ , caracterizando a transição da curva de crescimento para a fase estacionária (Equação 12):

$$u(x) \approx 1 - \left( \frac{x(t)^m}{x_{max}} \right)$$

12

Para um determinado conjunto de condições, a forma diferencial do modelo de Baranyi pode ser resolvida, explicitamente, determinística, e estática, reparametrizado para os parâmetros da curva clássica de crescimento, o modelo de Baranyi e Roberts é descrito pela Equação 13 e a fase lag é calculada mediante a função de ajuste  $A(t)$ , Equação 14 (McKELLAR e LU, 2004; POSCHET e VAN IMPE, 1999):

$$N(t) = N_0 + \mu_{max} A(t) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{m\mu_{max}A(t)} - 1}{e^{nN_{max} - N_0}} \right)$$

13

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left( \frac{e^{-\mu_{max}t} + (e^{\lambda\mu_{max} - 1})}{1 + (e^{-\mu_{max}t})^{-1}} \right)$$

14

O modelo de crescimento de Baranyi e Roberts é um dos modelos primários em maior uso. Muitos pesquisadores têm utilizado esse modelo na microbiologia preditiva e quando comparado com outros modelos encontrados na literatura, apresenta resultados satisfatórios (McDONALD e SUN, 1999).

A maneira mais comum para ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais é utilizando o programa DMFit (macro do *software* Microsoft Office Excel®), desenvolvido pelos próprios autores do modelo e seus colaboradores (DALCANTON, 2010).

## 2.7.2 Modelos Secundários

Os modelos secundários são desenvolvidos para descrever como os parâmetros dos modelos de crescimento variam com a mudança dos fatores intrínsecos (pH,  $a_w$  e potencial oxido-redução) e extrínsecos (temperatura, composição da atmosfera e umidade) na matriz alimentar. O conhecimento dos parâmetros ambientais que mais influenciam o crescimento microbiano é essencial para o desenvolvimento, bem como para o uso prático dos modelos preditivos. Quatro grupos são destacados como modelos secundários: (1) modelo de Arrhenius; (2) modelo da raiz quadrada, também conhecido como modelo de Bélerádek; (3) modelo de cardinal, (4) modelos de superfície resposta ou modelos polinomiais, (5) redes neurais e (6) equações lineares e exponenciais que podem ser utilizados, conforme o melhor ajuste aos dados propostos (CORRADINI e PELEG, 2005; COSTA e KRISTBERGSSON, 2009; McKELLAR e LU, 2004 TOLDRÁ, 2009).

Entre os modelos mais utilizados na literatura, destacam-se o modelo de Arrhenius e o modelo da raiz quadrada.

### 2.7.2.1 Modelo de Arrhenius

O modelo de Arrhenius é baseado numa expressão empírica e tem sido proposto para descrever o efeito da temperatura no crescimento microbiano. A base dessa expressão foi desenvolvida por van 't Hoff e Arrhenius no século XIX, utilizada para avaliar a termodinâmica das reações químicas. O modelo de Arrhenius é dado pela Equação 15 (COSTA e KRISTBERGSSON, 2009).

$$k = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right)$$

15

onde  $k$  é a velocidade de crescimento ( $h^{-1}$ ),  $A$  é a constante da equação ( $h^{-1}$ ) (fator pré-exponencial),  $E_a$  é “energia de ativação” do sistema de reação ( $kJ mol^{-1}$ ),  $R$  é a constante universal dos gases ( $8,31 kJ mol^{-1} K^{-1}$ ), e  $T$  é a temperatura absoluta (K) (McKELLAR e LU, 2004a).

Os modelos secundários são desenvolvidos para descrever como os parâmetros dos modelos de crescimento variam com a mudança dos fatores intrínsecos (pH,  $a_w$  e potencial oxido-redução) e extrínsecos (temperatura, composição da atmosfera e umidade) na matriz alimentar (TOLDRÁ, 2009).

A clássica equação de *Arrhenius*, em alguns casos, não descreve bem o efeito da temperatura nas velocidades de crescimento dos micro-organismos. Por este fato, vários modelos secundários são baseados na equação de *Arrhenius*, realizando modificações mecánísticas e/ou empíricas na equação original. A equação do tipo *Arrhenius* é dada pela Equação 16 (BAHADORI e VUTHALURU, 2010; DALCANTON, 2010; PHUA e DAVEY, 2007).

$$\ln k = a \left( \frac{1}{T} \right) + b$$

16

### 2.7.2.2 Modelo da Raiz Quadrada ou Modelo de Bélerádek

Como descrito no item anterior, em muitos casos, a clássica equação de *Arrhenius* é imprópria para descrever os efeitos da temperatura na velocidade de crescimento de micro-organismos, devido à energia de ativação ( $E_a$ ) se está temperatura é dependente. Para facilitar este problema, Ratkowsky et al. (1982) sugeriram um simples modelo empírico, denominado de modelo da raiz quadrada ou modelo de *Bélerádek* (Equação 17), em que a primeira tentativa de aplicação, sugeriu uma simples relação entre a velocidade de crescimento  $k$  e a temperatura.

$$\sqrt{k} = b (T - T_{min})$$

17

onde  $k$  é o parâmetro de interesse do modelo,  $b$  representa o coeficiente de regressão,  $T$  é a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e  $T_{min}$  é a temperatura mínima para o crescimento ou coeficiente do modelo.

Os modelos terciários são combinações dos modelos primários e secundários inseridos em pacotes computacionais, cujo uso facilita a aplicação das equações matemáticas. Estes programas podem calcular respostas microbianas em diferentes condições, comparar o efeito destas variações ou ainda contrastar o comportamento de diferentes micro-organismos, não se fazendo necessário o uso de recursos experimentais. É importante ressaltar que este recurso permite o acúmulo contínuo de conhecimento e, como consequência, pode levar ao desenvolvimento de modelos melhores e maior margem para sua aplicação (COSTA e KRISTBERGSSON, 2009; KAJAK e KRAJEWSKA, 2006;

McDONALD e SUN, 1999; McMEEKIN e ROSS, 2002; WHITING, 1995).

## 2.8 CAPACIDADE DE PREDIÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MODELOS

Um modelo matemático é uma representação simplificada da realidade, definida como o conjunto de considerações e hipóteses que irão resultar em equações matemáticas, que então podem ser programadas em uma ferramenta computacional (ZWIETERING e DEN BESTEN, 2011).

Para que os modelos possam ser aplicados, é fundamental que estes sejam validados. Dois passos devem ser incluídos na validação de modelos preditivos. Primeiro, a validação interna, para garantir que o modelo descreve com precisão os dados experimentais. Segundo, validação externa, para comparar as previsões com outros dados gerados por laboratórios/ indústrias em diferentes meios/alimentos. Esta validação também pode ser realizada utilizando dados da literatura, que pode ser tanto uma validação matemática ou diretamente em um produto alimentício (McCLURE et al., 1994; GIFFEL e ZWIETERING, 1999).

A aplicação de uma técnica estatística adequada permite uma avaliação da capacidade de predição do modelo que está sendo validado. Na microbiologia preditiva, alguns índices matemáticos podem ser usados para avaliar a confiabilidade ou qualidade do ajuste (*goodness off it*) dos modelos preditivos de crescimento, bem como para comparar o ajuste de uma série de modelos aos dados utilizados para a sua elaboração (McCLURE et al., 1994; NAKASHIMA, ANDRÉ e FRANCO et al., 2000).

Os índices matemáticos mais utilizados na literatura são o coeficiente de correlação ( $R^2$ ), o erro quadrático (MSE) ou raiz do erro médio quadrático (RMSE), o fator bias e o fator exatidão.

O primeiro indicador sobre a confiabilidade de um modelo é o  $R^2$ . Este índice mede a fração de variação sobre a média que é explicada pelo modelo. Quanto maior o valor de ( $0 < R^2 < 1$ ), melhor é a predição do modelo obtido (DALCANTON, 2010).

O índice RMSE ou MSE é uma medida da variabilidade residual (Equação 18). O valor mais baixo deste índice matemático significa a melhor capacidade do modelo descrever os dados (SUTHERLAND et al., 1994). Segundo McKellar e Lu (2004), provavelmente a mais simples e informativa medida de bom ajuste para modelos de regressão, linear e não linear, é o RMSE. A discrepância média entre os dados

observados e os valores preditos, pode ser causada por vários motivos, incluindo a variabilidade natural ou erros sistemáticos.

$$MSE = \frac{\sum (Valor_{observado} - Valor_{preditado})^2}{n - p} \quad 18$$

onde:

n = número de dados experimentais;

p = número de parâmetros do modelo.

Dois índices foram propostos para avaliar o desempenho dos modelos, o fator bias e o fator exatidão. Estes índices são amplamente utilizados na literatura, pois proporcionam um fácil resumo da confiabilidade dos modelos e ainda servem no processo de validação dos modelos preditivos. Também são usados para comparar o ajuste de modelos primários. O objetivo inicial destes índices foi de estimar a qualidade do ajuste dos modelos quando se comparavam com observação que não tinham sido utilizados para gerar o modelo predito (CHOWDHURY et al., 2007; ZHOU et al., 2008; ROSS, 1996; SAUCEDO-REYES et al., 2009; ZIMMERMANN et al., 2010).

O fator bias representa a diferença média entre os valores observados e preditos. Pode ser calculado através da Equação (19):

$$fator\ bias = 10^{\left( \frac{\sum \log(Valor_{observado} / Valor_{preditado})}{n} \right)} \quad 19$$

onde:

n = número de dados experimentais.

O fator bias proporciona uma medida do desvio estrutural do modelo. Com este índice é avaliado se os valores preditos estão acima ou abaixo da linha de equivalência e também em que medida se aproxima a concordância perfeita. Se bias é igual 1, a resposta observada é igual à resposta predita. No entanto, quando bias é maior que 1, significa que o valor predito é maior que o observado. Quando bias é menor que 1, significa que o valor predito é menor que o observado. (ROSS, 1996).

O fator exatidão (Equação 20) é uma medida da diferença média absoluta entre os valores preditos e observados. Quanto maior o valor do valor de exatidão, menos exata é a estimação, por exemplo, um valor de

1,7 indica que as predições diferem em 70% das observações. O fator exatidão pode ser calculado através da Equação 21.

$$fatorexatidão = 10^{\left( \frac{\sum \left| \log \left( \frac{Valor_{observado}}{Valor_{predito}} \right) \right|}{n} \right)} \quad 20$$

Os valores dos parâmetros cinéticos observados podem ser representados graficamente em relação às predições correspondentes do modelo matemático avaliado. A partir desta representação pode-se visualizar rapidamente quais as predições que poderiam resultar inseguras na prática e ainda estimar a confiabilidade do modelo (DEVLIEGHIERE et al., 2000; CARRASCO et al., 2006).

## **CAPÍTULO 3**

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 MATÉRIAS-PRIMAS**

##### **3.1.1 Mexilhões**

Os mexilhões pré-cozidos e resfriados foram adquiridos na empresa Cavallo Marinho Beneficiamento de Frutos do Mar, localizada no Município de Palhoça – SC.

Os mexilhões foram transportados em caixas térmicas com gelo e mantidos sob refrigeração (4 °C) no Laboratório de Propriedades Físicas dos Alimentos (PROFI) da Universidade Federal de Santa Catarina até o momento do processamento.

##### **3.1.2 Óleos Essenciais de Orégano e Manjeriço**

Os óleos essenciais de orégano e de manjeriço, utilizados no experimento preliminar para seleção do óleo com atividade antimicrobiana mais eficaz, foram cedidos pela Givaudan do Brasil LTDA. Para o estudo da vida útil, o óleo foi adquirido na comercial Inter-link LTDA, localizada em Jandira – SP. Os O.Es foram armazenados sob refrigeração (4 °C), ao abrigo da luz. Antes da determinação da composição química, os O.Es sofreram dois tratamentos térmicos para verificar variações na sua estabilidade. No primeiro tratamento, 5 mL de O.E.O e O.E.M. foram transferidas para tubos de ensaio e submetidos ao processo de esterilização (121 °C/15 minutos). No segundo tratamento 5 mL de O.E.O. foram submetidos ao processo de pasteurização em banho-Maria a 80 °C/10 minutos. Para ambos os tratamentos, amostras controle (sem tratamento) foram reservadas a fim de comparar possíveis variações nas moléculas.

A determinação da composição química do O.Es foi realizada no Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A análise foi realizada em cromatógrafo GC-MS (GC-Varian 3800, MS/MS-Varian 1200 L), coluna VF5-MS (30m x 0,25 mm, 0,25µm) (Varian), usando modo de injeção com divisão de fluxo a uma taxa de 1:20. O volume de amostra injetada foi de 1 µL. A temperatura do injetor foi de 250 °C. O gás de arraste foi o Hélio (He) usado a um fluxo de 1 mL/min. A temperatura

inicial da coluna foi de 60 °C/5 minutos, aquecendo a uma taxa de 5 °C por minuto até 250 °C/5 minutos. A temperatura de interface foi de 250 °C e a temperatura da fonte de íons 230 °C. O detector de espectrometria de massa foi utilizado em modo de varredura na faixa de 40-400 m/z (unidade de relação massa/carga). O método de aquisição foi o de varredura e o tempo total da corrida foi de 48 minutos. Os compostos majoritários foram identificados através de uma base de dados de produtos naturais (*Standard Reference Data Series of the National Institute of Standard and Technology -NIST - Mass-Spectral Library with Windows search program – Version 2*), onde os espectros de massa foram comparados.

### 3.1.3 Embalagens Flexíveis Termoprocessáveis (*stand up poche*)

As embalagens foram adquiridas na empresa ICB Packing, localizada na cidade de São Paulo – SP. As *stand up pouches* utilizadas consistem de um filme de multicamadas constituído por poliéster, nylon e polipropileno. Possuem as seguintes características:

- Estrutura: 11% de poliéster, 14% de nylon e 75% de polipropileno;
- Dimensões: 17 cm x 12 cm.

Na Figura 6 é apresentada uma fotografia das embalagens *stand up pouches* utilizadas nos experimentos.

**Figura 6** – Embalagens tipo *stand up pouches* utilizadas no acondicionamento de mexilhões



## 3.2 PROCESSOS E EQUIPAMENTOS

### 3.2.1 Avaliação e Seleção do Óleo Essencial com maior Eficácia sobre a Inibição do Crescimento Microbiano em Mexilhões

Foram realizados experimentos para avaliar e selecionar, entre o óleo essencial de orégano e o óleo essencial de manjerição, aquele que apresentava maior eficácia sobre a inibição do crescimento microbiano em mexilhões pré-cozidos. Os mexilhões foram divididos em 4 lotes diferentes : lote P1 (amostra controle, sem aplicação de óleo essencial), lote P2 (0,2 % v/m O.E.O.), lote P3 (0,4 % v/m O.E.O.) e lote P4 (0,4 % v/m O.E.M.). As porcentagens são expressas em volume de óleo (mL) por unidade de massa de mexilhão (g). As amostras foram manipuladas em câmara de fluxo laminar (CFLV-09-14399, VECO), em vasilhames de aço inoxidável estéril. Os óleos essenciais foram aplicados na superfície das amostras de mexilhão utilizando uma micropipeta. Após a aplicação do óleo essencial, as amostras foram levemente massageadas com os dedos, de modo a obter uma distribuição uniforme dos óleos sobre a carne dos mexilhões. Cada *stand up poche* foi preenchida com 150 g de amostras de mexilhão (controle e tratados). Todas as manipulações foram realizadas utilizando luvas de vinil estéril, para evitar contaminação cruzada (ATREA et al., 2009; FRANGOS et al., 2010; MASNIYOM, BENJAMA e MANEESRI, 2011).

As *stand up pouches*, contendo as amostras controle e tratadas foram seladas em seladora a vácuo (Selovac 200b, Selovac, São Paulo) e armazenadas em incubadora (DIST, DI -500 RP) à temperatura de 10 °C. As amostras foram analisadas quanto à concentração de bactérias ácido lácticas (BAL) e contagem total (CT) em 0, 3, 6 e 7 dias de armazenamento, conforme a metodologia apresentada nos itens

### 3.2.2 Efeito Combinado: O.E., Embalagem a vácuo e Tratamento Térmico

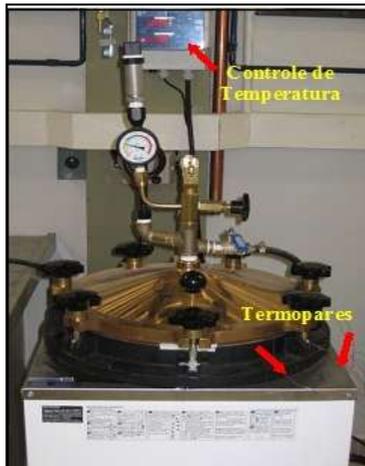
Após estudo preliminar realizado conforme o item 3.2.1., foi selecionado o óleo essencial que apresentou maior eficiência como antimicrobiano, na concentração resultante do estudo para avaliação da vida útil de mexilhão embalado a vácuo. Como a ação apenas do óleo, no estudo preliminar, não demonstrou aumentar muito a vida útil dos mexilhões, decidiu-se associar a aplicação do óleo essencial ao tratamento térmico (80 °C por 10 minutos), para as amostras embaladas

a vácuo e avaliar a vida útil desses mexilhões armazenados a diferentes temperaturas. Os tratamentos realizados incluíram: A1 (amostra controle, sem aplicação de O.E., sem tratamento térmico), A2 (com tratamento térmico 80 °C/10 minutos), A3 (0,4 de % O.E. sem tratamento térmico) e A4 (0,4 % de O.E., com tratamento térmico, 80 °C por 10 minutos). As *stand up pouches*, contendo as amostras controle e tratadas foram seladas em seladora a vácuo (Selovac 200b, Selovac, São Paulo) e armazenadas em incubadora (DIST, DI -500 RP) nas temperaturas de 4 e 10 °C (refrigeração) e 15 °C (abuso de temperatura). As amostras foram analisadas microbiologicamente e sensorialmente (análise visual e olfativa). Esse acompanhamento foi realizado até que as amostras atingissem contagem microbiana de  $10^7$  UFC/g, o que determinou o fim da vida útil dos produtos, sob o ponto de vista microbiológico de BAL, CT, PSC e PST.

### 3.2.2.1 Aparato Experimental Utilizado para o Processamento Térmico de Mexilhões

O aparato experimental utilizado no processamento térmico de mexilhões em embalagens flexíveis termoprocessáveis (Figura 7) é composto de uma autoclave do tipo vertical, descontínua, com capacidade de 50 L (Marca Phoenix, modelo AV-50), equipada com um sistema de controle de pressão e temperatura (Marca Expectron, modelo Climflex PLUS, Brasil). O aparato está situado no Laboratório de Propriedades Físicas dos Alimentos (PROFI), do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

**Figura 7** – Aparato experimental para processamento térmico dos mexilhões.



As embalagens foram acomodadas em suporte (38 cm de altura e 33 cm de diâmetro) com bandejas de aço inoxidável de 2 mm de espessura e 33 cm de diâmetro perfuradas com furos de 20 mm de diâmetro (CAVALHEIRO, 2010). Entre as bandejas, foram colocados separadores de aço inox, para intercalar embalagens e espaço vazio, facilitando a transferência de calor. Os separadores são de diversas alturas, possibilitando o processo de vários tamanhos de embalagens (Figura 8). No presente trabalho, a distância entre os espaços vazios foi de 1,9 cm e entre as bandejas contendo as embalagens foi de 4,2 cm, limitando a expansão das embalagens. Como meio de aquecimento foi utilizado água sem sobrepressão.

**Figura 8** – Suporte para acomodação das embalagens durante o tratamento térmico.



### 3.2.2.2 Ensaio de penetração de calor e Monitoramento da temperatura dos mexilhões durante o tratamento térmico

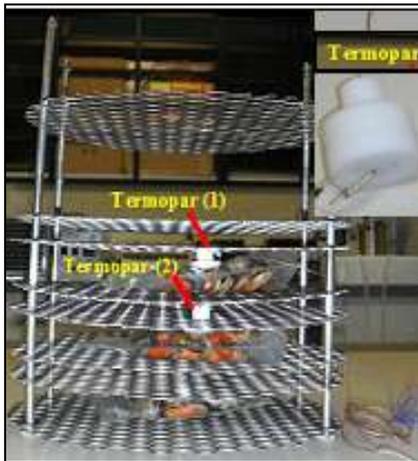
Para o monitoramento da temperatura de processo, foram utilizados três termopares tipo T (Marca IOPE, modelo TX-TF-TF-R-32AWG, Brasil), conectados a uma unidade de aquisição de dados (Marca Agilent, modelo 34970, Malásia). Os mesmos foram calibrados utilizando um banho termostático (Marca Quimis, modelo Q214M2, Brasil), na faixa de temperatura de 5 a 95 °C. Um termômetro de mercúrio aferido (Marca Incoterm, modelo 283/01, Brasil) foi utilizado

como padrão. As curvas de calibração de termopares estão apresentadas no Apêndice A.

A distribuição de temperaturas e a eventual presença de pontos frios na autoclave foram testadas em condições operantes (incluindo o suporte e as *stand up pouches* preenchidas com 150 g de mexilhão).

A autoclave foi preenchida com água à temperatura ambiente ( $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e o sistema de aquecimento, por resistência elétrica foi acionado. Assim que a temperatura da água atingiu  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , o suporte com as *stand up pouches* foram mergulhados e mantidos por 10 minutos. Dois termopares previamente calibrados e conectados a um sistema de aquisição de dados foram posicionados na parte superior, central e inferior do suporte das amostras, conforme apresentado na Figura 9.

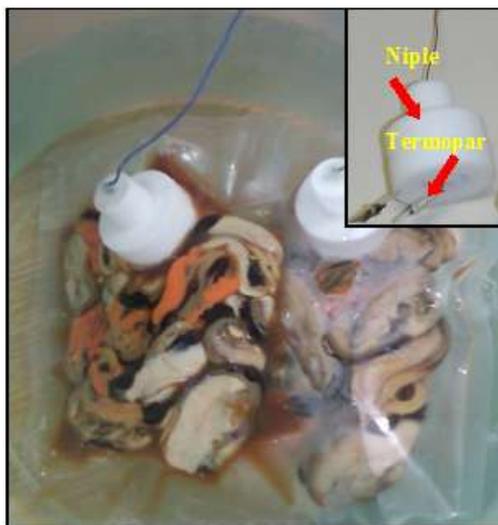
**Figura 9** – *Stand up pouches* e dos termopares para o ensaio da distribuição de calor.



Durante os ensaios de penetração de calor, foram registrados o tempo e a temperatura para obtenção das curvas de aquecimento e resfriamento (perfil de temperatura) dos mexilhões. As *stand up pouches* foram preenchidas com 150 g de mexilhão, sendo que para cada ensaio realizado foram utilizados mexilhões de lotes diferentes.

A temperatura do mexilhão localizando no centro das embalagens foi medida a cada 10 segundos através de termopares do tipo T, inseridos em tubos de inoxidável e acoplados nas mesmas por um “niple” de teflon, constituído por um conjunto plástico. Foi colocado um termopar em cada embalagem, sendo que a junta do mesmo foi disposta no interior de um mexilhão situado no centro da embalagem (Figura 10).

**Figura 10** – *Stand up poche* contendo mexilhão e termopar acoplado por um “niple”.



No ensaio de penetração de calor, as embalagens com mexilhão, mantidas à temperatura de refrigeração de 10 °C foram colocadas na autoclave com água de imersão à temperatura de 80 °C e, após 10 minutos, as embalagens com mexilhão foram retiradas e resfriadas.

Após o tempo de processo de cada ensaio, o suporte de confinamento com as embalagens foi retirado da autoclave e imerso em água e gelo para o resfriamento do produto até a temperatura de aproximadamente 10 °C. Após o resfriamento, as embalagens foram armazenadas nas temperaturas de estudo (4, 10 e 15 °C), para posterior análise.

O cálculo da letalidade de processo (Equação 2) baseou-se nos resultados de curvas de penetração de calor, considerando a *Salmonella* spp. ( $D_{65,5^{\circ}\text{C}}=0,25$  e  $z=5,5$ ) como sendo o micro-organismo alvo (LIMA, 2010).

### 3.2.3 *Análise Microbiológica de Patógenos*

As análises microbiológicas de patógenos foram realizadas para o estudo preliminar (amostras: P1, P2, P3 e P4) e para o estudo da vida útil (amostras A1 e A4). No primeiro dia, para o estudo preliminar foi

analisada somente a amostra P1 (controle), no estudo da vida útil foram analisadas as amostras A1 (controle) e A4 (O.E. com tratamento térmico). No sétimo dia de armazenamento, todas as amostras do estudo preliminar e do estudo da vida útil foram analisadas. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LABCAL) do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. As análises foram realizadas de acordo com a metodologia da Associação Americana de Saúde Pública (APHA, 2001). As análises realizadas foram: Coliformes (45 °C), Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Vibrio parahaemolyticus*.

### 3.2.4 Análises Microbiológicas de Deteriorantes

Em cada ponto experimental avaliado retirou-se uma *stand up pouch* cujo conteúdo (150 g) foi triturado em liquidificador (Marca ARNO, modelo OPTIMIX), em copo previamente esterilizado em autoclave. Foram transferidos assepticamente 25 g de amostra triturada para um saco homogeneizador (*Interscience, polysilk* e sem filtro), adicionando 225 mL de água peptonada 0,1% esterilizada (Difco Bacto Peptone, Le Pont de Claix, França), obtendo a diluição  $10^{-1}$ . As amostras foram homogeneizadas em *Stomacher* (Marca ITR, Modelo 1204) durante 60 segundos. A seguir, foram realizadas as diluições decimais seriadas. A diluição  $10^{-2}$  foi obtida retirando 1 mL da diluição  $10^{-1}$  e transferida para tubos de ensaio contando 9 mL de água peptonada. As demais diluições foram realizadas pelo mesmo procedimento, até se atingir a diluição necessária para as contagens. Na obtenção de cada diluição, os tubos de ensaio foram agitados em agitador de tubos tipo Vortex (Marca BIOMIXER, Modelo VTX-F). Todas as análises foram realizadas em duplicata (SILVA, et al., 2007).

As diluições foram plaqueadas em função do nível estimado de contaminação, de modo a se obter placas com contagens entre 30 a 300 unidades formadoras de colônias (UFC), evitando-se assim contaminações externas ou sobreposições de colônias, sendo os resultados apresentados em UFC/g. Foi realizado duplicata do plaqueamento.

#### 3.2.4.1 Contagem de bactérias ácido lácticas

Para contagem de bactérias lácticas semeou-se 1 mL de cada diluição selecionada com uma pipeta, em placas de Petri estéreis (técnica *pour plate*) contendo o meio de cultura Ágar De Man, Rogosa e

Sharpe (MRS) (Difco Lactobacilli MRS Broth, Le Pont de Claix, França). Homogeneizou-se adequadamente o Ágar com o inóculo, e após a secagem da cultura sobre o Ágar, as placas receberam uma camada extra de Ágar MRS. As placas foram incubadas invertidas em estufa bacteriológica (Marca TECNAL, Modelo BOD Te 391-1) a 30 °C por 48-72 horas (DALCANTON, 2010).

#### **3.2.4.2 Contagem total de aeróbios mesófilos em placa**

Para contagem total de aeróbios mesófilos, semeou-se 1 mL de cada diluição selecionada, com uma pipeta, em placas de Petri estéreis (técnica *pour plate*) contendo meio de cultura Ágar Padrão para Contagem (APC) (Difco Plate Count Agar, Le Pont de Claix, França). As placas foram homogeneizadas e incubadas invertidas em estufa bacteriológica a 35-37 °C (Marca TECNAL, Modelo BOD Te 391-1) por 72 horas (APHA, 2001; VANDERZANT e SPLITTSTOESSER, 1992).

#### **3.2.4.3 Contagem de micro-organismos psicrófilos**

A contagem de micro-organismos psicrotróficos foi realizada com a semeadura de 1 mL de cada diluição selecionada, com uma pipeta, em placas de Petri estéreis (técnica *pour plate*) contendo meio de cultura APC (Difco Plate Count Agar, Le Pont de Claix, França). As placas foram homogeneizadas e incubadas invertidas em estufa bacteriológica (Marca DIST, Modelo BOD DI 312-240 M) a 20 °C por 72 horas (FRANCO, 2003).

#### **3.2.4.4 Contagem de micro-organismos psicrotróficos**

A contagem de micro-organismos psicrotróficos foi realizada com a semeadura de 1 mL de cada diluição selecionada, com uma pipeta, em placas de Petri estéreis (técnica *pour plate*) contendo meio de cultura APC (Difco Plate Count Agar, Le Pont de Claix, França). As placas foram homogeneizadas e incubadas invertidas em estufa bacteriológica (Marca DIST, Modelo BOD DI 312-240 M) a 7 °C por 10 dias (FRANK, CHRISTEN e BULLERMAN, 1992).

Transcorrido o tempo de incubação para os quatro grupos microbianos em estudo, a contagem do número de colônias foi realizada com o auxílio de um contador de colônias (Marca PHOENIX, Modelo EC 550), das duplicatas que apresentaram contagens entre 30 e 300 UFC. O resultado foi obtido pela multiplicação da média aritmética das

duplicatas pelo respectivo valor de diluição. Os resultados foram expressos em UFC g<sup>-1</sup> de mexilhão.

### **3.2.5 Determinação do pH**

O pH dos mexilhões foi determinado pelo método eletrométrico, em pHmetro (Marca ANALION, Modelo AN 2000). A leitura do pH foi realizada conforme a metodologia oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1980), onde 50 g de amostra de cada tratamento foram homogeneizadas em Ultra-Turrax (Ika T25, Alemanha) até a formação de uma pasta. Em seguida, o eletrodo do pHmetro foi inserido diretamente na amostra, realizando a leitura. A análise foi realizada em triplicata.

## **3.3 COMPARAÇÃO DA DETERIORAÇÃO SENSORIAL COM O CRESCIMENTO MICROBIANO**

As amostras foram comparadas sensorialmente (avaliação visual e olfativa) com o crescimento microbiano em dias alternados. A análise visual para os quatro tratamentos foi realizada verificando a mudança de cor, formação de limo, formação de exsudado e estufamento das embalagens. A análise olfativa foi realizada observando a perda de odor característico de mexilhão e/ou de óleo essencial de orégano.

## **3.4 MODELAGEM MATEMÁTICA DAS CURVAS DE CRESCIMENTO MICROBIANO**

### **3.4.1 Modelos Primários de Crescimento**

A partir dos dados de crescimento dos quatro grupos microbianos obtidos nas amostras de mexilhão submetidos aos diferentes tratamentos avaliados e armazenados a diferentes temperaturas (4, 10 e 15 °C) (Bactérias Ácido Lácticas, Contagem Total, Psicrófilos e Psicrotróficos). O modelo de Baranyi e Roberts (1994) (Equação 13) foi ajustado aos dados experimentais de crescimento pelo *software* MATLAB R2011a (The MathWorks Inc®, Natick, USA) para obtenção dos parâmetros de crescimento: duração da fase lag ( $\lambda$ ), velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e o aumento logarítmico da população microbiana (A).

### 3.4.2 Modelos secundários

Após a obtenção dos parâmetros primários de crescimento ( $\lambda$ ,  $\mu$  e  $A$ ), cinco modelos secundários foram comparados, e o melhor modelo foi utilizado para descrever a influência da temperatura sobre estes parâmetros. Na Tabela 3 são apresentadas as equações dos modelos secundários utilizados. Os modelos foram ajustados com auxílio do *software* Excel (Microsoft®).

**Tabela 3** – Modelos secundários usados para descrever a influência da temperatura nos parâmetros do crescimento microbiano.

Modelos Secundários	Equações
Linear	$k = b + rT$
Raiz Quadrada	$k^{1/2} = b(T - T_{\min})$
Tipo Arrhenius	$k = A \exp(-E_a/RT)$
Potência	$k = bT^n$
Exponencial	$k = a \exp(bT)$

onde:  $k$  é o parâmetro de interesse ( $\lambda$ ,  $\mu$  e  $A$ ),  $T$  é a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $T_{\min}$  é a temperatura mínima para o crescimento ou coeficiente do modelo e  $a$ ,  $b$ ,  $r$  e  $n$  são coeficientes do modelo.

### 3.4.3 Análise Estatística

A capacidade dos modelos primários e secundários em descrever os dados experimentais foi analisada através dos índices estatísticos: coeficiente de correlação ( $R^2$ ), erro médio quadrático (MSE), fator bias e fator exatidão.

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) é uma medida da proporção da variabilidade em uma variável explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas.

As equações utilizadas para calcular o erro médio quadrático (MSE), fator bias e fator exatidão são apresentadas na Tabela 4 (COSTA e KRISTBERGSSON, 2009; ROSS e McMEEKIN, 1994; XING et al., 2012).

**Tabela 4** – Índices estatísticos utilizados para comparação dos modelos.

Índices Estatísticos	Equações
Erro médio quadrático (MSE)	$MSE = \frac{\sum (\text{Valor}_{\text{observado}} - \text{Valor}_{\text{predito}})^2}{n - p}$
Fator bias	$\text{fatorbias} = 10^{\left( \frac{\sum \log(\text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{predito}})}{n} \right)}$
Fator exatidão	$\text{fatorexatidão} = 10^{\left( \frac{\sum  \log(\text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{predito}}) }{n} \right)}$

onde  $n$  é o número de dados experimentais e  $p$  é o número de parâmetros do modelo.

## CAPÍTULO 4

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1 COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORÉGANO E MANJERICÃO

Os resultados da análise cromatográfica para verificação da composição química do O.E.O e O.E.M utilizados nos estudos preliminares, antes e após a esterilização, são apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

**Tabela 5** – Compostos identificados no O.E.O.<sub>p</sub>\* antes e após esterilização com os tempos de retenção e concentração relativa (%) detectados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Tempo de retenção (min)	Componentes	Concentração relativa (%)		Tempo de retenção (min)	Componentes	Concentração relativa (%)	
		Antes esterilização				Após esterilização	
8,25	$\alpha$ -felandreno	0,14		8,27	$\alpha$ -tujeno	0,12	
8,52	$\alpha$ -pineno	1,73		8,57	$\alpha$ -pineno	1,41	
9,05	Cafeno	0,40		9,08	Canfeno	0,34	
9,94	$\beta$ -pineno	0,49		9,96	$\beta$ -pineno	0,35	
10,23	$\beta$ -mirceno	1,12		10,28	$\beta$ -mirceno	0,83	
11,57	p-cimeno	14,99		11,65	p-cimeno	12,60	
11,73	Eucaliptol	0,51		11,79	eucaliptol	0,45	
12,56	$\gamma$ -terpineno	2,53		12,6	$\gamma$ -terpineno	1,87	
13,98	Linalol	2,43		13,97	linalol	2,26	
17,13	Estragole	5,29		17,15	estragole	7,93	
20,66	Carvacrol	48,58		20,6	carvacrol	55,42	
27,31	óxido de cariofileno	1,46		27,3	óxido de cariofileno	1,63	

O.E.O.<sub>p</sub>\* - óleo essencial de orégano utilizado nos experimentos preliminares

A composição do O.E.O. esterilizado, utilizado no estudo preliminar, variou em relação ao óleo não esterilizado. Na amostra do O.E.O. não esterilizado, a análise identificou 12 compostos, totalizando 79,5 % dos componentes totais do óleo. Carvacrol (48,58 %) foi o componente majoritário, seguido do p-cimeno (14,99%), estragole

(5,29 %),  $\gamma$ -terpineno (2,53 %) e linalol (2,43 %). Na amostra de O.E.O. esterilizado, 12 componentes também foram encontrados, totalizando 85,5 % dos componentes. Comparando a composição antes e após o tratamento térmico, pode-se observar que houve um aumento na porcentagem de carvacrol (de 48,58 para 55,42 %) e estragole (de 5,29 para 7,93 %). Souza, et al., (2008) estudaram a interferência do aquecimento (80, 100, 120 e 180 °C por 3 horas) sobre a composição química de O.E.O. Os autores verificaram um aumento na porcentagem de carvacrol,  $p$ -cimeno e  $\gamma$ -terpineno. Tomaino et al. (2005) verificaram a influência do aquecimento sobre a atividade antioxidante e química de óleos essenciais. Para o óleo de noz-moscada, houve um aumento nas porcentagens dos componentes safrol e miristicina quando submetidos às temperaturas de 100, 120 e 180 °C por 10 minutos. Os autores consideraram que a elevação da concentração de alguns componentes pode estar relacionada com a maior capacidade desses de sequestrar radicais livres e interagir com compostos bioativos e secundários. Os outros componentes majoritários sofreram pequenas reduções com o processo de esterilização.

Haberbeck et al. (2012) também encontraram carvacrol (59,44 %),  $p$ -cimeno (12,27 %) e  $\gamma$ -terpineno (8,63 %) como componentes majoritários em O.E.O. sem tratamento térmico.

**Tabela 6** – Compostos identificados no O.E.M. antes e após esterilização, com os tempos de retenção e concentração relativa (%) detectados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Tempo de retenção (min)	Componentes	Concentração relativa (%) Antes esterilização	Tempo de retenção (min)	Componentes	Concentração relativa (%) Após esterilização
8,56	$\alpha$ -pineno	0,27	8,54	$\alpha$ -pineno	0,27
9,8	$\beta$ -tueno	0,08	9,78	$\beta$ -tueno	0,08
9,97	$\beta$ -pineno	0,26	9,97	$\beta$ -pineno	0,25
10,28	$\beta$ -mirceno	0,18	10,27	$\beta$ mirceno	0,18
11,52	p-cimeno	2,06	11,54	p-cimeno	1,89
11,8	eucaliptol	4,31	11,8	eucaliptol	4,01
12,13	$\beta$ -ocimeno	0,10	12,12	$\beta$ -ocimeno	0,10
12,56	$\gamma$ -terpineno	0,17	12,56	$\gamma$ -terpineno	0,17
13,94	Linalol	1,96	13,96	linalol	1,98
15,54	Cânfora	0,35	17,69	estragole	83,80
17,63	Estragole	83,25	19,91	fenol	0,42
19,93	Fenol	0,51	21,36	eugenol	0,18
22,58	Benzeno	0,58	22,61	benzeno	0,60
23,44	$\alpha$ -bergamoteno	1,70	23,46	$\alpha$ -bergamoteno	1,78
28,56	t-cadinol	0,48	25,49	naftalina	0,34
			28,58	t-cadinol	0,50

Na amostra de O.E.M. antes da esterilização, foram encontrados 15 componentes, totalizando 96,2 % dos componentes totais do óleo. O estragole (83,25 %) foi o componente majoritário, seguido do eucaliptol (4,31 %), p-cimeno (2,06), linalol (1,96 %) e  $\alpha$ -bergamoteno (1,70 %). Na amostra esterilizada, foram encontrados 16 componentes, totalizando 96,5 % dos componentes totais. O estragole (83,8 %), linalol (1,98 %) e  $\alpha$ -bergamoteno (1,78 %) foram os componentes que sofreram um leve aumento em suas porcentagens e os demais componentes majoritários sofreram pequenas reduções. Jelacic et al. (2011) em análise de O.E.M. sem tratamento térmico, encontraram uma porcentagem menor (16,8%) de estragole e uma maior porcentagem de linalol (55,71 %), quando comparado com presente estudo. Sajjadi (2006) analisou O.E.M. e também encontrou como componente majoritário estragole (52,4%) e linalol (20,1%).

Como foi usado O.E.O. de outra procedência na realização da parte final do trabalho devido ao grande número de experimentos, uma nova análise de composição foi realizada e é apresentada na Tabela 7.

**Tabela 7** – Compostos identificados no O.E.O. antes e após pasteurização, com os tempos de retenção e concentração relativa (%) detectados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

Tempo de retenção (min)	Componentes	Concentração relativa (%)	Tempo de retenção (min)	Componentes	Concentração relativa (%)
		Antes pasteurização			Após pasteurização
8,3	$\alpha$ -tujeno	0,48	8,28	$\alpha$ -tujeno	0,45
8,58	$\alpha$ -pineno	1,77	8,57	$\alpha$ -pineno	1,74
9,09	Canfeno	0,58	9,09	canfeno	0,57
9,98	$\beta$ -pineno	0,64	9,98	$\beta$ -pineno	0,69
10,31	$\beta$ -mirceno	1,34	10,3	$\beta$ -mirceno	1,29
11,24	careno	0,88	11,23	careno	0,88
11,66	p-cimeno	13,48	11,64	p-cimeno	13,43
11,81	eucaliptol	0,31	11,79	eucaliptol	0,30
12,7	$\gamma$ -terpineno	6,25	12,66	$\gamma$ -terpineno	6,30
13,96	linalol	2,68	13,97	linalol	2,64
18,08	benzeno	0,15	18,08	benzeno	0,14
20,64	carvacrol	69,01	20,53	carvacrol	41,83
23,21	cariofileno	0,92	23,2	cariofileno	0,96
27,28	óxido de cariofileno	0,77	27,26	óxido de cariofileno	0,71

Na análise das moléculas da amostra de O.E.O antes da pasteurização, foi possível identificar 14 componentes, totalizando 99,2 % dos componentes totais do óleo. O carvacrol (69,01 %) foi o componente majoritário, seguido do p-cimeno (13,48 %),  $\gamma$ -terpineno (6,25 %), linalol (2,68 %) e  $\alpha$ -pineno (1,77 %). O carvacrol foi o componente que mais sofreu com a pasteurização, reduzindo o equivalente a 27,19 % (de 69,01 para 41,83 %) após o tratamento térmico. Para os demais componentes, a pasteurização não influenciou a composição, variando entre 0,02-0,05 %.

Comparando os dois lotes de O.E.O. (Tabela 5 e 7), é possível verificar variações na composição, especialmente em relação aos compostos  $\alpha$ -tujeno, careno, benzeno e estragole. Isso pode se devido a fatores como localização geográfica do cultivo, clima, solo, parte da planta utilizada e as técnicas de extração (BURT, 2004).

Os cromatogramas das análises realizadas encontram-se no ANEXO B.

#### 4.2 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORÉGANO E MANJERICÃO SOBRE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS E DETERIORANTES

Neste item serão apresentados os resultados do estudo preliminar, avaliando o efeito dos óleos essenciais em estudo sobre o crescimento e a inativação de micro-organismos patogênicos. Os resultados apresentados são das análises do primeiro dia (amostras sem tratamentos) e sétimo dia de armazenamento a 10 °C. Os laudos das análises microbiológicas de micro-organismos patogênicos encontra-se no ANEXO C.

Os resultados das análises de micro-organismos patogênicos em mexilhões pré-cozidos no primeiro dia de armazenamento são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8** – Resultados das análises microbiológicas para patógenos em mexilhões pré-cozidos no primeiro dia de armazenamento.

Análises Microbiológicas	Resultado
Coliformes termotolerantes (45 °C)	< 1,8 NMP/g
Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva	< 1,0 x 10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	< 1,8 NMP/g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Presença em 25g
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência em 25g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	< 3 NMP/g

Os resultados das análises de micro-organismos patogênicos em mexilhões pré-cozidos tratados com O.E.O. e O.E.M. comparados ao controle, no sétimo dia de armazenamento são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9** – Efeito da atividade antibacteriana de O.E.O. e O.E.M. em micro-organismos patogênicos em mexilhões pré-cozidos nas diferentes concentrações no sétimo dia de armazenamento, comparado ao controle (sem tratamento) a 10 °C.

Análises Microbiológicas	Tratamentos			
	Controle	0,2% O.E.O.	0,4% O.E.O.	0,4% O.E.M.
Coliformes termotolerantes (45 °C)	< 3 NMP/g	< 3 NMP/g	< 3 NMP/g	< 3 NMP/g
Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva	< 1,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/g			
<i>Escherichia coli</i>	< 3 NMP/g	< 3 NMP/g	< 3 NMP/g	< 3 NMP/g
<i>L. monocytogenes</i>	Presente 25g	Ausência em 25g	Ausência em 25g	Ausência em 25g
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência em 25g	Ausência em 25g	Ausência em 25g	Ausência em 25g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	< 3 NMP/g	< 3 NMP/g	< 3 NMP/g	< 3 NMP/g

Em relação ao primeiro dia, os resultados mostraram que os óleos parecem apresentar potencial antimicrobiano de inativação da *Listeria monocytogenes*. Cabe ressaltar, entretanto, que devido à baixa incidência deste microrganismo no alimento em estudo, o fato desta bactéria não estar presente após sete dias de armazenamento pode estar relacionado ao efeito do óleo ou à ausência da bactéria na amostra analisada. O efeito antimicrobiano do OE sobre *L. monocytogenes* foi relatado por vários autores na literatura. Teixeira et al. (2013) determinaram a eficácia de 17 óleos essenciais para inibir o crescimento de sete micro-organismos deteriorantes (*Bochothirix thermosphacta*, *Pseudomonas putida* e *Shewanella putrefaciens*) e patogênicos (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *Salmonella typhimurium*). Foi verificado que todos os O.Es inibiram o crescimento de pelo menos de quatro espécies de bactérias testadas. As reduções obtidas para *L. monocytogenes* foram de 7,3 UFC/mL com O.E.O. e 2,8 UFC/mL com

O.E.M. a concentração mínima inibitória utilizada para esses dois óleos foi de  $< 3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ .

A eficiência desses antimicrobianos naturais têm sido relatada na literatura, e a interação de alguns componentes dos O.Es com os lipídios da membrana celular de bactérias Gram-positivas torna a membrana mais permeável, ocorrendo à migração de compostos desses óleos para dentro da célula, provocando a lise celular (OYEDEMI et al., 2009).

Para Coliformes termotolerantes (45 °C) e *Escherichia coli*, entre o primeiro e sétimo dia de armazenamento, não houve mudança no crescimento. Em ambos em casos a baixa detecção foi determinada pelo método utilizado.

No presente estudo, foi possível observar que as amostras tratadas com 0,2 % de óleo essencial do orégano apresentaram o mesmo efeito antimicrobiano do que nas amostras tratadas com 0,4 % de O.E.O. e O.E.M em relação a *Vibrio parahaemolyticus*, *Estafilococos Coagulase Positiva* e *Listeria monocytogenes*. Os resultados encontrados no presente estudo mostram que a utilização de antimicrobianos naturais torna-se uma tecnologia possível para a conservação de alimentos, mas vale ressaltar que o estudo das concentrações desses agentes, devem ser analisados sistematicamente para que não possa ocorrer interferência sensorial quando aplicados em produtos alimentícios. Desta forma, 0,2% de óleo de orégano destacou-se por o fator econômico e também pela minimização de possíveis problemas de aceitação sensorial.

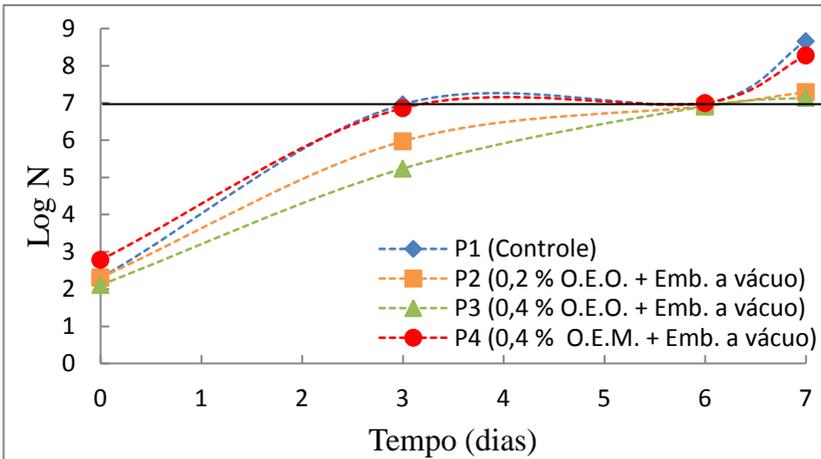
Foi avaliado também a cinética de ação dos óleos essenciais de orégano e manjeriço sobre as bactérias deteriorantes de mexilhões.

#### **4.2.1 Efeito dos óleos essenciais de orégano e manjeriço na cinética de crescimento microbiano em mexilhões embalados a vácuo**

As alterações na microbiota de mexilhões durante o armazenamento a 10 °C, sob condições de vácuo, com e sem as concentrações de óleo essencial de orégano e manjeriço, para BAL e CT são mostrados nas Figuras 11 e 12, respectivamente. A contagem inicial de BAL foi de 2,3 Log UFC/g (dia 0) e atingiu uma contagem de 6,96 Log UFC/g no 3º dia armazenamento para amostra P1 (controle). A aplicação de O.E.O., nas concentrações de 0,2 (P2) e 0,4 % (P3) (v/m), em mexilhões embalados a vácuo estendeu a vida útil desses produtos para 7 dias, quando as amostras atingiram concentrações de 7,29 Log UFC/g para amostra P2 e 7,14 Log UFC/g para amostra P3. A amostra P4 (0,4 % O.E.M.) atingiu uma contagem final de 7 Log UFC/g

no 6 dia de armazenamento, indicado por uma linha contínua. Atrea et al. (2009) avaliaram o efeito de embalagem a vácuo e óleo essencial de orégano na vida útil de polvos armazenados a 4 °C, em que a contagem final para BAL, no 23° dia de armazenamento foi de 6,9 Log UFC/g, para amostra controle a vida útil foi definida no 9° dia de armazenamento.

**Figura 11** – Evolução do crescimento de BAL em mexilhões embalados a vácuo, tratados com óleo essencial de orégano e manjeriçã.

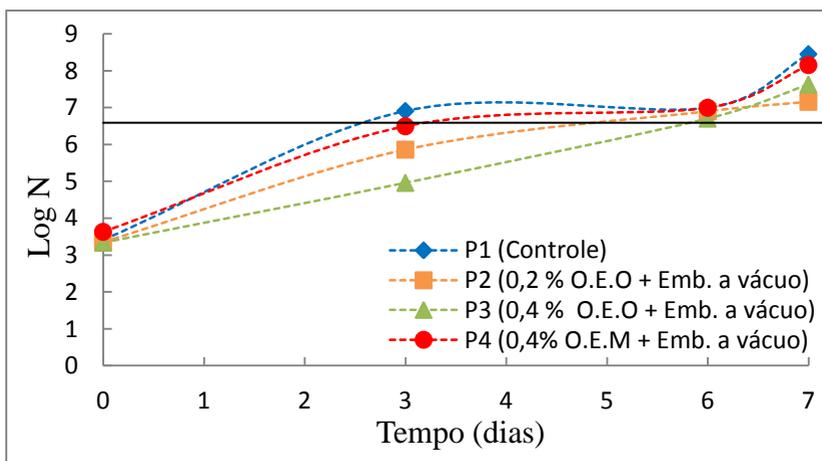


Estudos envolvendo aplicação de O.Es para avaliar a vida útil de pescados e em frutos do mar têm sido reportado na literatura. A resistência de BAL aos O.Es é devido a capacidade de gerar ATP sob condições de stress osmótico e responder de maneira eficaz o efluxo provocado por muitos agentes antimicrobianos (BURT, 2004; FRANGOS, et al., 2010).

A contagem de mesófilos (Figura 12) aumentou para todas as amostras ao longo do tempo de armazenamento. As contagens das amostras tratadas com O.E.O. foram menores quando comparadas com a amostra P1 (controle) e a amostra P4 (0,4 % de O.E.M.). A contagem inicial de mesófilos para amostra A1 foi de 3,4 Log UFC/g. Hurtado et al., (2001) e Vaz-Pires e Barbosa (2004) encontraram contagens iniciais próximas de mesófilos (entre 3 e 4 Log UFC/g) em polvo fresco. No 3° dia de armazenamento, a amostra P1 (controle) e P4 (0,4 % O.E.M.) estavam muito próximas do limite de aceitabilidade de pescados para espécies de água doce e marinha proposto por ICSMF (1986),

considerando o valor de 7 Log UFC/g. As amostras P2 (0,2 % de O.E.O.) e P3 (0,4 % de O.E.O.) excederam o limite permitido no 6º dia de armazenamento. A aplicação de O.E.O. em mexilhão resultou no aumento da vida útil, sob o ponto de vista microbiológico, de 3 para 6 dias. Este resultado pode ser atribuído aos componentes fenólicos presentes no O.E.O, carvacrol e timol, conhecidos por exercer atividade antimicrobiana (BURT, 2004).

**Figura 12** – Evolução do crescimento de CT em mexilhões embalados a vácuo tratados com óleo essencial de orégano e manjerição.



Avaliado o crescimento desses dois grupos microbianos em mexilhão tratado com óleos essenciais, o O.E.O. na concentração de 0,4 % foi ligeiramente melhor no atraso do crescimento dos grupos microbianos estudados. Com os resultados obtidos, pode-se perceber que não houve um aumento muito significativo na vida útil de mexilhões. Assim, estudou-se o processo combinado O.E.O. e tratamento térmico com o objetivo de aumentar a vida útil, que por simplicidade, será chamado de tratamento termoquímico.

### 4.3 EFEITO TERMOQUÍMICO (ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO E CALOR) SOBRE A VIDA ÚTIL DE MEXILHÕES

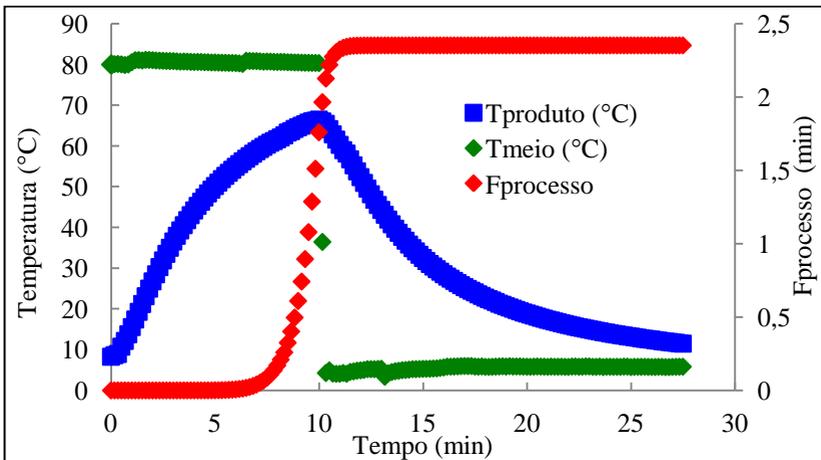
Considerando que o tratamento térmico é uma metodologia normalmente aplicada na indústria processadora de mariscos, testou-se o efeito combinado O.E.O. e calor sobre a vida útil de mexilhões.

### 4.3.1 Processamento Térmico

Os testes preliminares (dados não mostrados) foram realizados a fim de avaliar o bom desempenho da autoclave em relação à distribuição de calor. A diferença de temperatura nos vários pontos da autoclave, quando a temperatura operacional foi alcançada, foi no máximo de 0,6 °C. Ramaswamy et al., (1991) *apud* Cristianini (1998) relataram que uma diferença de 0,9 °C em relação à da temperatura de referência é aceitável, podendo ser considerada homogênea a distribuição de calor dentro do equipamento.

Na Figura 13 são apresentados os perfis de temperatura do produto no interior da *stand up poche* contendo 150 g de mexilhão e da temperatura do meio de aquecimento/resfriamento, assim como o valor de  $F_{\text{processo}}$ . O valor de  $F_{\text{processo}}$  foi calculado pela Equação 3.

**Figura 13** – Perfis de temperatura do produto na *stand up poche* contendo 150 g de mexilhão, da evolução do meio de aquecimento/resfriamento e valor de  $F_{\text{processo}}$ .



De acordo com o somatório da letalidade, o valor de  $F_{\text{processo}}$  de  $2,35 \pm 0,15$  minutos, mantendo o produto por 10 minutos submerso em água a 80 °C. Este valor de  $F_{\text{processo}}$  foi considerado adequado considerando que permite obter 9,4 reduções decimais do micro-organismo alvo (*Salmonella*). A temperatura inicial do produto foi 8 °C.

### 4.3.2 Efeito do tratamento termoquímico sobre micro-organismos patogênicos presentes em mexilhões embalados a vácuo

Neste item são apresentados os resultados do estudo em que se avaliou o efeito conjunto do óleo essencial de orégano e do tratamento térmico sobre o crescimento de micro-organismos patogênicos. Os resultados apresentados na Tabela 10 são para o primeiro e sétimo dia de armazenamento (10 °C) respectivamente. Comparando as análises microbiológicas do primeiro e sétimo dia de armazenamento, pode-se perceber que as contagens de Coliformes termotolerantes (45 °C) e *Escherichia coli* aumentaram de < 3,6 NMP/g para 23 NMP/g. As Contagens de Estafilococos Coagulase Positiva e *Vibrio parahaemolyticus* mantiveram-se constantes em <3NMP/g. Pode ser verificada a presença de *Listeria monocytogenes* nos dois estudos, assim como a ausência de *Salmonella* spp. em vinte e cinco gramas de amostra. O aumento das contagens de Coliformes termotolerantes (45 °C) e contagem de *E. coli* pode estar relacionado com a estação do ano que o estudo definitivo foi realizado, o verão, pois neste período há aumento o número de micro-organismos nas águas de cultivo (Jay, 2005). Lima (2010) considerou que outros fatores que também podem ter afetado no aumento das, podem ser deficiências na manipulação durante o desconchamento, uso contínuo da água e gelo sem trocas periódicas e temperatura do ambiente no local de processamento.

**Tabela 10** – Efeito do tratamento termoquímico (80 °C/10 minutos + 0,4 % de O.E.O) sobre micro-organismos patogênicos em mexilhões pré-cozidos no primeiro e sétimo dia de armazenamento a 10 °C.

Análises Microbiológicas	Tratamentos			
	Controle (1° dia)	Controle (7° dia)	0,4 % O.E.O. + Tratamento Térmico (1° dia)	0,4 % O.E.O. + Tratamento Térmico (7° dia)
Coliformes termotolerantes (45 °C) (NMP/g)	< 3,6	23	< 3	< 3
Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva (UFC/g)	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	<1,0 x 10 <sup>2</sup> *	<1,0 x 10 <sup>2</sup>	< 1,0 x 10 <sup>2</sup> *
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	3,6	23	3	3

<i>Listeria monocytogenes</i>	Presen. em 25 g	Presen. em 25 g	Ausen. em 25 g	Presen. em 25 g
<i>Salmonella</i> spp.	Ausen. em 25 g	Ausen. em 25 g	Ausen. em 25 g	Ausen. em 25 g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (NMP/g)	< 3	< 3	<3	<3

Controle: mexilhão pré-cozido sem aplicação de O.E.O. sem tratamento térmico.

\* contagem estimada.

Após sete dias de armazenamento a 10 °C, as amostras A1 (controle) e A4 (0,4 % de óleo essencial de orégano + tratamento térmico) foram submetidas a uma nova análise, a fim de avaliar o efeito do tratamento termoquímico sobre os micro-organismos. Os resultados mostraram que a combinação O.E.O. e tratamento térmico possibilitou uma redução nas contagens de Coliformes termotolerantes (45 °C) e *Escherichia coli* em relação ao tratamento controle. García-Linares et al. (2004) avaliando a qualidade microbiológica e nutricional de peixes processados a 90 °C/10 minutos verificaram a ausência de *E. coli* em até 45 dias de armazenamento mantidos a 4 °C. Cosansu et al. (2011) estudaram o efeito de suco de limão em pescado com tratamento térmico de 70 °C/10 minutos, verificaram que as contagens de *E. coli*, *V. parahaemolyticus* e *Salmonella* spp. foram inferiores a 1 Log UFC/g.

Conforme já observado quando apenas a ação antimicrobiana do óleo foi testada (item 4.2), o efeito do O.E.O. sobre a *L. monocytogenes* não foi conclusivo neste trabalho pois a ausência desta bactéria no primeiro dia e presença no sétimo dia (Tabela 10) pode estar relacionada a ausência da bactéria na amostra e não ao efeito do O.E.O. A detecção da bactéria pode ser explicada devido ao uso de lotes diferentes de mexilhões. Outro fator que pode estar relacionado com a resistência da *L. monocytogenes* no estudo é a influência da matriz alimentar, devido o mexilhão ser um alimento rico em proteínas.

Kruger (2006) avaliou o efeito inibitório de diferentes concentrações de nisina e O.E.O, empregados separadamente e em conjunto, no controle de *L. monocytogenes* em linguça. No estudo foi verificado que a ação inibitória desses compostos ocorre imediatamente após o contato do patógeno com produto e diminui consideravelmente em seguida, não se mantendo ao longo do armazenamento. Os resultados sugerem uma forte interferência da matriz alimentar na atividade antimicrobiana da nisina e de O.E.O.

Abee e Peck (1995) estudaram a influência de vários componentes alimentares no crescimento e sobrevivência de micro-organismos patogênicos, com *L. monocytogenes* e *Clostridium botulinum* não proteolítico, em produtos “prontos para consumo” (*sous vide*). Seus resultados são importantes na avaliação de tratamentos térmicos necessários para garantir a segurança de alimentos, como *sous vide* e frutos do mar particularmente.

### **4.3.3 Efeito do tratamento termoquímico sobre os micro-organismos deteriorantes de mexilhões embalados a vácuo**

Neste item é discutido o efeito do tratamento termoquímico sobre os micro-organismos deteriorantes de mexilhões embalados a vácuo e armazenados às temperaturas de 4, 10, e 15 °C. Estas temperaturas foram escolhidas, pois 4 e 10 °C estão na faixa considerada de refrigeração e 15 °C é uma temperatura de abuso térmico que pode ocorrer durante o armazenamento/comercialização de mexilhões. Estudos comparativos utilizando somente o tratamento térmico (sem O.E.O.) e somente O.E.O (sem tratamento térmico) também foram avaliados.

O crescimento de bactérias ácido lácticas (BAL), contagem total (CT), psicrófilos (PSC) e psicrotróficos (PST) nas amostras controle e nas tratadas termicamente com O.E.O. ou não são apresentadas nas Figuras 15, 16, 17 e 18, respectivamente.

As BAL são anaeróbias facultativas, que crescem em condições de microaerófilia e fazem parte da microbiota natural de pescados e frutos do mar (JAY, 2005; MEXIS, CHOULIARA e KONTOMINAS, 2009). A contagem inicial para BAL (dia 0) foi de 4,91 Log UFC/g e atingiu uma contagem de 7,21 Log UFC/g no 21° dia de armazenamento, para amostra A1 (controle). No mesmo dia de armazenamento (dia 0), a contagem foi de 3,97 Log UFC/g para a amostra A2 (com tratamento térmico), 2,26 Log UFC/g para a amostra A3 (0,4 % de O.E.O. sem tratamento térmico) e 1,74 Log UFC/g para amostra A4 (0,4 % de O.E.O. com tratamento térmico). O tratamento termoquímico reduziu 3,17 ciclos logarítmicos, em relação à amostra A1 (controle). A contagem final para o último tratamento atingiu 7,11 Log UFC/g no 51° dia de armazenamento, aumentando a vida útil desse produto para mais 30 dias em relação à amostra A1 (controle), quando armazenado a 4 °C.

Alguns autores destacaram a importância das BAL na deterioração de produtos marinhos. Pyrgotou et al. (2009) avaliaram o

efeito do sal, O.E.O. e atmosfera modificada na qualidade de filés de trutas armazenadas a 4 °C. A vida útil desse produto nessas condições foi de 21 dias. Esses autores relatam a predominância de BAL em pescados armazenados sob condições de vácuo e atmosfera modificada.

Kykkidou et al. (2009) observaram o efeito de óxido de etileno, óleo essencial de tomilho combinado com atmosfera modificada em filés de espadarte, e verificaram que essa combinação não teve efeito sobre o crescimento das BAL. A ação limitada de O.E.O. no crescimento de BAL é atribuída à alta tolerância deste grupo de bactérias Gram positivas à sua capacidade de gerar ATP e lidar com condições de estresse osmótico (BURT, 2004).

A contagem inicial de CT para a amostra A1 (controle) (dia 0) foi de 5,44 Log UFC/g. Gonzáles-Fandos et al. (2005) também encontraram contagens elevadas de CT, 4,77 Log UFC/g em filés de pescados, esses valores podem ser explicados devido a estação do ano em que os experimentos foram conduzidos. Após os tratamentos anteriores ao armazenamento a 4 °C, as contagens iniciais (5,44 Log UFC/g) diminuiram para todas as amostras. A amostra A2 (com tratamento térmico) apresentou contagem de 4,62 Log UFC/g, A3 (0,4 % de O.E.O. sem tratamento térmico) contagem de 3,69 UFC/g e A4 (0,4 % de O.E.O. com tratamento térmico) contagem de 2,30 Log UFC/g. Esses resultados mostram que os tratamentos são capazes de diminuir a concentração de CT. Para a amostra tratada termoquimicamente (A4) essa redução foi de 3,14 ciclos logarítmicos, quando comparado com a amostra controle.

Considerando que a vida útil de mexilhões termina com contagens de 7 Log UFC/g (ICSMF 1986), as amostras A1 e A2 chegaram ao fim da vida útil no 21° de armazenamento. De acordo com Carlin et al. (2000) os micro-organismos mesófilos podem sobreviver durante o processo de pasteurização e continuar crescendo, mesmo sob condições de refrigeração. Assim, o controle de micro-organismos sobreviventes é importante para assegurar a qualidade de pescados e frutos do mar. As amostras A3 e A4 antigiram contagens finais de 7,03 Log UFC/g no 31° dia e 6,98 Log UFC/g no 51° dia de armazenamento, respectivamente, apresentando um aumento importante na vida útil dos mexilhões em relação à amostra A1 (controle).

A contagem inicial de PSC na A1 (controle) foi de 5,80 Log UFC/g., valor considerado próximo ao limite do processo de deterioração ( $10^6$ ). Esse valor significa que o alimento ainda não está deteriorado, ao ultrapassar esse limite, a degradação é muito rápida. Porém a velocidade de degradação depende do tipo de alimento, e pode

ocorrer dentro de um dia ou dois para alimentos perecíveis, atingindo níveis de  $10^8$  UFC/g (FRANÇA FILHO et al., 2006). O valor dessa contagem pode ser decorrente de problemas de contaminação da matéria-prima em função da água de cultivo e da água de resfriamento na etapa de desconchamento. Lima (2010) encontraram contagens de psicrófilos próximos ao limite do início de deterioração em mexilhões acondicionados sob atmosfera modificada em embalagem flexível.

Após os tratamentos realizados as amostras sofreram reduções. A contagem inicial para amostra A2 (com tratamento térmico) foi de 4,65 Log UFC/g, A3 (0,4 % de O.E.O. sem tratamento térmico) 3,73 Log UFC/g e A4 (0,4 % de O.E.O. com tratamento térmico) 2,33 Log UFC/g. O tratamento termoquímico reduziu 2,07 ciclos logarítmicos, comparando à amostra A1 (controle). A contagem final para o último tratamento atingiu 7,04 UFC/g no 54° dias de armazenamento.

Assim, como as demais contagens, a contagem inicial de PST (dia 0) também foi elevada 5,79 Log UFC/g na amostra A1 (controle). A contagem inicial para a amostra A2 (com tratamento térmico) foi de 3,84 Log UFC/g, A3 (0,4 % de O.E.O. sem tratamento térmico) 3,73 Log UFC/g e A4 (0,4 % de O.E.O. com tratamento térmico) 1,81 Log UFC/g. Masniyom, Benjama e Maneesri (2012) encontraram contagens elevadas de psicrotóxicos em amostra controle de mexilhão 4,4 Log UFC/g. Os autores relatam que, logo quando foram tratados com mistura de óleo essencial de açafreão (O.E.A.) e óleo essencial de campim limão (O.E.CL) (0,25 % de O.E.A e 0,25 % de O.E.CL.) houve uma redução de 0,4 ciclos logarítmicos. No presente estudo, a amostra tratada apenas com O.E.O. apresentou uma redução de quase 2 ciclos logarítmicos e com tratamento termoquímico esta redução foi de quase 4 ciclos logarítmicos. Essas reduções, segundo Burt (2004), são decorrentes do elevado grau de hidrofobicidade que os O.Es possuem, que causam alterações na estrutura celular, resultando no aumento da permeabilidade e perdas de componentes celulares. As amostras A1 e A2 antigiram contagens finais de 7,0 Log UFC/g no 21° dia de armazenamento a 4 °C. Para a amostra A3, essa contagem foi apresentada no 31° dia de armazenamento e para amostra A4 no 57° dia de armazenamento.

A legislação brasileira não estabelece limites para a contagem de psicrófilos e psicrotóxicos em pescados e frutos do mar, porém sabe-se que altas contagens reduzem a vida útil desses produtos. No presente estudo, níveis superiores a  $10^7$  foram encontrados para as amostras A1 e

A2 no 33° dia de armazenamento, no 36° dia para amostra A3, e não verificado contagens superiores de  $10^7$  UFC/g para amostra A4.

A carga microbiana inicial para as amostras controle dos quatro grupos microbianos é consideravelmente elevada, devido o experimento ter sido conduzido no verão, ocorrendo um aumento na temperatura da água de cultivo, favorecendo a multiplicação de micro-organismos. Furlan (2005) verificou um aumento da população de micro-organismos no verão quando comparado aos outros períodos do ano. Rodrigues (1998) e Gelli e Carneiro (1998) também verificaram um aumento na densidade de micro-organismos, nos meses do verão. Apesar da pesquisa ter sido realizada em um período crítico do ano, vale ressaltar também que são os meses, normalmente, com maior demanda de consumo desse produto.

Comparando o efeito dos tratamentos realizados na vida útil de mexilhão, o tratamento termoquímico (calor e O.E.O.), foi o mais eficiente quando armazenado dentro do limite de refrigeração. Desse modo, pode-se observar pelas Figuras 15 (b e c), 16 (b e c) 17 (b e c) e 18 (b e c) que, com o aumento da temperatura, houve diminuição da eficiência dos tratamentos, como consequência diminuindo a vida útil desses produtos. Para a temperatura de 10 °C, as contagens finais de BAL para a amostra A4 (0,4 % de O.E.O. com tratamento térmico) foram de 7,14 Log UFC/g em 12 dias de armazenamento, e com 8 dias de armazenamento, CT de 6,85 Log UFC/g, PSC de 6,89 Log UFC/g e PST de 6,87 Log UFC/g. González-Fandos et al. (2005) avaliaram a qualidade microbiológica de fatias de salmão armazenados a 2 e 10 °C em três combinações de tempo/temperatura. Os filés de salmão tratados por 15 minutos/90 °C tiveram a vida útil prolongada para 45 dias quando armazenados a 2 °C. Quando armazenado a 15 °C, a amostra A4 (0,4 % de O.E.O. com tratamento térmico) as contagens finais para BAL atingiram 6,97 Log UFC/g em 10 dias de armazenamento, CT 7,14 Log UFC/g, PSC 7,19 Log UFC/g em 9 dias de armazenamento, respectivamente. Para o grupo microbiano de PST as contagens finais atingiram 6,81 Log UFC/g em 10 dias de armazenamento. O aumento na temperatura de armazenamento favorece o crescimento microbiano, diminuindo a vida útil do produto, considerando que o processo térmico utilizado junto com a aplicação do O.E.O. foi um processo brando. Mol, Ozturan e Cosansu (2011) submeteram filés de pescados a duas combinações de tempo/temperatura, 4 minutos/70 °C para armazenamento a 4 °C e 3,5 minutos/70 °C para armazenamento a 12 °C e verificaram contagens finais de CT e PST em torno de 7,0 Log UFC/g, valores próximos encontrados no presente estudo. A vida útil

dos filés de pescado foi definida em 42 dias quando armazenados a 4 °C, sendo reduzida para 27 dias em armazenamento a 12 °C.

O abuso de temperatura durante o período de armazenamento, também foi verificado por Juneja (2006) em tratamentos térmicos para o controle de patógenos em carnes referentes a produtos pronto para consumo (*sous vide*). Esse autor também ressalta que ainda há necessidades de pesquisas empregando modelos preditivos para garantir a segurança microbiológica de alimentos processados termicamente.

Constantinedes et al. (1995) prolongaram a vida útil de frutos do mar embalados a vácuo utilizando combinação de calor, óleo de milho e ácido acético. Esses autores conseguiram prolongar a vida útil desses produtos por 30 dias, sendo que as contagens foram insignificantes durante os dias de armazenamento.

Kilinc, Cakli e Ufukturkkan (2007) avaliaram o efeito de diferentes métodos de cocção sobre a qualidade química, microbiológica e sensorial de anchovas do Mediterrâneo embaladas a vácuo, aumentando a vida útil do produto para 21 dias quando aplicado um tratamento térmico de 180 °C por 5 minutos.

Cosansu et al. (2011) estudaram o efeito do suco de limão e tratamento térmico (70 °C/10minutos) na vida útil de pescado. O efeito combinado definiu a vida útil em 35 dias para produto armazenado sob refrigeração, em relação a amostra controle esse tempo foi estendido em 7 dias.

Schellekens (1996) afirma que a natureza do alimento (teor de gordura, pH, atividade de água e aminoácido) é um fator importante na determinação da letalidade de um tratamento térmico e também da possibilidade de crescimento de micro-organismos patogênicos. Esse autor apontou saídas importantes que seria estudar a influência de que cada fato tem sobre o crescimento e a inativação dos micro-organismos com o objetivo de estabelecer barreiras adicionais.

Comparados ao controle (A1), os tratamentos realizados resultaram na extensão da vida útil de mexilhões nas amostras A3 (O.E.O. sem tratamento térmico) e A4 (O.E.O. com tratamento térmico) em mais 12 e mais 30 dias, respectivamente. Para a amostra A4, a combinação do tratamento térmico com O.E.O. pode levar à diminuição da carga microbiana quando exposta ao calor e aos componentes fenólicos como carvacrol e timol presentes no O.E.O. conhecidos por exercer atividade antimicrobiana. Na amostra A2, em que foi aplicado apenas o tratamento térmico, não foi observado um aumento da vida

útil, em relação ao controle, reforçando a importância do efeito antimicrobiano do O.E.O.

#### 4.3.4 pH

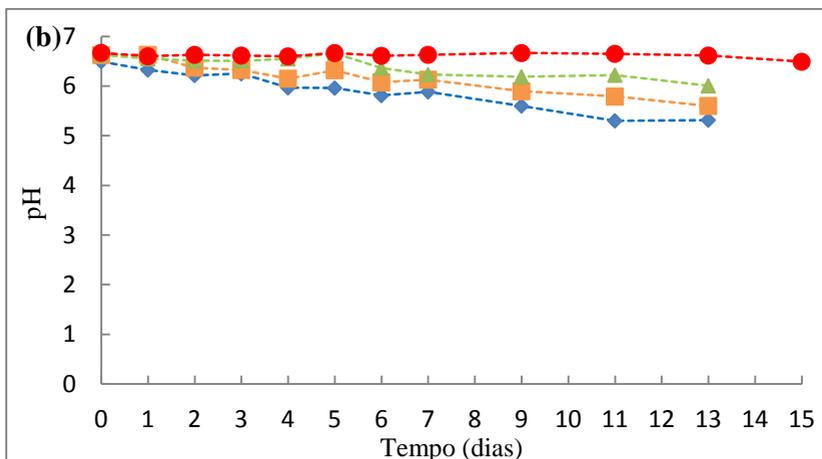
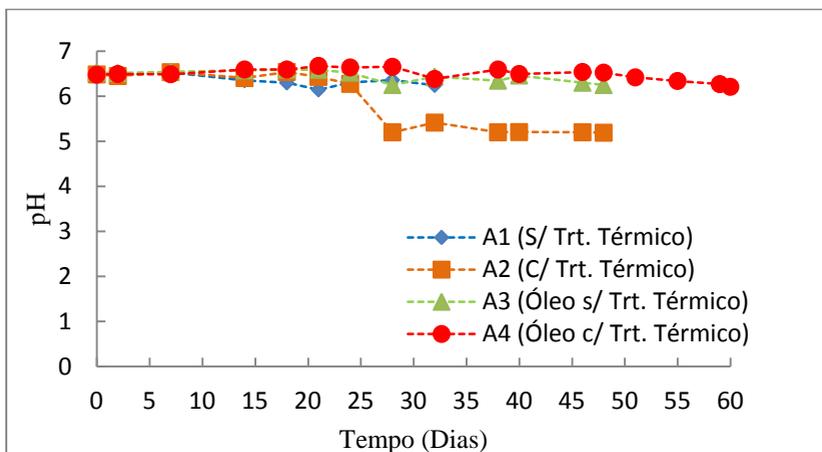
O processo de decomposição, quase sempre, altera a concentração de íons de hidrogênio de um alimento. Os valores de pH em mexilhões pré-cozidos armazenados a 4 °C (a), 10 °C (b) e 15 °C (c) são apresentados na Figura 14. Os valores de pH inicial encontrados para as três temperaturas foram de 6,53, 6,54, e 6,57, para as amostras A1 (controle), A2 (tratamento térmico, sem aplicação de O.E.O.), A3 (sem tratamento térmico com aplicação de O.E.O.) e A4 (tratamento termoquímico), respectivamente. O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) estabelece limites máximos para pH, de 6,5, na parte interna das espécies de pescado fresco, e 6,8 na parte externa da carne (BRASIL, 1980). Considerando que não há limites de pH estabelecido exclusivamente para mexilhão e que para quantificar esse parâmetro utiliza-se a parte interna e externa da carne simultaneamente. Assim, os valores de pH obtidos estão dentro da faixa estabelecida.

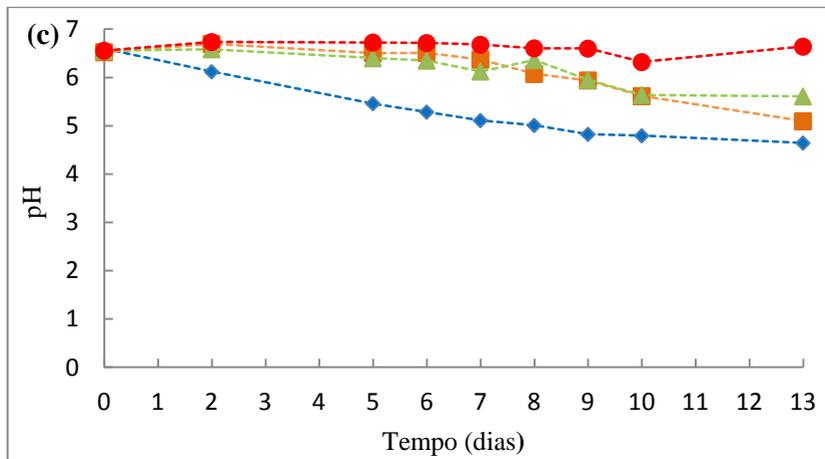
LIMA (2010) investigou a aplicação de atmosfera modificada em mexilhões, encontraram valores de pH próximos aos obtidos neste trabalho, 6,56 e 6,65 para mexilhões sem e com atmosfera modificada, respectivamente.

Pode-se observar que, para todas as temperaturas estudadas, para amostra que sofreu o tratamento termoquímico, os valores de pH se mantiveram relativamente constantes durante o período de armazenamento e as demais apresentaram um decréscimo nos valores de pH. O decréscimo nos valores de pH para as amostras não tratadas termoquimicamente, pode estar relacionado com o teor de glicogênio encontrado em moluscos, e o acúmulo de ácido lático produzidos por BAL a partir do glicogênio, ocorrendo uma diminuição concomitante do pH. Aaraas et al. (2004) acompanharam o decréscimo dos valores de pH em ostras em diferentes condições de armazenamento, em 16 dias de armazenamento, esses valores variaram de 6,3 a 5,2. Sanjuás-Rey et al. (2012) em estudo do efeito de óleo essencial de orégano e tomilho em anéis de lula, e Atrea et. al (2009) em estudo da extensão da vida útil de polvos tratados com óleo essencial de orégano, verificaram um aumento nos valores de pH desses alimentos. O aumento dos valores de pH encontrados por esses autores pode estar relacionado com o acúmulo de

metabólitos alcalinos produzidos por determinadas bactérias (MASNIYOM, BEJAMA e MANEESRI, 2011).

**Figura 14** – Valores de pH para mexilhões pré-cozidos tratados termicamente com O.E.O. ou não e armazenados a 4 °C (a), 10 °C (b) e 15 °C (c).





Galvão et al. (2006) salientam a necessidade de estudos específicos quanto aos limites de pH para moluscos bivalves, pois estes possuem composição centesimal diversificada quando comparada a de outras espécies de pescado e, provavelmente, a decomposição e alteração do pH ocorrem de forma diferente.

Considerando que o pH de um alimento é um dos fatores importantes para sua conservação e sendo que o pescado, frutos do mar e derivados apresentam valores de pH próximos a neutralidade, estes alimentos são propícios para o desenvolvimento tanto de micro-organismos patogênicos quanto deteriorantes, fazendo com que toda a cadeia de processo necessite de cuidados especiais para garantir a conservação e inocuidade desses alimentos.

#### 4.4 COMPARAÇÃO ENTRE A DETERIORAÇÃO SENSORIAL E O CRESCIMENTO MICROBIANO

Neste item são discutidas as alterações sensoriais de mexilhão para cada uma das três temperaturas de armazenamento estudadas (4, 10 e 15 °C).

A perda da qualidade de pescados e frutos do mar processados, geralmente é provocada pela ação de micro-organismos que resistem ao processamento realizado. O uso de diversas técnicas para evitar a perda da qualidade sensorial de pescados e frutos do mar, prolongando a vida útil desses produtos, está em amplo estudo como, por exemplo, o uso de

antimicrobianos naturais, embalagens com altas barreiras, combinações de processos, entre outros.

Antes da aplicação de O.E.O. e tratamento térmico, as amostras apresentavam odor característico de mexilhão, com textura consistente e cor viva, apesar das altas contagens microbianas iniciais para as três temperaturas estudadas. A Tabela 11 apresenta o tempo de vida útil de mexilhões resultante da contagem microbiológica e o tempo de detecção de alterações sensoriais nas três temperaturas estudadas.

**Tabela 11** – Tempo de vida útil de mexilhões pré-cozidos associados ao tratamento térmico e O.E.O. ou não resultante da contagem microbiológica e o tempo de detecção de alterações sensoriais.

Temperatura de armazenamento	Tratamento	Tempo de vida útil – microbiológico (dias)	Tempo para detecção de alterações sensoriais (dias)
<b>4 °C</b>	A1	21	24
	A2	22	24
	A3	31	48
	A4	51	55
<b>10 °C</b>	A1	4	10
	A2	4	10
	A3	6	10
	A4	9	10
<b>15 °C</b>	A1	3	4
	A2	3	4
	A3	5	4
	A4	9	9

Na temperatura de armazenamento a 4 °C, a amostra que sofreu apenas tratamento térmico (A2) continuou com as mesmas características sensoriais de cor e odor da amostra controle, que apresentava cor viva e odor característico de mexilhão antes do processamento. Tratamentos térmicos elevados diminuem a qualidade sensorial de pescados e frutos do mar. NACMF (1990) aconselha tratamentos térmicos da ordem de 60-80 °C são favoráveis para manter a qualidade desses tipos de produtos. As amostras que sofreram aplicação

de 0,4 % de O.E.O., perderam o odor característico de mexilhão imediatamente após a aplicação, sentindo apenas o odor de orégano. Burt (2004) destaca que, apesar da grande aplicação de O.Es como agentes antimicrobianos em alimentos, as características sensoriais são de grande importância para aceitabilidade do produto. Alimentos geralmente associados a ervas, especiarias ou temperos são menos afetados ao impacto do odor de orégano. Frangos et. al., (2010) aplicaram 0,4% de O.E.O. (p/v) em filés de truta e verificaram que nessa concentração o O.E.O. causou forte odor e sabor amargo nas amostras. Essas características se mantiveram constantes durante o período de 15 dias de armazenamento

No 18° dia, a amostra A1 (controle) apresentava sinais de deterioração, com odor desagradável. A cor não apresentavam alterações. No mesmo período a amostra A2, mesmo com carga microbiana próxima a 7 Log UFC/g, ainda não apresentava fortes sinais de deterioração. A amostra A3 (0,4 % O.E.O. sem tratamento térmico), após 18 dias, apresentava um leve sinal de deterioração, entretanto era possível perceber odor de O.E.O.. Na amostra A4 (0,4 % de O.E.O. com tratamento térmico) não se observou sinais de deterioração neste período, sendo que todas as amostras não apresentaram alterações de cor e odor.

No 24° dia de armazenamento, a amostra A1 e A2 apresentavam fortes odores de deterioração. Essa característica está bastante correlacionada com os dados microbiológicos obtidos, com base no limite permitido de 7 Log UFC/g (ICMSF 1986). Na amostra A3 em 24 dias de armazenamento, foi possível perceber que o O.E.O. conseguia mascarar o leve odor desagradável devido à ação bacteriana. Atrea et al., (2009), aplicando O.E.O. em polvos, percebeu leve odor desagradável no 17° dia armazenamento. As características da amostra A4 se mantiveram constante do 18° para o 24° dia de armazenamento.

No 36° dia de armazenamento, a amostra A3 manteve as mesmas características da análise anterior, entretanto contagem microbiana se aproximava do limite permitido. Não houve mudança nas alterações amostra A4.

No 48° dia de armazenamento, a amostra A3 apresentava odor desagradável e as contagens microbianas ultrapassavam 8 Log UFC/g. A amostra A4 não apresentava sinais de deterioração, nem odor nem visual, a cor permanecia viva.

No 55° dia, a amostra A4 apresentava sinais de deterioração, em relação a análise olfativa. A cor como citado anteriormente não apresentava sinais de mudança. Comparando a análise sensorial visual e

olfativa com a contagem microbiana, nesse período a contagem já tinha ultrapassado o limite  $10^7$  UFC/g definindo o final da vida útil.

Foi observado visualmente o aumento na formação de exsudado durante o armazenamento para todas as amostras. Nas amostras que foram tratadas com O.E.O., esse aumento foi superior ao apresentado na amostra controle e a amostra que sofreu somente tratamento térmico. O uso de O.Es pode induzir à desnaturação das proteínas, levando ao aumento de exsudado (FRANGOS et al., 2010).

As amostras armazenadas a 10 °C começaram a apresentar alterações visuais e olfativas no 6º dia de armazenamento, exceto a amostra A4 (0,4 % de O.E.O. com tratamento térmico). Nesse período, as ambas as amostras A1 e A2 apresentaram odor desagradável e pequena descoloração da carne, quando comparadas com amostras armazenadas a 4 °C. Na amostra A4, a concentração de 0,4 % de O.E.O. mascarou o odor característico de mexilhão. Não foi observado alterações na cor destas amostras.

No 10º dia de armazenamento a 10 °C, as amostras A1, A2 e A3, apresentaram odor desagradável e correlacionando com as contagens microbianas, os valores foram em torno de 8 Log UFC/g. A amostra A4 nesse período apresentava sinais de deterioração, embora menos intenso que nas outras amostras, e as contagens microbianas já tinham atingido o limite permitido. Mol, Ozturan e Cosansu (2011) avaliaram sensorialmente (aparência, odor, sabor e cor) amostras de pescado tratados termicamente e armazenados à temperatura de refrigeração (4 °C) e temperatura de abuso 12 (°C). As menores pontuações dadas pelos provadores foram no 35º e 21º dia de armazenamento, respectivamente.

Na temperatura de armazenamento a 15 °C, as amostras A1, A2 e A3 começaram a apresentar sinais de deterioração no 4º dia de armazenamento, em que a maioria das contagens microbianas estava acima de 8,0 Log UFC/g. As amostras de mexilhão não apresentavam cor viva e foi observado o estufamento das embalagens. Na amostra A4, nesse período ainda não era possível verificar odores desagradáveis.

No 9º dia de armazenamento, somente a amostra A4 foi avaliada. Odores desagradáveis foram verificados, não havendo estufamento das embalagens. O efeito combinado de O.E.O. e o tratamento térmico pode ter inibido o crescimento de micro-organismos produtores de gases.

Ercolini et al. (2006) relatam que as mudanças sensoriais podem variar de acordo com a população microbiana que está contaminando a carne com a temperatura de armazenamento deste alimento. Essas

alterações ocorrem pela utilização de nutrientes da carne como açúcares e aminoácidos livres resultando em compostos voláteis.

A temperatura de armazenamento mostrou ter grande influência nas características sensoriais de mexilhão desconchado, favorecendo o crescimento de micro-organismos, mesmo que as amostras tenham sofrido algum tipo de tratamento.

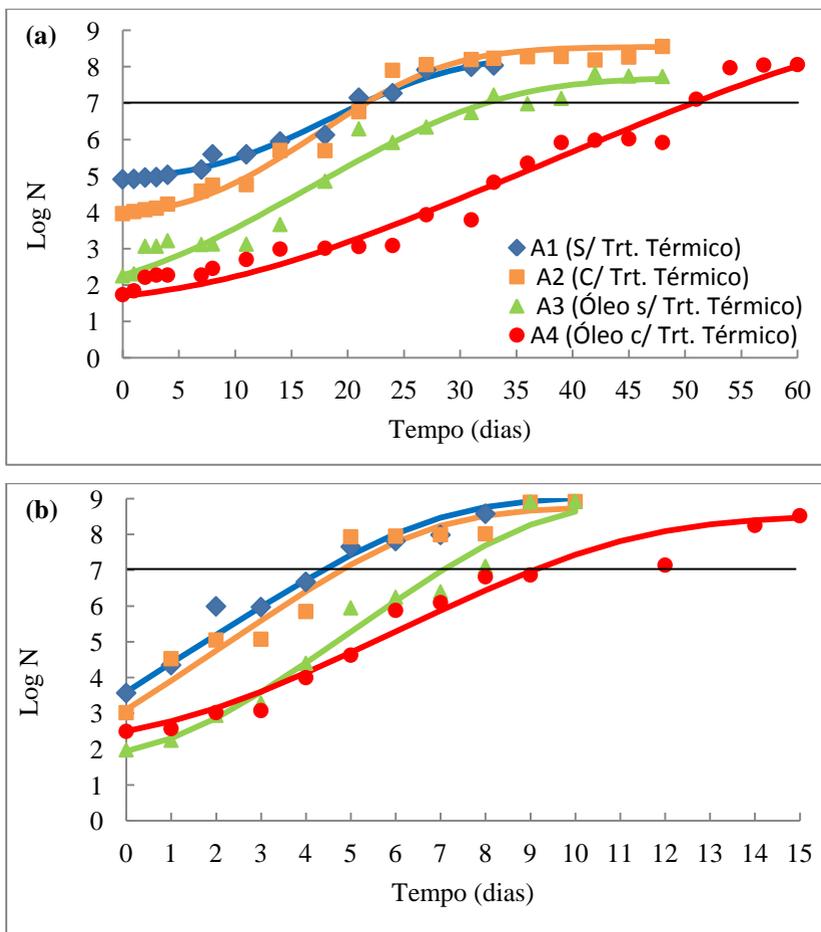
Comparando as alterações sensoriais e as contagens microbianas, o maior prazo de vida útil de 30 dias foi para amostra A4 (0,4 % de O.E.O. com tratamento térmico) armazenado a 4 °C. Em todos os casos, a deterioração microbiológica definiu o final da vida útil dos mexilhões.

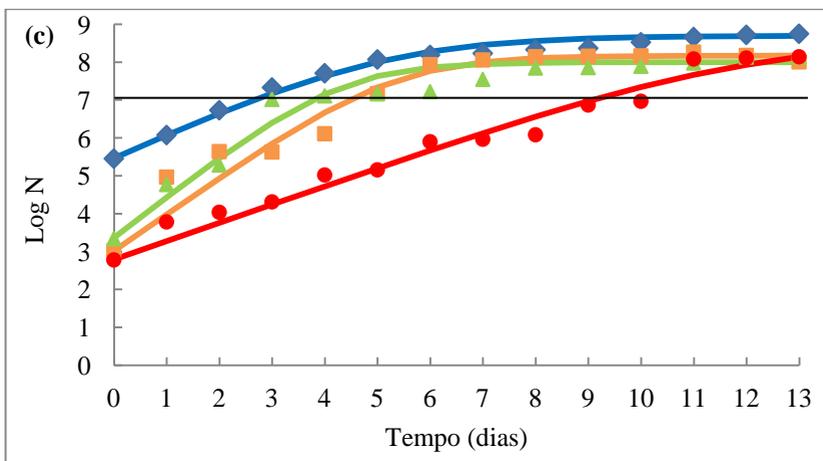
#### **4.5 EFEITO COMBINADO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO, VÁCUO E TRATAMENTO TÉRMICO SOBRE OS MICRO-ORGANISMOS DETERIORANTES DE MEXILHÃO DESCONCHADO ARMAZENADO A DIFERENTES TEMPERATURAS: MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO MICROBIANO**

As Figuras 19, 20, 21 e 22 apresentaram os resultados das contagens de BAL, CT, PSC e PST, respectivamente, ao longo do armazenamento de mexilhões a diferentes temperaturas (4, 10 e 15 °C), com o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (1994) para cada curva (Equação 13). A linha preta contínua indica a contagem final que define a vida útil de mexilhões pré-cozidos. Nota-se que o melhor tratamento para diminuir o crescimento dos grupos microbianos em estudo foi o tratamento termoquímico (O.E.O. e tratamento térmico), que levou ao aumento da vida útil de mexilhões pré-cozidos. Pode-se ainda observar que a contagem inicial para o tratamento termoquímico foi bastante inferior aos demais tratamentos, considerando todos os grupos de bactérias deteriorantes estudadas.

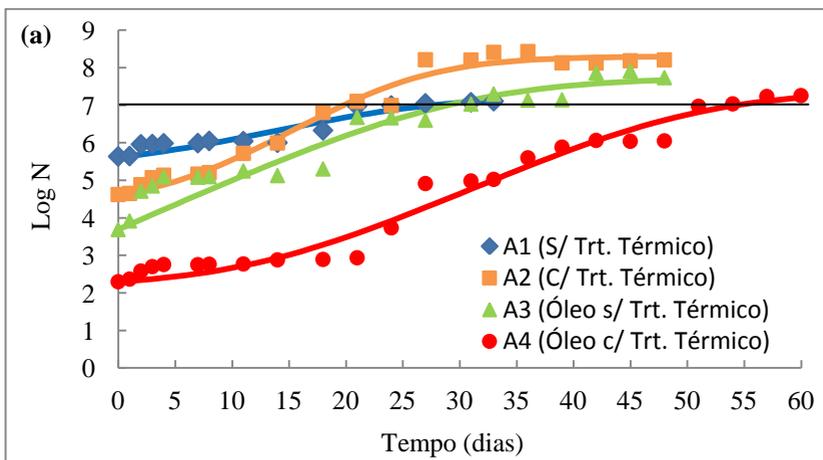
Os parâmetros de crescimento, duração da fase lag ( $\lambda$ ), velocidade máxima de crescimento ( $\mu$ ), aumento logarítmico da população ( $A$ ) e o tempo em dias para atingir o final da vida útil foram estimados pelo ajuste do modelo estudado aos dados experimentais, utilizando-se o *software* MATLAB R2011a (The MathWorks Inc®, Natick, USA).

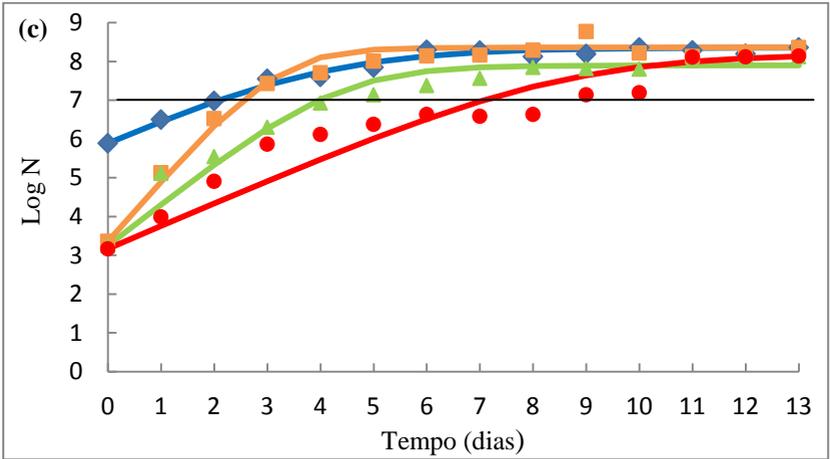
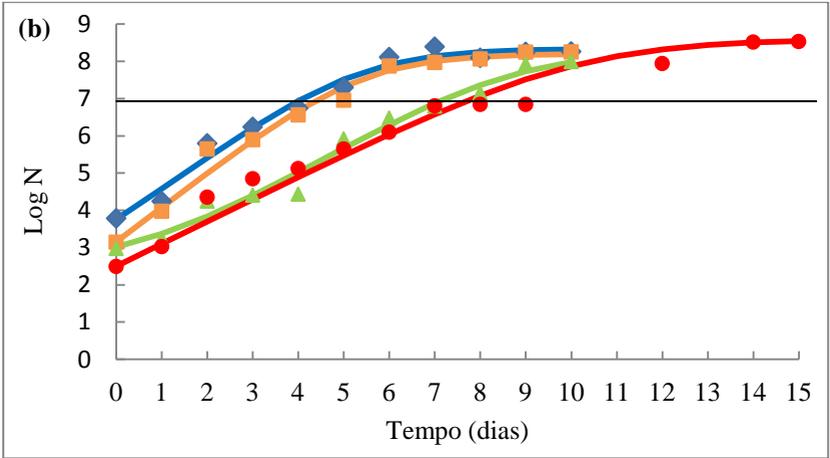
**Figura 15** – Efeito do tratamento térmico associado ou não ao O.E.O. sobre o crescimento de BAL em mexilhões pré-cozidos armazenados a 4 °C (a), 10 °C (b) e 15 °C (c). As linhas contínuas coloridas representam o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais. A linha preta indica a contagem final que define a vida útil de mexilhões pré-cozidos.



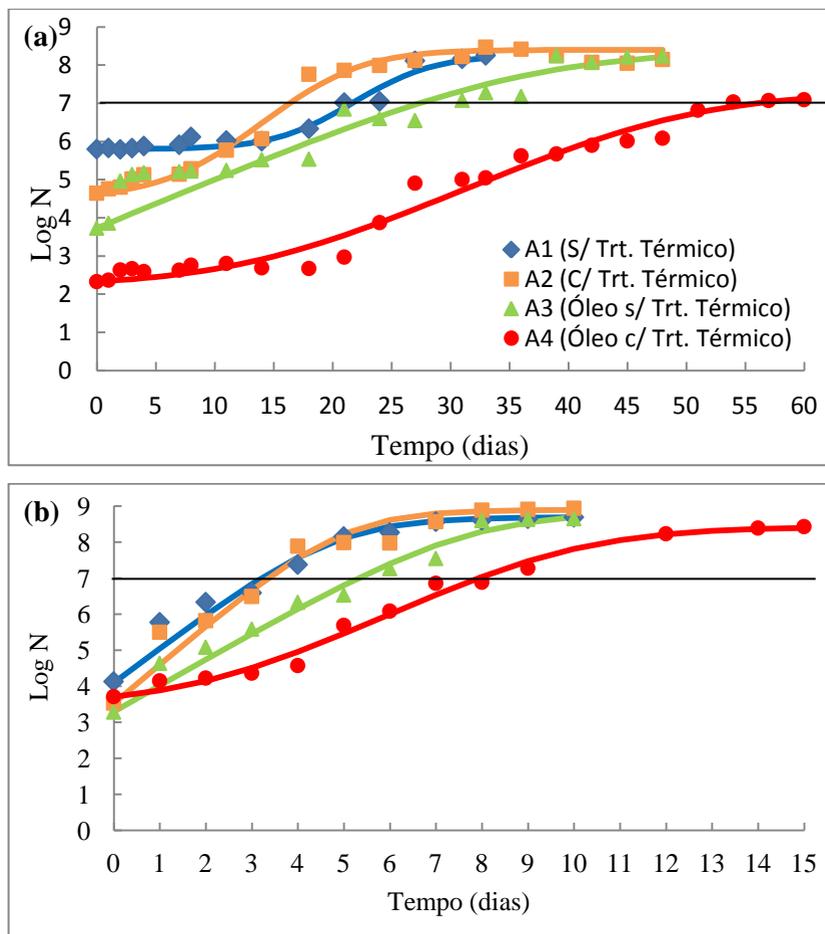


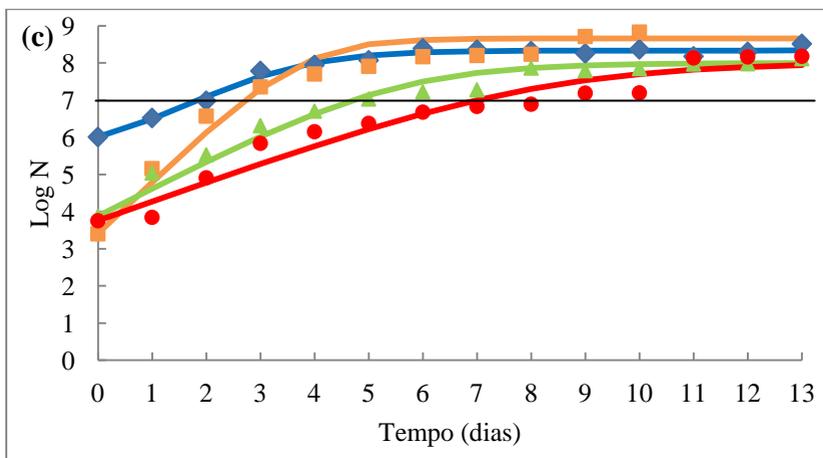
**Figura 16** – Efeito do tratamento térmico associado ou não ao O.E.O. sobre a curva de contagem total (CT) de mexilhões pré-cozidos armazenados a 4 °C (a), 10 °C (b) e 15 °C (c). As linhas contínuas coloridas representam o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais. A linha preta indica a contagem final que define a vida útil de mexilhões pré-cozidos.



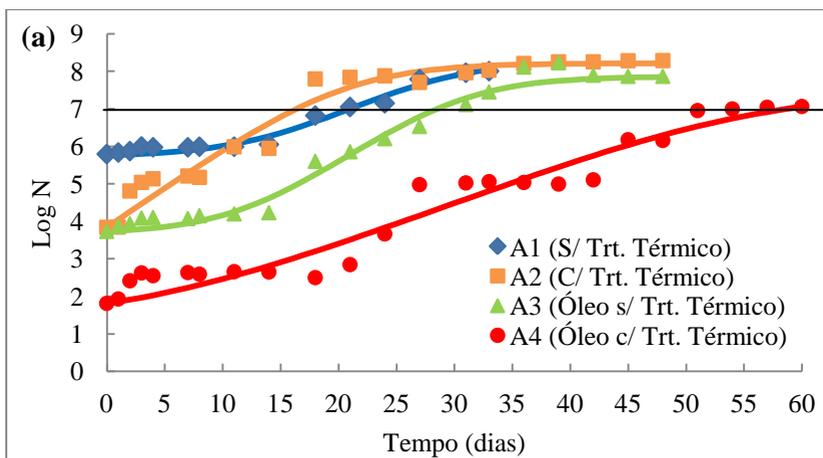


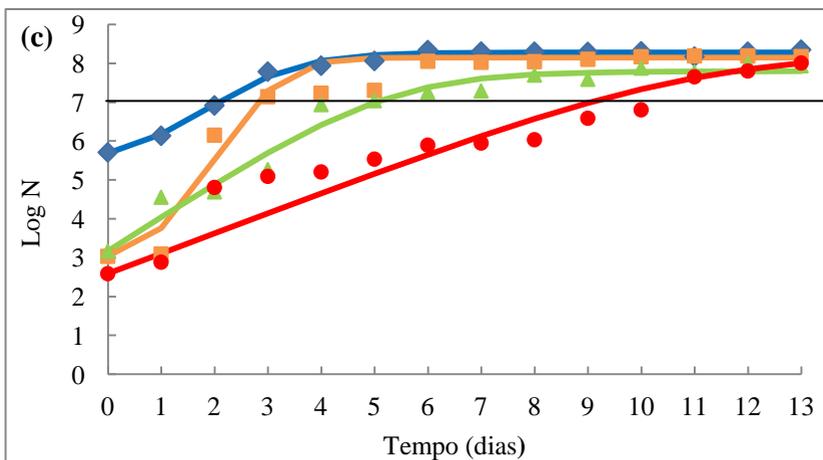
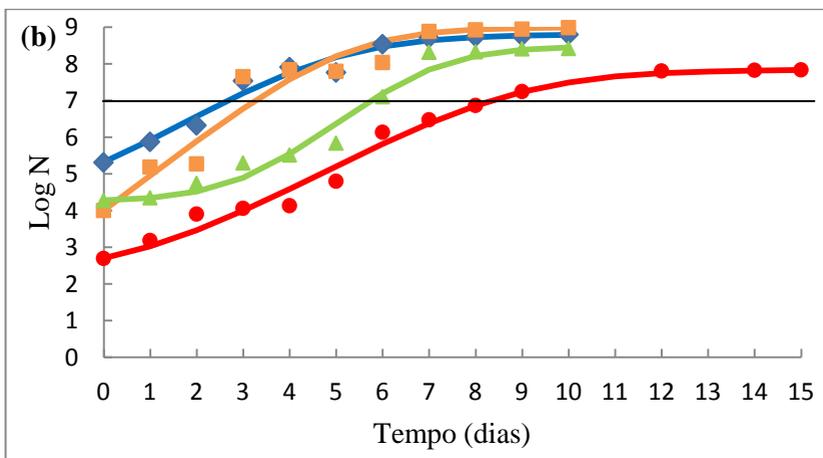
**Figura 17** – Efeito do tratamento térmico associado ou não ao O.E.O. sobre o crescimento de PSC em mexilhões pré-cozidos armazenados a 4 °C (a), 10 °C (b) e 15 °C (c). As linhas coloridas representam o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais. A linha preta indica a contagem final que define a vida útil de mexilhões pré-cozidos.





**Figura 18** – Efeito do tratamento térmico associado ou não ao O.E.O. sobre o crescimento de PST em mexilhões pré-cozidos armazenados a 4 °C (a), 10 °C (b) e 15 °C (c). As linhas coloridas representam o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais. A linha preta indica a contagem final que define a vida útil de mexilhões pré-cozidos.





Os índices estatísticos para o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais são apresentados nas Tabelas 12, 13, 14 e 15 para os quatro grupos microbianos, BAL, CT, PSC e PST, respectivamente, e para os quatro tratamentos aplicados em mexilhão.

**Tabela 12** – Valores dos índices estatísticos para o modelo de Baranyi e Roberts obtidos pelo ajuste das curvas de crescimento de BAL nas três temperaturas estudadas para os quatro tratamentos aplicados em mexilhão.

Temperatura de armazenamento	Tratamento	Modelo de Baranyi e Roberts/Índices Estatísticos			
		R <sup>2</sup>	MSE	Fator Bias	Fator Exatidão
<b>4 °C</b>	A1	0,9837	0,0313	1,0003	1,0162
	A2	0,9838	0,6115	0,9035	1,1230
	A3	0,9673	0,1662	1,0189	1,0853
	A4	0,9681	0,1654	1,0432	1,0959
<b>10 °C</b>	A1	0,9686	0,1590	1,3660	1,0332
	A2	0,9485	0,2994	1,0066	1,0644
	A3	0,9725	0,2471	1,0011	1,0535
	A4	0,9667	0,1678	0,9793	1,0544
<b>15 °C</b>	A1	0,9831	0,0235	1,0031	1,0127
	A2	0,9445	0,1925	1,0174	1,0418
	A3	0,9498	0,1385	0,9934	1,0358
	A4	0,971	0,1100	1,0174	1,0430

**Tabela 13** – Valores dos índices estatísticos para o modelo de Baranyi e Roberts obtidos pelo ajuste das curvas de CT nas três temperaturas estudadas, para os quatro tratamentos aplicados em mexilhão.

Temperatura de armazenamento	Tratamento	Modelo de Baranyi e Roberts/Índices Estatísticos			
		R <sup>2</sup>	MSE	Fator Bias	Fator Exatidão
<b>4 °C</b>	A1	0,8929	0,0412	0,9927	1,0225
	A2	0,9800	0,0535	1,0057	1,0235
	A3	0,8981	0,2154	1,0298	1,0636
	A4	0,9734	0,0993	1,0153	1,0608
<b>10 °C</b>	A1	0,9826	0,0687	1,0018	1,0277
	A2	0,9806	0,0875	1,0052	1,0243
	A3	0,9784	0,1025	0,9991	1,0388
	A4	0,9658	0,1391	1,0388	1,0569
<b>15 °C</b>	A1	0,9786	0,0166	1,0028	1,0113
	A2	0,9768	0,0680	0,9939	1,0243
	A3	0,9548	0,1199	1,0079	1,0339
	A4	0,8884	0,3219	1,0184	1,0653

**Tabela 14** – Valores dos índices estatísticos para o modelo Baranyi e Roberts obtidos pelo ajuste das curvas de crescimento de PSC nas três temperaturas estudadas para os quatro tratamentos aplicados em mexilhão.

Temperatura de armazenamento	Tratamento	Modelo de Baranyi e Roberts/Índices Estatísticos			
		R <sup>2</sup>	MSE	Fator Bias	Fator Exatidão
<b>4 °C</b>	A1	0,9700	0,0331	0,9919	1,0164
	A2	0,9804	0,0556	0,9987	1,0200
	A3	0,8786	0,2918	1,0387	1,0680
	A4	0,9742	0,0955	1,0072	1,0579
<b>10 °C</b>	A1	0,9653	0,1132	0,9903	1,0278
	A2	0,9519	0,2133	1,0087	1,0388
	A3	0,9727	0,0844	0,9982	1,0361
	A4	0,9870	0,0423	1,0027	1,0328
<b>15 °C</b>	A1	0,9831	0,0133	1,0000	1,0100
	A2	0,9325	0,2469	1,0065	1,0477
	A3	0,9699	0,0652	1,0035	1,0251
	A4	0,9449	0,1491	1,0023	1,0460

**Tabela 15** - Valores dos índices estatísticos para o modelo de Baranyi e Roberts obtidos pelo ajuste das curvas de crescimento de PST nas três temperaturas estudadas para os quatro tratamentos aplicados em mexilhão.

Temperatura de armazenamento	Tratamento	Modelo de Baranyi e Roberts/Índices Estatísticos			
		R <sup>2</sup>	MSE	Fator Bias	Fator Exatidão
<b>4 °C</b>	A1	0,9760	0,0213	0,9937	1,0166
	A2	0,9613	0,1230	1,0077	1,0409
	A3	0,9809	0,0689	1,0157	1,0350
	A4	0,9479	0,2024	1,0318	1,1043
<b>10 °C</b>	A1	0,9763	0,0550	1,0013	1,0170
	A2	0,9436	0,2529	0,9974	1,0410
	A3	0,9747	0,1072	1,0094	1,0291
	A4	0,9832	0,0653	1,0076	1,0364
<b>15 °C</b>	A1	0,9914	0,0083	1,0000	1,0080
	A2	0,9473	0,2212	0,9753	1,0435
	A3	0,9687	0,0982	1,0040	1,0340
	A4	0,8959	0,3614	1,0286	1,0775

Pode ser observado nas Tabelas 12, 13, 14 e 15 que os valores de R<sup>2</sup>, em torno de 0,96, são considerados satisfatórios, quando comparados com os valores encontrados por Slongo (2009) de 0,80, em estudo do crescimento de bactérias ácido lácticas em presuntos pressurizados. Gospavic et al. (2008) estudaram o crescimento de *Pseudomonas* spp. em carne de frango em diferentes temperaturas, encontrando valores de R<sup>2</sup> em torno de 0,98 para o modelo de Baranyi e Roberts. Kreyenschmidt et al. (2010) encontraram valores de R<sup>2</sup> em torno de 0,95 para determinação da vida útil de fatias de presuntos com base no crescimento de BAL. Esses valores de R<sup>2</sup> podem ser explicados pelo fato de se tratar de contagens microbianas (microbiota natural) de um alimento sólido, o que pode levar as variações nas contagens.

Os valores encontrados para MSE para a maioria das amostras foram baixos, variando de 0,0083 a 0,6115, mostrando que o modelo de Baranyi e Roberts se ajustou bem aos dados experimentais. Huang et al., (2012) avaliaram a eficiência de três modelos primários para descrever o crescimento de *Escherichia coli* O-157 produtora de toxina em carne

moída crua, para o modelo de Baranyi e Roberts o valor de MSE encontrado foi de 0,5027.

Gospavic (2008), avaliando o crescimento de *Pseudomonas* spp. em carne de frango, ajustou os modelos primários de crescimento Gompertz e Baranyi e Roberts aos dados experimentais. Para os dois modelos, os valores de MSE foram baixos, entretanto o modelo de Baranyi e Roberts foi o que se ajustou melhor aos dados experimentais.

O fator bias e exatidão fornecem uma indicação objetiva do ajuste do modelo e são considerados dentro da microbiologia preditiva ferramentas importantes na determinação da performance de modelos preditivos estudados. Fator bias e fator de exatidão iguais a 1 indicam um acordo perfeito entre os valores preditos e os valores observados (DALGAARD et al, 1998; LONGHI, 2012; ROSS, 1996; SLONGO, 2009).

Um fator bias inferior a 1 indica, que o modelo falha na zona segura, ou seja, o valor predito é menor que o valor observado. Os valores de bias apresentados nas Tabelas 12, 13, 14 e 15 indicam que os valores encontrados de um modo geral estão próximos de 1, mostrando que a resposta observada é igual a resposta predita. Ferreira (2004) avaliando o crescimento de BAL em presunto fatiado encontraram valores de bias maiores que 1.

Zhou et. al., (2012) estudaram a eficiência de três modelos para prever o efeito da atividade de água e pH no crescimento de *Streptococcus iniae* em Tilápia. Os valores do fator bias encontrados foram iguais a 1, indicando que a resposta observada foi igual à resposta predita.

Os valores do fator de exatidão para as três temperaturas variaram de 0,8 a 12,3% como pode ser observado nas Tabelas 12, 13, 14 e 15. Teoricamente, os valores do fator de exatidão dão uma estimativa da média dos valores da média e por se tratar de valores absolutos serão sempre maiores ou iguais a 1, sendo que quanto maior menos precisa é a média das estimativas.

A temperatura de armazenamento mostrou grande influência nos parâmetros de crescimento dos quatro grupos microbianos estudados. O aumento da temperatura levou a uma tendência de diminuição da fase lag ( $\lambda$ ) e uma tendência de aumento na velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) para todos os tratamentos estudados. O parâmetro menos afetado pela temperatura foi o aumento logarítmico da população (A). As Tabelas 16, 17, 18 e 19 apresentam os parâmetros de

crescimento para os quatro grupos microbianos com o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts.

O tratamento termoquímico levou a um aumento da vida útil dos mexilhões, considerando-se todos os grupos de bactérias deteriorantes estudadas. Pode-se também observar que o tempo de vida útil dos mexilhões é fortemente influenciado pela temperatura de armazenamento, como era de se esperar.

**Tabela 16** – Parâmetros de crescimento de BAL obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts.

Temperatura de armazenamento	Tratamento	Parâmetros de crescimento			
		$\lambda$ (dias)	$\mu$ (dias <sup>-1</sup> )	A	Vida útil (dias)
<b>4 °C</b>	A1	10,68	0,209	8,38	21
	A2	8,34	0,244	8,55	22
	A3	3,98	0,190	7,72	32
	A4	10,30	0,134	9,30	51
<b>10 °C</b>	A1	0,00	0,806	9,09	4
	A2	0,11	0,875	8,78	5
	A3	1,33	0,912	9,00	7
	A4	1,62	0,636	8,55	9
<b>15 °C</b>	A1	0,00	0,637	8,70	3
	A2	0,00	0,975	8,17	5
	A3	0,00	1,084	8,00	4
	A4	0,00	0,488	8,60	9

**Tabela 17** – Parâmetros de crescimento de CT obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts.

Temperatura de armazenamento	Tratamento	Parâmetros de crescimento			
		$\lambda$ (dias)	$\mu$ (dias <sup>-1</sup> )	A	Vida útil (dias)
<b>4 °C</b>	A1	8,58	0,130	7,30	28
	A2	6,94	0,204	8,30	20
	A3	0,00	0,130	7,75	29
	A4	13,73	0,143	7,40	54
<b>10 °C</b>	A1	0,10	0,883	8,34	4
	A2	0,00	0,942	8,20	5
	A3	1,29	0,720	8,30	7
	A4	0,00	0,603	8,60	8
<b>15 °C</b>	A1	0,00	0,630	8,36	2
	A2	0,00	1,556	8,36	3
	A3	0,00	1,076	7,90	4
	A4	0,00	0,591	8,20	7

**Tabela 18** – Parâmetros de crescimento de PSC obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts.

Temperatura de armazenamento	Tratamento	Parâmetros de crescimento			
		$\lambda$ (dias)	$\mu$ (dias <sup>-1</sup> )	A	Vida útil (Dias)
<b>4 °C</b>	A1	18,05	0,328	8,26	22
	A2	7,88	0,299	8,40	16
	A3	0,00	0,129	8,40	27
	A4	14,53	0,145	7,30	56
<b>10 °C</b>	A1	0,00	0,966	8,70	3
	A2	0,00	1,083	8,90	3
	A3	0,00	0,643	8,86	5
	A4	2,40	0,640	8,43	8
<b>15 °C</b>	A1	0,85	1,002	8,33	2
	A2	0,00	1,398	8,66	3
	A3	0,00	0,757	8,00	5
	A4	0,00	0,525	8,01	7

**Tabela 19** – Parâmetros de crescimento de PST obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts.

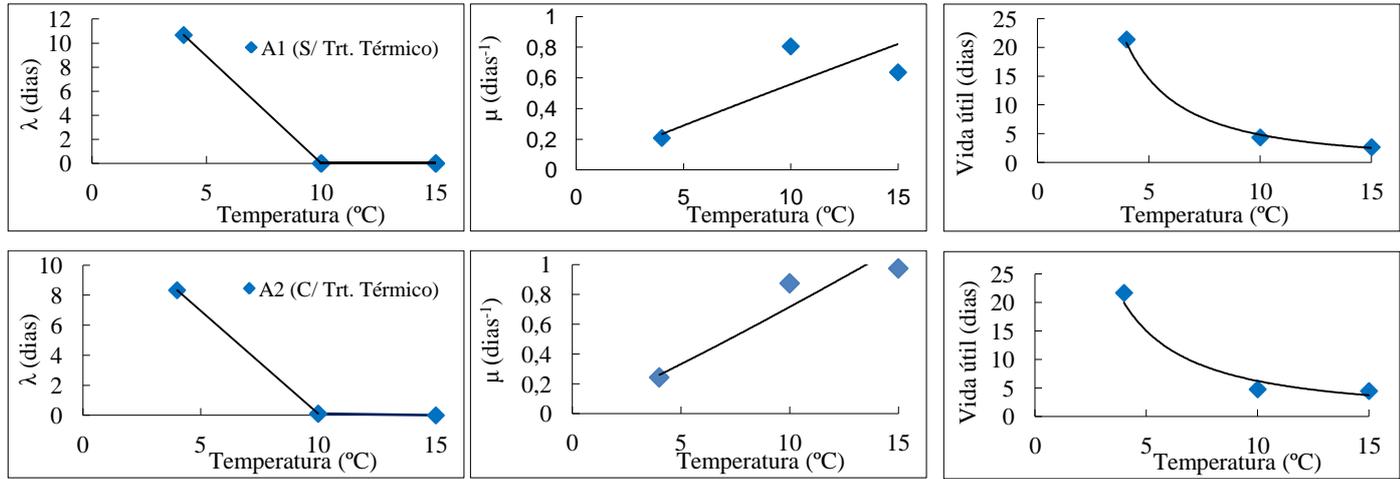
Temperatura de armazenamento	Tratamento	Parâmetros de crescimento			
		$\lambda$ (dias)	$\mu$ (dias <sup>-1</sup> )	A	Vida útil (dias)
<b>4 °C</b>	A1	15,03	0,217	8,20	21
	A2	0,00	0,214	8,22	16
	A3	12,09	0,230	7,86	29
	A4	0,380	0,778	8,81	3
<b>10 °C</b>	A1	0,00	0,960	9,00	3
	A2	3,09	1,094	8,48	6
	A3	1,38	0,698	7,84	8
	A4	0,380	0,778	8,81	3
<b>15 °C</b>	A1	1,01	1,310	8,28	2
	A2	0,930	2,315	8,15	3
	A3	0,00	0,883	8,38	5
	A4	0,00	0,522	8,30	9

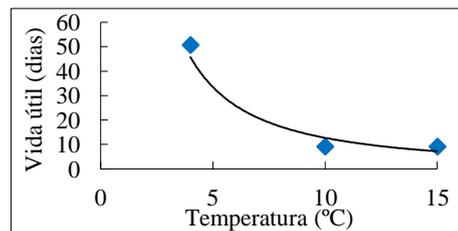
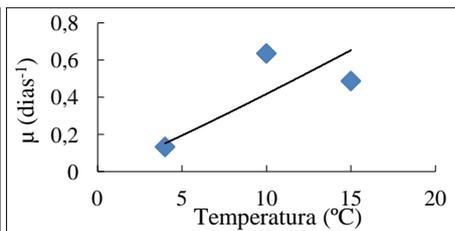
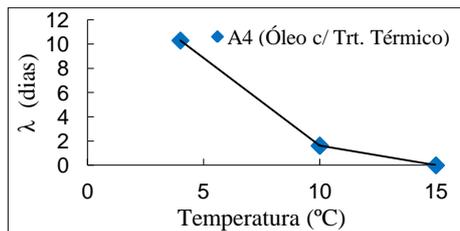
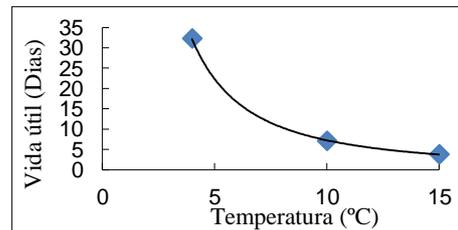
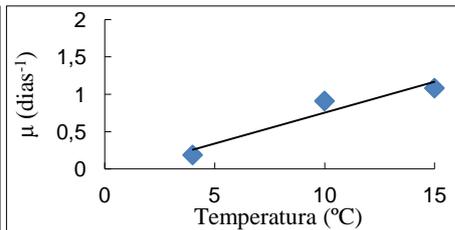
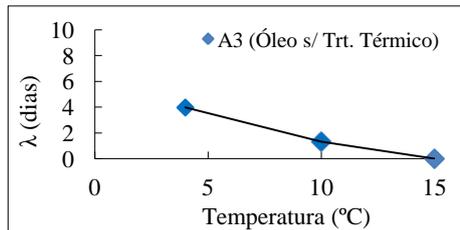
Neste estudo, cinco equações matemáticas foram utilizadas como modelos secundários: modelo linear, raiz quadrada, modelo de Arrhenius, potência e exponencial. A modelagem secundária, que representa como os parâmetros do modelo primário são influenciados pela temperatura, é útil para prever o crescimento de micro-organismos em mexilhão. Os modelos secundários foram comparados pelo índice estatístico  $R^2$ , para descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento ( $\lambda$  e  $\mu$ ) e a vida útil, na faixa de temperatura estudada (4 a 15 °). As Figuras 19, 20, 21 e 22 mostram o melhor ajuste entre os modelos secundários selecionados para BAL, CT, PSC e PST, para os quatro tratamentos, respectivamente. Não foi realizada a modelagem secundária para o parâmetro que representa o aumento logarítmico da população (A) porque este parâmetro não foi afetado pela variação da temperatura. Assim, o valor final de A para cada tratamento foi obtido pela média da contagem microbiana final de cada amostra (valores apresentados nas tabelas anteriores). Para os PST da amostra A2 (com tratamento térmico), CT e PSC para amostra A3 (0,4% de O.E.O. sem tratamento térmico) não foi possível obter modelos

secundários para esses grupos de bactérias, pois não apresentaram fase lag para as três temperaturas estudadas. Cao et al., (2009) não evidenciaram fase lag para contagem total de mesófilos em ostras cruas armazenadas a 5 e 10 °C, entretanto, quando armazenadas a 0 °C um atraso de 6 dias era observado

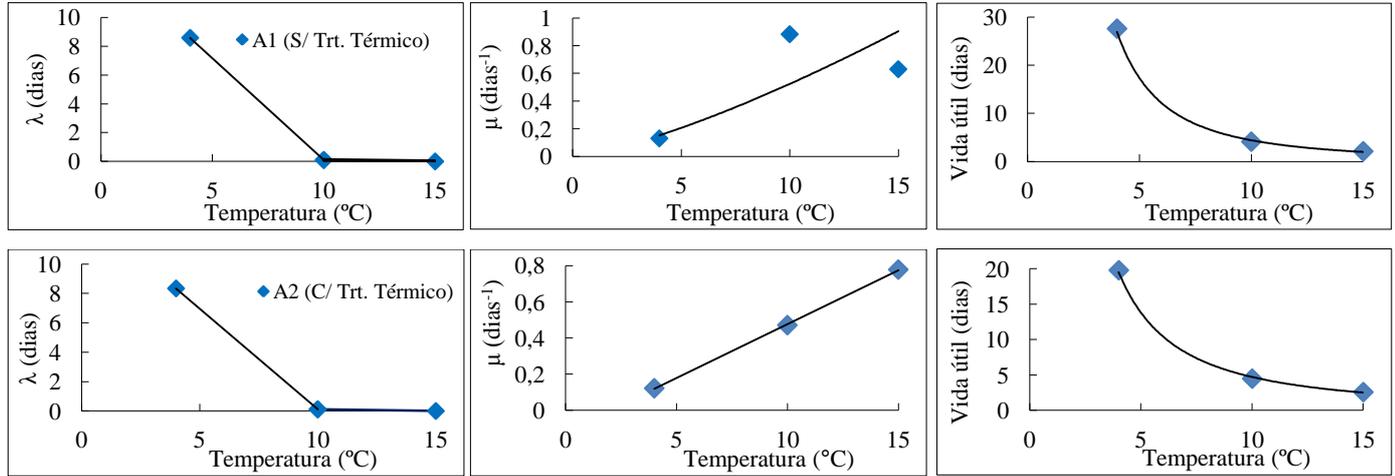
.

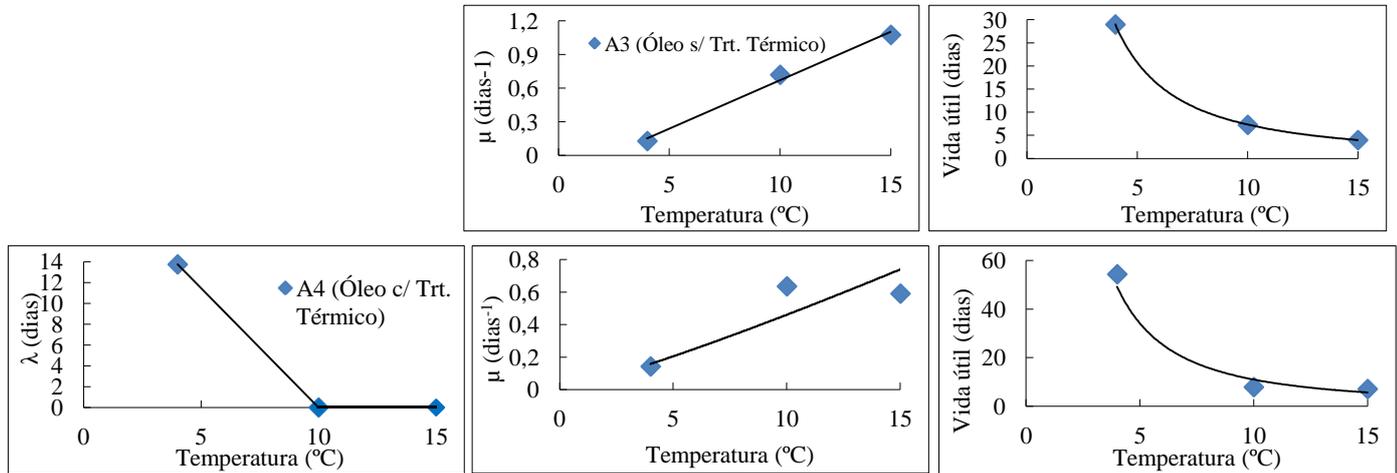
**Figura 19** – Influência da temperatura nos parâmetros de crescimento ( $\lambda$  e  $\mu$ ) de BAL e na vida útil de mexilhão.



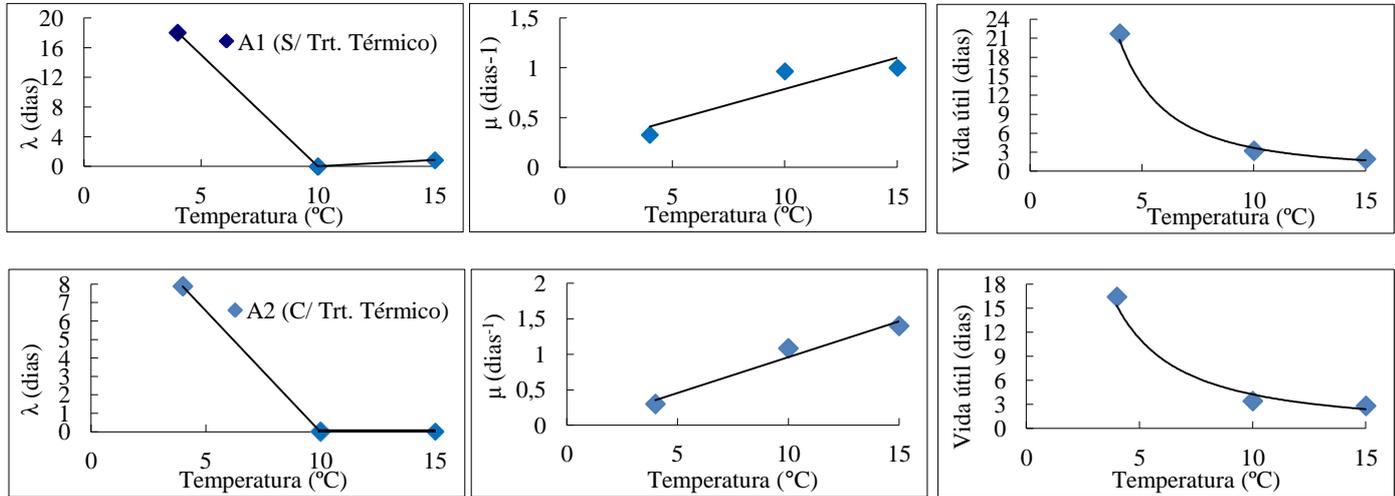


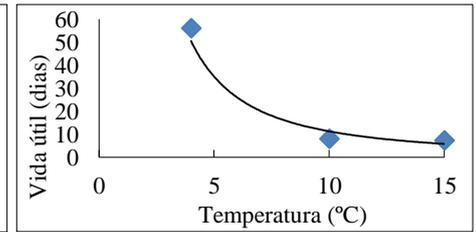
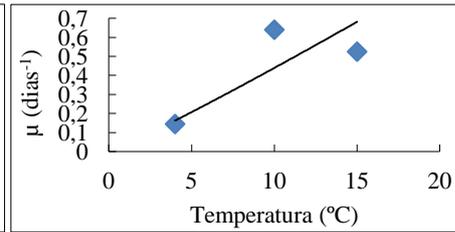
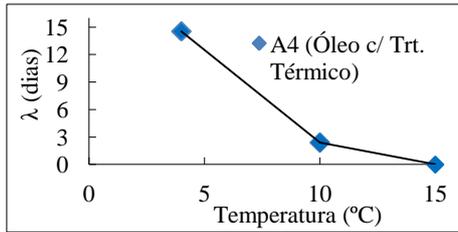
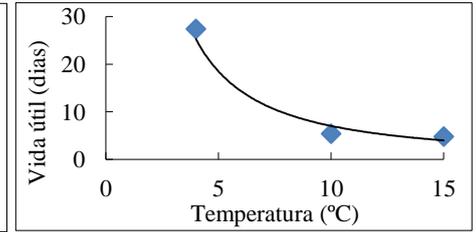
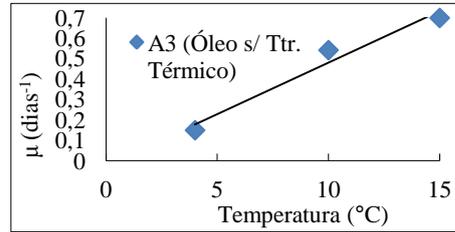
**Figura 20** – Influência da temperatura nos parâmetros de crescimento ( $\lambda$  e  $\mu$ ) de CT e na vida útil de mexilhão.



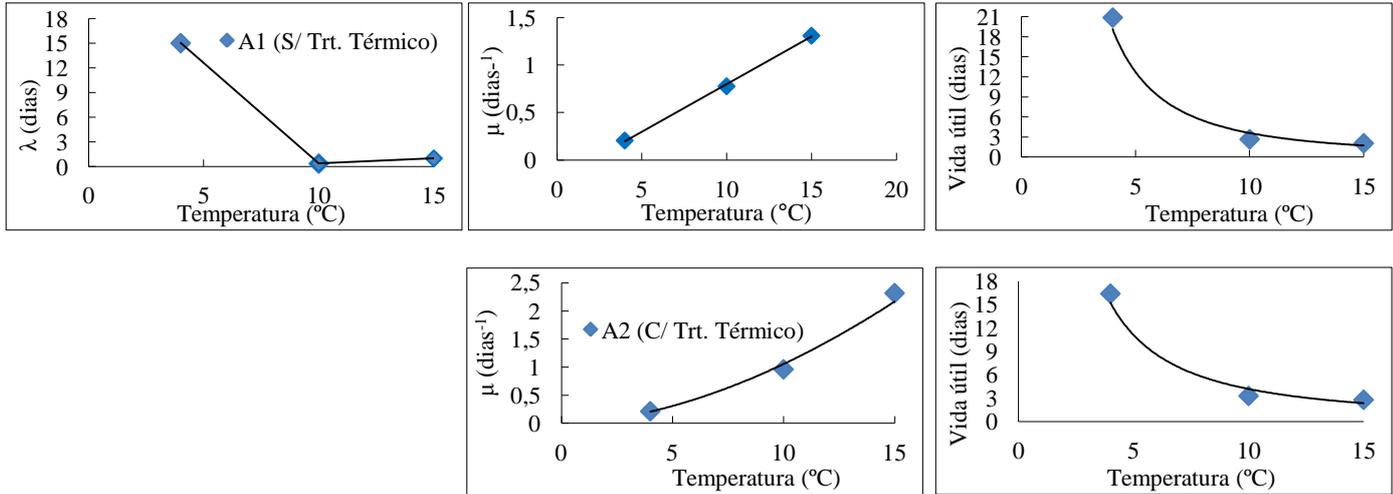


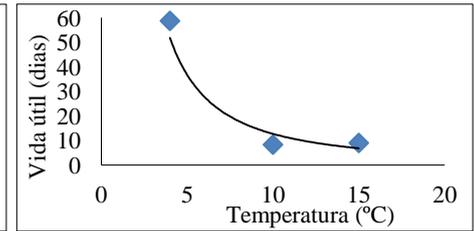
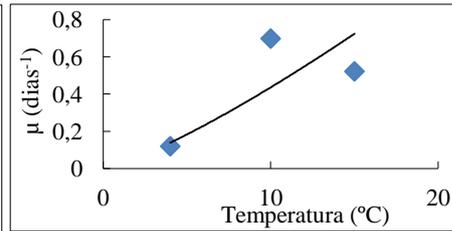
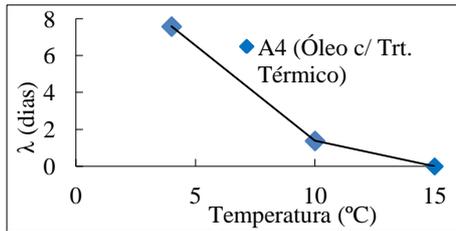
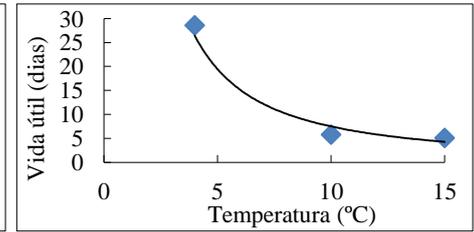
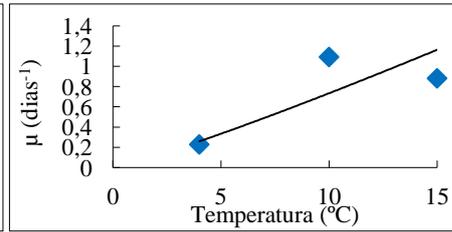
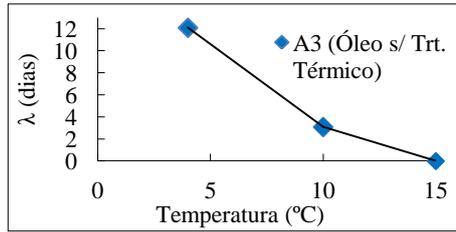
**Figura 21** – Influência da temperatura nos parâmetros de crescimento ( $\lambda$  e  $\mu$ ) de PSC e na vida útil de mexilhão.





**Figura 22** – Influência da temperatura nos parâmetros de crescimento ( $\lambda$  e  $\mu$ ) de PST e na vida útil de mexilhão.





As equações dos modelos secundários que apresentaram o melhor ajuste são apresentadas na Tabela 21, 21, 22 e 23.

**Tabela 20** – Equações dos modelos secundários utilizados para descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento de BAL em mexilhão pré-cozido. O  $R^2$  representa o valor do coeficiente de correlação para cada ajuste realizado.

Tratamentos	Parâmetros/Equação/Índice Estatístico		
	$\lambda$ (dias)	$\mu$ (dias <sup>-1</sup> )	Vida útil (vu)
A1	$\lambda = -1,78 * T + 17,8$	$\mu = 0,0626 * T^{0,9503}$ $R^2 = 0,7965$	$vu = 189,39 * T^{-1,593}$ $R^2 = 0,9942$
A2	$\lambda = -1,3717 * T + 13,827$ $\lambda = -0,022 * T + 0,33$	$\mu = 0,0677 * T + 0,043$ 3 $R^2 = 0,8858$	$vu = 115,99 * T^{-1,268}$ $R^2 = 0,9300$
A3	$\lambda = -0,4417 * T + 5,7467$ $\lambda = -0,266x + 3,99$	$\mu = 0,0826 * T - 0,0694$ $R^2 = 0,9189$	$vu = 305,39 * T^{-1,625}$ $R^2 = 0,9997$
A4	$\lambda = -1,4467 * T + 16,087$ $\lambda = -0,324 * T + 4,86$	$\mu = 0,0331 * T^{1,1007}$ $R^2 = 0,800$	$vu = 317,49 * T^{-1,397}$ $R^2 = 0,9104$

**Tabela 21** – Equações dos modelos secundários utilizados para descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento de CT em mexilhão pré-cozido. O  $R^2$  representa o valor do coeficiente de correlação para cada ajuste realizado.

Tratamentos	Parâmetros/Equação/Índice Estatístico		
	$\lambda$ (dias)	$\mu$ (dias <sup>-1</sup> )	Vida útil (vu)
A1	$\lambda = -1,4133 * T + 14,233$	$\mu = 0,0236 * T^{-1,3466}$ $R^2 = 0,795$	$vu = 414,49 * T^{-1,971}$ $R^2 = 0,9974$
A2	$\lambda = -1,1567 * T + 11,567$	$\mu = 0,0596 * T - 0,119$ $R^2 = 0,9998$	$vu = 167,27 * T^{-1,55}$ $R^2 = 0,9984$
A3	-	$\mu = 0,0432 * T - 0,0966$ $R^2 = 0,992$	$vu = 231,69 * T^{-1,5}$
A4	$\lambda = -2,2883 * T + 22,883$	$\mu = 0,0313x^{1,168}$ $R^2 = 0,8839$	$vu = 475,55 * T^{-1,637}$ $R^2 = 0,9352$

**Tabela 22** – Equações dos modelos secundários utilizados para descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento de PSC em mexilhão pré-cozido. O  $R^2$  representa o valor do coeficiente de correlação para cada ajuste realizado.

Tratamentos	Parâmetros/Equação/Índice Estatístico		
	$\lambda$ (dias)	$\mu$ (dias <sup>-1</sup> )	Vida útil (vu)
A1	$\lambda = -3,0083 * T + 30,083$ $\lambda = 0,17 * T - 1,7$	$\mu = 0,0628 * T + 0,1587$ $R^2 = 0,8310$	$vu = 283,11 * T^{-1,885}$ $R^2 = 0,9902$
A2	$\lambda = -1,3133 * T + 13,133$	$\mu = 0,0585 * T^{1,2073}$ $R^2 = 0,978$	$vu = 107,02x^{-1,402}$ $R^2 = 0,9591$
A3	-	$\mu = 0,0197 * T^{1,4093}$ $R^2 = 0,9522$	$vu = 174,79 * T^{-1,395}$ $R^2 = 0,9419$
A4	$\lambda = -2,0217 * T + 22,617$ $\lambda = -0,48 * T + 7,2$	$\mu = 0,0362x^{1,0835}$ $R^2 = 0,8283$	$vu = 492,45 * T^{-1,642}$ $R^2 = 0,9318$

**Tabela 23** – Equações dos modelos secundários utilizados para descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento de PST em mexilhão pré-cozido. O  $R^2$  representa o valor do coeficiente de correlação para cada ajuste realizado.

Tratamentos	Parâmetros/Equação/Índice Estatístico		
	$\lambda$ (dias)	$\mu$ (dias <sup>-1</sup> )	Vida útil (vu)
A1	$\lambda = -2,4417 * T + 24,797$	$\mu = 0,1001 * T - ,2027$ $R^2 = 0,999$	$vu = 239,4 * T^{-1,823}$ $R^2 = 0,9589$
A2	-	$\mu = 0,0178 * T^{1,7737}$ $R^2 = 0,9951$	$vu = 107,22 * T^{-1,408}$ $R^2 = 0,9524$
A3	$\lambda = -1,5 * T + 18,09$ $\lambda = -0,618 * T + 9,27$	$\mu = 0,0539 * T^{1,1342}$ $R^2 = 0,8254$	$vu = 178,9 * T^{-1,379}$ $R^2 = 0,9448$
A4	$\lambda = -1,0333 * T + 11,713$ $\lambda = -0,276 * T + 4,14$	$\mu = 0,0245 * T^{1,25}$ $R^2 = 0,804$	$vu = 433,53 * T^{-1,533}$ $R^2 = 0,8885$

A temperatura teve grande influência sobre os parâmetros de crescimento ( $\lambda$  e  $\mu$ ) e na vida útil. Para todas as amostras, a influência da temperatura sobre a fase lag foi melhor representada pelo Modelo Linear. As equações obtidas para esse parâmetro encontram-se na faixa de temperatura entre 4 e 10 °C, em que foi possível verificar a presença de fase lag. Acima dessa faixa de temperatura (>10 °C) não é possível observar a presença de fase lag, mostrando que os micro-organismos presentes nas amostras de mexilhão não necessitaram de uma fase de adaptação para iniciarem o crescimento.

Para a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), a influência da temperatura foi descrita na maioria das amostras pela equação da potência, o que também pode ser observado para a vida útil.

Os parâmetros de crescimento no presente trabalho foram obtidos apenas para três temperaturas, o que dificulta verificar de forma mais detalhada a tendência dos parâmetros microbiológicos de crescimento no intervalo de 4 a 15 °C. Para melhor descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento na faixa de 4 a 15 °C, poderia se avaliar o comportamento das diferentes bactérias deteriorantes a 7 °C. Não foi possível realizar este estudo no presente trabalho devido ao período de sazonalidade de mexilhões, ocasionando

na falta de distribuição desses animais às cooperativas de beneficiamento.

Vale ressaltar que na literatura os trabalhos encontrados reportam apenas as cinéticas de crescimento microbiano em temperatura de refrigeração. Os dados obtidos nesse trabalho são úteis para descrever a variação dos parâmetros microbiológicos com a temperatura de armazenamento de produtos tratados termoquimicamente e torna-se uma ferramenta útil para as indústrias processadoras de mariscos.

## 5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, conclui-se:

- A composição dos óleos essenciais estudados está de acordo com a literatura, mostrando a predominância do composto carvacrol para O.E.O. e do composto estragole para O.E.M.. O tratamento térmico influenciou a composição do O.E.O., levando a alteração de alguns componentes;

- Os óleos essenciais utilizados tiveram potencial antimicrobiano sobre os microrganismos patogênicos e o O.E.O. foi mais efetivo sobre as bactérias deteriorantes na concentração de 0,4 % (v/m);

- O tratamento termoquímico prolonga a vida útil (tempo para que as bactérias deteriorantes apresentem contagem acima de  $10^7$  UFC/g) de mexilhões de 21 dias para o controle que não foi adicionado de O.E. nem sofreu tratamento térmico, para mais 30 dias a 4 °C. A 15 °C, o tempo de vida útil passou de 2 dias (controle) para 8 dias, nas amostras que sofreram tratamento termoquímico;

- Na maioria dos tratamentos analisados, o final da vida útil determinado pela contagem microbiana foi acompanhado de alterações visuais e olfativas;

- O modelo de Baranyi e Roberts pode ser utilizado na predição dos parâmetros primários de crescimento dos microrganismos deteriorantes e, segundo a análise dos dados estatísticos, descreve bem os diferentes crescimentos;

- A temperatura tem uma forte influência sobre os parâmetros de crescimento microbiano e esta influência pode ser adequadamente descrita pelos modelos secundários;

- Com base nos resultados obtidos, esse trabalho torna-se uma ferramenta útil para as indústrias processadoras mexilhões predizendo o comportamento de micro-organismos deteriorantes em frutos do mar.

- O Estado de Santa Catarina por ser o maior produtor de moluscos do país apresenta grande potencial tecnológico nessa área, sendo necessário o desenvolvimento de novos processos. Este trabalho traz grandes contribuições para a indústria

processadora, visto que há poucos estudos tecnológicos e de processamento de mexilhões.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A industrialização de mexilhões, assim como as pesquisa na área, ainda é uma atividade incipiente no Brasil. Desta forma, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem propostas futuras a serem desenvolvidas para melhores condições de processamento e conservação como:

- Estudar a aplicação de diferentes óleos essenciais a fim de avaliar o aumento na vida útil desse molusco, sabendo do forte potencial antimicrobiano desses óleos;
- Modelar o efeito de diferentes concentrações de óleo essencial na microbiota de mexilhões;
- Verificar o efeito da combinação de ácidos orgânicos e óleos essenciais na microbiota de mexilhão;
- Avaliar outra temperatura para melhorar o modelo secundário;
- Avaliar sensorialmente (sabor) as amostras tratadas com diferentes concentrações de óleos essenciais;
- Acompanhar junto ao crescimento microbiano possíveis alterações físico-químicas quem venha acontecer durante o período de armazenamento;
- Avaliar outra temperatura de processamento;
- Estudar o efeito da flutuação de temperatura na vida útil de mexilhões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARAAS, R.; HERNAR, I. J.; VORRE, A.; BERGSLIEN, H.; LUNESTAD, B. T.; SKEIE, S.; SLINDE, S.; MORTENSEN, S. Sensory, histological, and bacteriological changes in flat oysters (*Ostrea edulis*, L.) during different storage conditions. **Sensory and Nutritive Qualities of Food**, v. 69, n. 6, p. 205-210, 2005.

ABEE, T.; PECK, M. Food Components that Influence Growth and Survival of Pathogens in Ready-to-eat Foods. **Highlight A/95. ATO-DLO**, Wageningen, The Netherlands, 1995.

ABO-EL SEOUD, M. A.; SARHAN, M. M.; OMAR, A. E.; HELAL, M. M. Biocides formulation of essential oils having antimicrobial activity. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 38, n. 3, p. 175-184, 2005.

ALVARENGA, V. O. **Modelagem preditiva do crescimento/morte de *Saccharomyces cerevisiae* em co-cultura com *Lactobacillus fermentum* em mosto de caldo de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008.

AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. Screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control**, v. 17, p. 454-461, 2006.

ANSORENA, M. R.; SALVADORI, V. O. Optimization of thermal processing of canned mussels. **Food Science and Technology International**, v. 17, n. 5, p. 449-458, 2011.

ANTONIOLLI, M. A. **Vida útil do mexilhão *Perna perna* (L.) processado e mantido sob refrigeração**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of Methods of the Microbiological Examination of Foods**. 4<sup>o</sup> ed. Washington, DC, 2001.

ARASAKI, K. M. **Efeito da atividade antimicrobiana de substância produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* no controle da microbiota do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758)**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

ATREA, I.; PAPAVERGOU, A.; AMVROSIADIS, I.; SAVVAIDIS, I. N. Combined effect of vacuum-packaging and oregano essential oil on the shelf-life of Mediterranean octopus (*Octopus vulgaris*) from the Aegean Sea stored at 4 °C. **Food Microbiology**, v. 26, p. 166-172, 2009.

AWUAH, G. B.; RAMASWAMY, H. S.; ECOMIDES, A. Thermal processing and quality: Principles and overview. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 584-602, 2007.

AXELSSON, L. T. L. **Lactic acid bacteria: classification and physiology**. In: SALMINEN, S. VON, WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (editors). Lactic acid bacteria. New York: Macel Dekker, 2004.

AYMERICH, T.; PICOUET, P. A.; MONFORT, J. M. Decontamination technologies for meat products. **Meat Science**, v. 78, p. 114-129, 2008.

BAGAMNOULA, C. F.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiology**, v. 21, p. 33-42, 2004.

BAHADORI, A.; VUTHALURU, H. B. Simple Arrhenius-type function accurately predicts dissolved oxygen saturation concentrations in aquatic systems. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 88, p. 335-340, 2010.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M.; Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446 -475, 2008.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 277-294, 1994.

BARBOSA, L. N. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação.** Dissertação (Mestrado em Biologia Geral) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.

BARNI, E. J.; SILVA, M. C.; ROSA, R. C.; OGLIARI, R. A. Perfil, hábitos de consumo e preferências dos consumidores finais de mexilhão. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 16, n. 3, p. 39-43, 2003.

BENITEZ, N. P.; LEÓN, E. M. M.; STASHENKO, E. E. Eugenol and methyl eugenol chemotypes of essential oil of species *Ocimum gratissimum* L. and *Ocimum campechianum* Mill. from Colombia. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, p. 800-803, 2009.

BETTS, T. J. Chemical characterization of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. **Journal of Chromatography**, v.936, p.33-46, 2001.

BIEDRZYCKI, A. **Aplicação da avaliação sensorial no controle de qualidade de uma indústria de produtos cárneos.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BINDU, J.; RAVISHANKAR, C. N.; SRINIVASA GOPAL, T. K.; MALLICK, A. K. Investigation of shelf life and heat penetration attributes of ready-to-eat “fish peera” from anchovy (*Stolephorous commersoni*) in retort pouches. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 34, p. 207–222, 2010.

BISCOLA, V. **Influência da matriz alimentar no efeito antimicrobino de óleo essencial de orégano e nisina contra *Listeria monocytogenes*: avaliação em modelos cárneos.** Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BLANK, A. F.; ROSA, Y. R. S.; FILHO, J. L. S. C.; SANTOS, C. A.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; NICULAU, E. S.; ALVES, P. B. A diallel study of yield components and essential oil constituents in basil (*Ocimum basilicum* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 93-98, 2012.

BOROSKI, M.; MONTEIRO, J.; SOUZA, N. MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. Quantification of EPA and DHA in seafood of the south coast of Brazil. **Nutrition e Food Science**, v. 41, n. 6, p. 401-411, 2011.

BRASIL (Ministério da Marinha, Instituto Nacional de Estudos do Mar), 1985. **Manual de Maricultura**. Rio de Janeiro: IpqM.

BRASIL. **Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007**. Regulamento técnico sobre aditivos e aromatizantes. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02\\_170107rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02_170107rdc.htm)>. Acesso em 07/11/2012.

BRASIL. **Resolução RDC, nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 27/10/2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIIPOA (1980)**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/servlet/VisualizarAnexo?id=14013>>. Acesso em: 03/04/2013.

BRODY, A.L. Packaging to limit microbiological concerns, **Food Technology**, v. 55, n. 12, p. 74-79, 2001.

BRODY, A.L. The return of the retort pouch. **Food Technology**, v. 57, n. 2, p. 76-79, 2003.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 1999.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. **International Journal Food Microbiology**, v. 94, n. 3 p. 223-252, 2004.

BUSATTA, C.; VIDAL, R. S.; POPIOLSKI, A. S.; MOSSI, A. J.; DARIVA, C.; RODRIGUES, M. R. A. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v. 25, p. 207-211, 2008.

BUSSANI, M. **Guia pratica de cultivo del mejillon**. Zaragoza: Acribia, 1990. **Microbiology**, v. 25, p. 207-211, 2008.

BYUN, Y.; BAE, HO J.; COOKSEY, K.; WHITESIDE, S. Comparison of the quality and storage stability of salmon packaged in various retort pouches. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 551–555, 2010.

CAGLAK E., CAKLI, S., KILINC, B. Microbiological, chemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. **Food Research e Technology**, European, v. 226, p. 1293 – 1299, 2008.

CALIXTO, F. A. A. **Avaliação dos parâmetros bacteriológicos em mexilhão, *Perna perna*, de mitilicultura da Baía de Ilha Grande, RJ, submetidos a irradiação gama**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

CAO, R.; CHANG-GU, X.; QI, L.; XUE, Y. Microbiological, chemical and sensory assessment of Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*) stored at different temperatures. **Czech Journal Food Science**, v. 27, p. 102-108, 2009.

CARLIN, F.; GUINEBRETIERE, M. H.; CHOMA, C. PASQUALINI, R.; BRACONNIER, A.; NGUYEN, C. Spore-forming bacteria in commercial cooked, pasteurized and chilled vegetable purees. **Food Microbiology**, v. 17, p. 153-165, 2000.

CARVALHO FILHO, C. D. **Utilização do bioteste com esporos de *Bacillus subtilis* na avaliação da integridade asséptica de embalagens flexíveis esterilizáveis**. Dissertação (Mestrado em Ciência

de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CARRASCO, E. ; GARCÍA-GIMENO, R.; SESELOVSKY, R.; VALERO, A.; PÉREZ, F. ZURERA-COSANO, G.; TODD, E. Predictive mode of *Listeria monocytogenes* growth rate under different temperatures and acids. **Food Science and Technology International**, v. 12, p. 47-56, 2006.

CASTRO, N. E. A.; SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; SOARES, M. J. CARVALHO, G. J. Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis* sobre o crescimento do tripanosomatídeo *Herpetomonas samuelpegoi*. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, Campinas, 2005. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), v. 77 2005.

CAVALHEIRO, D. **Estudo de alternativa para o processamento de mexilhões (*Perna perna*)**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

CHAVES, J. B. **Controle de qualidade na indústria de alimentos (princípios gerais)**. Viçosa: UFV, 1998. 94p.

CHOWDHURY, B.R.; CHAKRABORTY, R.; CHAUDHURI, U. R.; Validity of modified Gompertz and Logistic models in predicting cell growth of *Pediococcus acidilactici* H during the production of bacteriocin pediocin AcH. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 4, p. 1171-1175, 2007.

COLTRO, L.; DANTAS, S. T.; JAIME, M. A.; VENÂNCIO, D. S. Avaliação do efeito do transporte no desempenho de embalagem tipo *stand up pouch* para líquidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, n. 2, p. 69-75, 2002.

- COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 64, n. 1, p. 157-160, 1981.
- CONSTANTINEDES, S. M.; EINARSSON, S. M.; BENJA-ARPORN, Y.; PAPPAS, A. Extending the shelf-life of seafood using a multiple barrier process. **Developments in Food Science**, v. 37, p. 1453-1477, 1995.
- CORRADINI, M. G.; PELEG, M. Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experiments data. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 187-2000, 2005.
- COSTA, R.; KRISTBERGSSON, K. **Predictive Modeling and Risk Assessment**. In: DEVLIEGHIERE, F.; FRANCOIS, K.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. (Eds.), *Predictive Microbiology*, p. 29-53. Nova York, Springer, 2009.
- COSANSU, S.; MOL, S.; UCOK-ALAKAVUK, D.; OZTURAN. The effect of lemon juice on shelf life of sous vide packaged whiting (*Merlangius merlangus euxinus* Nordman, 1840). **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 283-289, 2011.
- CRISTIANINI, M. **Estudo da distribuição de temperaturas durante o processo de esterilização de atum (*Katsuwonus pelamis*) em bolsa flexível**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1998.
- DANNENHAUER, C. E. **Desenvolvimento de um aplicativo computacional para microbiologia preditiva**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- DALCANTON, F. **Modelagem matemática do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- DALGAARD, P.; JORGENSEN, L. V. Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenged tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. **International Journal of Microbiology**, v. 40, p. 105-115, 1998.

DALGAARD, P.; MEJLHOLM, O.; HUSS, H. H. Application of an iterative approach for development of a microbial model predicting the shelf life of packed fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p 169-179, 1997.

DALGAARD, P. **Fresh and lightly preserved seafood. In Shelf-Life. Evaluation of Foods**, ed 2. Edited by Man CMD, Jones AA. London: Aspen Publishers, p. 110-139, 2000.

DAVIDSON, P. M.; NAIDU, A. S. Phyto-phenols. In: NAIDU, A. S., eds. **Nature Food Antimicrobial Systems**. California: CRC Press, p. 265-294, 2000.

DAVID, J. R. D., GRAVES, R. H., CARLSON, V. R. **Asseptic processing and packaging of food: a Food Industry perspective**. USA: CRC Press, p. 257, 1996.

D'ANTUONO, L. F.; GALLETTI, G.; BOCCHINI, P. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. Populations from a North Mediterranean Area (Liguria Region, Northern Italy). **Annals of Botany**, v. 86, p. 471-478, 2000.

DHANAPAL, K.; REDDY, G.V.S.; NAYAK, B.B.; BASU, S.; SHASHIDHAR, K.; VENKATESHWARLU, G.; CHOUKSEY, M.K. Quality of ready to serve tilapia fish curry with PUFA in retortable pouches. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. S348-S354, 2010.

DEVLIEGHIERE, F.; GEERAERD, A. H.; VERSYCK, K. J.; BERNAERT, H.; VAN IMPE, J. F.; DEBEVERE, J. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of N-lactase as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 58, p. 223-228, 2000.

DEVLIEGHIERE, F.; VERMEIREN, F.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 273 -285, 2004.

DORMAN, H. J. D.; PELTOKETO, A.; HILTUNEN, R.; TIKKANEN, M. J. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, v. 83, p. 255-262, 2003.

ELLIOTT, R. P. The microbiology of sanitation. In: KATSUAYAMA, A. M.; STRACHAN, J. P. (Ed). **Principles of food processing sanitation**. Washington D.C.: The Processing Institute, 1980. p. 39-60.

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca. SANTOS, A. A.; NOVAES, A. L. T.; SILVA, F. M.; SOUZA, R. V.; COSTA. S. W. **Síntese Informativa da Maricultura 2011**, 2012.

ERCOLINI, D.; LA STORIA, A.; VILLANI, F.; MAURIELLO, G. Effect of a bacteriocin activated polyethylene film on *Listeria monocytogenes* as evaluated by viable staining and epifluorescence microscopy. **Journal Applied Microbiology**, v. 100, p.765–772, 2006.

ESPINA, L.; GARCÍA D. G.; LAGLAOUI, A.; MACKAY, B. M.; PAGÁN, R. Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, p. 23-30, 2013.

EVANGELISTA, A. A. F.; GOIS, M. S.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R. Avaliação do efeito cupinicida de óleo essencial de cascas de laranja. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, v. 061, Campinas, 2005. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), p. 772005.

FAO – **Food and Agriculture Organization** – Disponível em [www.fao.org](http://www.fao.org). Acesso em: 29/11/2012.

FERREIRA, C. L. L. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa: UFV, 2003, 205p.

FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A. R. M. **Cultivo de mexilhões. In: Aquicultura: Experiências brasileiras**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A. R. M. **Cultivo de Mexilhões**. Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos – Universidade Federal de Santa Catarina, s/d.

FERREIRA, L. D. **Utilização da microbiologia preditiva na avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas em presunto fatiado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANGOS, L.; PYRGOTOU, N.; GIATRAKOU, V.; NTZIMANI, A.; SAVVAIDIS, I. N. Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. **Food Microbiology**, v. 27, p. 115-121, 2010.

FRANÇOISE, L. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. **Food Microbiology**, v. 27, p. 698-709, 2010.

FRANÇA FILHO, A. T. F.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, J. P.; BUENO, C. P.; LOPES, J. H.; COUTO, M. V.; BORGES, N. M. F. Qualidade bacteriológica de meias carcaças bovinas oriundas de matadouros frigoríficos do estado de Goiás habilitados para exportação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 3 p. 315-325, 2006.

FRANZ, C.; NOVAK, J. Sources of essential oils. In: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of Essential Oils: science, technology, and applications**. CRC Press, 2010.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. (Ed.). **Standard methods for the examination of dairy products**. Washington: American Public Health Association, p.271-286, 1992.

FRIEDMAN, M.; KOZUEKUE, N.; HARDEN, A. Cinnamaldehyde content in foods determined by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p.5702-5709, 2000.

FURLAN, E. F. **Vida útil dos mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral norte de São Paulo: Aferição dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FURLAN, E. F. QUALITY AGGREGATION OF SETE-BASBAS SHIRIMP (*Xiphopenaeus kroyeri*) disembarked in the Cost of São Paulo, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, p. 317-326, 2011.

FURLÁN, É. F.; GALVÃO, J. A.; SALÁN, E. O.; YOKOYAMA, V. A.; OETTERER, M. Estabilidade físico-química e mercado de mexilhões (*Perna perna*) cultivado em Ubatuba-SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 516-523, 2007.

GALVÃO, J. A.; FURLAN, E. F.; SALÁN, E. O.; PORTO, E.; OETTER, M. Características físico-químicas e microbiológicas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) da água e dos mexilhões cultivados na região de Ubatuba, SP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1124-1129, 2006.

GARCIA DE FERNANDO, G. D. et al., Growth/survival of psychotropic pathogens on meat packaged under modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 221-231, 1995.

GARCÍA-LINARES, M. C.; GONZALEZ-FANDOS, E.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. C.; GARCÍA-ARIAS, M. T. Microbiology and nutritional quality of sous vide or traditionally processed fish: influence of fat content. **Journal of Food Quality**, v. 27, p. 371-387, 2004.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações.** São Paulo: Nobel, 2008.

GELLI, V. C.; PEREIRA, R. T. L.; GIFFONI, B. B. Caracterização da militicultura no litoral norte de São Paulo. In: Semana Nacional de Oceanografia. **Resumos.** Porto Alegre: Ed. Universitária, p. 37-40, 1998.

GIANNUZI, L.; PINOTTI, A.; ZARITZKY, N. Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef at different

temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 101-110, 1998.

GIBSON, A. M.; BRATCHELL, N., ROBERTS, T. A. The effect of sodium chloride and temperature on rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type. A in pasteurized pork slurry. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 62, p. 479-490. 1987.

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

GONÇALVES, A. C. **Qualidade e valorização em aquacultura: Propriedades sensoriais e período de conservação útil de peixes e bivalves**. Tese (Doutorado em Bromatologia) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

GOULAS, A. E.; CHOULIARA, I.; NESSI, E.; KONTOMINAS, M. G.; SAVVAIDIS, I. N. Microbiological, biochemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. **Journal Applied Microbiology**, v. 98, p. 752-760.

GONZÁLEZ-FANDOS, E.; VILLARINO-RODRIGUEZ, A.; GARCÍA-LINARES, M. C.; GARCÍA-ARIAS, M. T.; GARCÍA-FERNANDEZ. Microbiological safety and sensory characteristics of salmon slices processed by the sous vide method. **Food Control**, v. 16, p. 77-85, 2005.

GOSPAVIC, R.; KREYENSCHMIDT, J.; BRUCKER, S.; POPOV, V.; HAQUE, N. Mathematical modeling for predicting the growth of *Pseudomonas* ssp. in poultry under variable temperature conditions. **International Journal of Food Microbiology**, n. 127, p. 290-297, 2008.

GOUNOT, A. M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. **Nederlands Melk em Zuiveltijds**, Chicago, n. 42, p. 1192-1197. 1986.

HABERBECK, L. U. **Modelagem da inativação isotérmica e não isotérmica de *Bacillus coagulans* por tratamento termoquímico**

**utilizando óleo essencial de orégano.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

HABERBECK, L. U.; Riehl, C. A. S.; SALOMÃO, C. M.; ARAGÃO, G. M. F. *Bacillus coagulans* spore inactivation through the application of oregano essential oil and heat. **Food Science and Technology**, v. 46, p. 267-273, 2012.

HOGG, S. **Essential Microbiology.** Chichester, West Sussex, England: John Wiley and Sons, LTD, p. 66-87, 2005.

HOLDSWORTH, D.; SIMPSON, R. **Thermal Processing of Packaged Foods. Second Edition. Food Engineering Series.** New York: Springer, 2007.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oil and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 27, p. 273-292, 2005.

HUANG, L.; TU, S-I.; PHILLIPS, J.; FRATAMICO, P. Mathematical modeling of growth of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw ground beef. **Journal of Food Science**, v. 77, p. 217-225, 2012.

HUBER, E. **Resfriamento a vácuo de cortes de carnes após o cozimento.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

HUBER, E.; SOARES, L. P.; CARCIOFI, B. A. M.; HENSE, H.; LAURINDO, J. B. Vacuum cooling of cooked mussels (*Perna perna*). **Food Science and Technology International**, v. 12, n. 1, p. 19-25, 2006.

HUFFMAN, R. D.; RILLEY, J. M. Low Oxygen Packaging with CO: a study in food politics that warrants peer review. **Food Safety Magazine**, p. 1-6, 2007.

HURTADO, J. L.; MONTERO, O.; BORDEIRAS, J. Chilled storage of pressurized octopus (*Octopus vulgaris*) muscle. **Journal Food Science**, v. 66, p. 400-406, 2001.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies and interactions with food matrix components. *Food Microbiology*, v. 12, **Frontiers in Microbiology**, 2012.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL STANDARD FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms on foods-application of the hazard analysis and critical points system to ensure microbiological safety and quality**. Oxford, v.4, 1988.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológico**. Zaragoza: Acribia, 1986, 431 p.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Tradução de Eduardo Cesar Tondo et al., 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JELACIC, S. C.; BEATOVIC, D. V.; PRODONOVIC, S. A.; TASIC, S. R.; MORAVCEVIC, D. Z.; VUJOSEVIC, A. M.; VUCKOVIC, S. M. Chemical composition of the oil of basil (*Ocimum basilicum* L. Lamiaceae). **Hemijaska Industrija**, v. 65, p. 465-471, 2011.

JOHN, L.; CORNFORTH, D.; CARPENTER, C. E.; SORHEIM, O.; PETTEE, B. C.; WHITTIER, D. R. Color and thiobarbituric acid values of cooked top sirloin steaks packaged in modified atmospheres of 80% oxygen, or 0,4% carbon monoxide, or vacuum. **Meat Science**, v. 69, n. 3, p. 441-449, 2005.

JUNEJA, V. K. **Thermal treatments to control pathogens in muscle foods with particular reference to sous vide products**. In: JUNEJA, V. K.; CHERRY, J. P (Eds), *Advances in Microbial Food Safety*, p. 87-108. Washington DC: American Chemical Society, 2006.

JUN, S.; COX, L. J.; HUANG, A. **Using the flexible retort pouch to add value to agricultural products - Food Safety and Technology**. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii and Mānoa, 2006.

KAJAK, K.; KRAJEWSKA, D. K. Construction of predictive models of growth of microorganisms in salted and cure meat products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 7, p. 152-159, 2006.

KILINC, B.; CAKLI, S. UFUKTURKKAN.A. Effect of different cooking methods on chemical, microbiological and sensory quality of vacuum-packed Mediterranean anchovies (*Engraulis encrasicolus*). **Achiv fu Lebensmittelhygiene**, v. 58, p. 191-196, 2007.

KOBA, K.; POUTOULLI, P. W.; RAYNAUD, C.; SANDA. K. Antifungal activity of the essential oils from *Ocimum gratissimum* L. grown in Togo. **Journal of Scientific Research**, v. 1, n. 1, p. 164-171, 2009.

KOGA, T.; HIROTA, N.; TAKUMI, K. Bactericidal activities of essential oils of basil and sage against a range of bacteria and the effect of these essential oils on *Vibrio parahaemolyticus*. **Microbiological Research**, v. 154, p. 267-273, 1999.

KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E. Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 171-184, 2000.

KOUTSOUMANIS, K.; STAMATIOU, A.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G. J. E. Development of a microbial for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 124-134, 2006.

KREYENSCHMIDT, J. HUBNER, A.; BEIERLE, E.; CHONSH, L.; SCHERER, A.; PETERSEN, B. Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 510-520, 2010.

KRUGER, M. F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça fresca refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

KYKKIDOU, S.; GIATRAKOU, V.; PAPAVERGOU, A.; KONTOMINAS, M. G.; SAVVAIDIS, I. N. Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4 °C. **Food Chemical**, v. 115, p. 169-175, 2009.

LABADIE, J. Consequences of packaking on bacterial growth: Meat is an ecological piche. **Meat Science**, v. 52, p. 299-305, 1999.

LABUZA, T. P.; FU, B. Growth kinetics for shelf life prediction: theory and practice. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 12, p. 309-323, 1993.

LAWRIE, R. A. **Ciência da carne**. Tradução de Jane Maria Rubensam. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LEBLANC, J. C.; SIROT, V.; VOLATIER, J. L.; BEMRAH-AOUACHRIA, N. CALIPSO – Fish and seafood consumption study and biomarker of exposure to trace elements, pollutants and omega 3: **AFSSA**, 2006.

LEISTNER, L.; GORRIS, L. G. M. Food preservation by hurdle technology. **Trends in Food and Technology**, v. 6, p. 41-46, 1995.

LEROI, F.; JOFFRAUD, J. J.; CHEVALIER, F.; CARDINAL, M. Study of the microbial ecology of cold smoked salmon during storage at 8 °C. **International Journal Food Microbiology**, v. 39, p. 111-121, 1998.

LI, H.; XIE, G.; EDMONDSON, A. S. Rewiew os secondary mathematical models of predictive microbiology. **Journal of Food Products Marketing**, v. 14, p. 57-74, 2008.

LIMA, M. **Avaliação das condições de processamento de mexilhões *Perna perna* pré-cozidos e resfriados**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; SANTOS, C. D.; NERI, D. K. P.; MORAES, J. C. Bioatividade de óleo essencial de folhas de goiabeira (*Psidium guajava*) sobre a largata-do-caruncho do milho. In: III

SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, Campinas, 2005.

**Resumos:** Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), p. 77, 2005.

LIN, Y. T.; LABBE, R. G.; SHETTY, K. Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 453-458, 2005.

LONGHI, D. A. **Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não isotérmicas.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

LUBBE, A.; VERPOORTE, R. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials – Review. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 785-801, 2011.

MAGALHÃES, A. R. M. **Teor de proteínas do mexilhão *Perna perna* (Linné , 1758) (MOLLUSCA, BIVALVIA), em função do ciclo sexual.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

MANZONI, G. C. **Cultivo de mexilhões *Perna perna*: evolução da atividade no Brasil e avaliação econômica da realidade de Santa Catarina.** Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2005.

MARKS, B. P. Status of microbial modeling in food process models. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 7, p. 137-143, 2008.

MARQUES, H. L. A. **Criação comercial de mexilhão: métodos e etapas, a produção e seus custos, a colheita e a comercialização.** São Paulo: Nobel, 1998.

MASNIYOM, P.; BENJAMA, O.; MANEESRI, J. Effect of tumeric and lemongrass essential oil and their mixture on quality changes of refrigerated green mussel (*Perna viridis*). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 1079-1085, 2011.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Varela, 2005.

McDONALD, K.; SUN, D. W.; Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, p. 1-27, 1999.

McMEEKIN, T. A.; OLLEY, J. N.; ROSS, T.; RATKOWSKY, D. A. **Predictive microbiology - theory and application**. New York, Wiley, 1993.

McKELLAR, R. C.; LU, X. **Modeling microbial responses in food**. London, CRC Press, 2004.

McKELLAR, R. C.; LU, X. **Modeling microbial responses in food**. In: ROSS, T.; DALGAARD, P. (Eds). *Secondary Models*, p. 63-150. London, CRC Press, 2004.

McKELLAR, R. C.; LU, X. **Modeling microbial responses in food**. In: TAMPLIN, M.; BARANYI, J.; PAOLI, G. (Eds). *Software Programs to Increase the Utility of Predictive Microbiology Information*, p. 233-242. London, CRC Press, 2004.

McMEEKIN, T.A.; ROSS, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.133-153, 2002.

McCLURE, P. J.; BLACKBURN, C. W.; COLE, M. B.; CURTIS, P. S.; JONES, J. E.; LEGAN, J. D.; OGDEN, I. D.; PECK, M. W.; ROBERTS, T. A.; SUTHERLAND, J. P.; WALKER, S. J. Review Paper. Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 265-275, 1994.

MEDEIROS, K. J.; BEIRÃO, L. H.; TRAMONTE, V. L. C. G. Composição de ácidos graxos e colesterol em mexilhões *Perna perna*. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2001.

MEXIS, S. F.; CHOULIARA, E.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4 °C. **Food Microbiology**, v. 26, p. 598-605, 2009.

MOGENSEM G.; SALMINEN, S.; O'BRIEN, J.; OUWEHAND. A.; HOLZAPFEL, W.; SHORTT, C.; FONDER, R.; MILLER, G. D.; DONOHUE, D.; PLAYNE, M.; CRITTENDEN, R.; BIANCHI SALVADORI, B.; ZINK, R. Foods microorganisms – health benefits, safety evolution and strains with documented history of use in foods. **Bulletin International Dairy Federation**, n. 377, p. 4-9, 2003.

MOGHADDAM, A. M. D.; SHAYEGH, J.; MIKAILI, P.; SHARAF, J. D. Antimicrobial activity of essential oil extract of *Ocimum basilicum* L. leaves on a variety of pathogenic bacteria. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 3453-3456, 2011.

MOHAN, C. O., RAVISHANKAR, C. N.; GOPAL, T. K. S.; BINDU, J. Thermal processing of prawn “kuruma” in retortable pouches and aluminum cans. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 200–207, 2008.

MOHANIA, D.; NAGPAL, R.; KUMAR, M.; BHARDWAJ, A.; YADAV, M.; JAIN, S.; MAROTTA, F.; SINGH, V.; PARKASH, O.; YADAV, H. Molecular approaches for indentification and characterization of lactic acid bacteria. **Journal of Digestive Diseases**, v. 9, p. 190-198, 2008.

MOL, S.; OZTURAN, S.; COSANSU, S. Determination of the quality and shelf life of sous vide packaged whiting (*Merlangius merlangus euxinus*, Nordman 1840) stored at cold (4 °C) and temperature abuse (12 °C). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, p. 497-503, 2011.

MORITA, R. Y. Psychrophilic Bacteria. Barcteriological reviews. **Department of Microbiology and School of Oceanography**, Oregon State University, Corvallis, Oregon p. 144-167, 1975.

NACMF. Recommendations for refrigerated foods containing cooked, uncured meat or poultry products that are packaged for extended,

refrigerated shelf life and that are ready-to-eat, or prepared with little or no additional heat treatment. **National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF)**. Washington, DC, 1990.

NASCIMENTO, M. G. F.; NASCIMENTO, E. R. **Importância da avaliação microbiológica na qualidade e segurança dos alimentos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. p. 11 (Embrapa-CNPAB. Documentos, 120).

NASCIMENTO, M.; MORENO, I.; KUAYE, A. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 120-127, abr./jun. 2008.

NASCIMENTO, M. G. F. do.; OLIVEIRA, C. Z. F.; NASCIMENTO, E. R. Hambúrguer: evolução comercial e padrões microbiológicos. **Boletim CEPPA**, v. 23, n. 1, p. 59-74, 2005.

NAKASHIMA, S. M. K; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 41-51, 2000.

NAZER, A. I.; KOBILINSKYB, A.; THOLOZANA, J-L.; DOBOIS-BRISSENETA, F. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. *Thyphimurium*: a synergistic effect? **Food Microbiology**, v. 22, p. 391-398, 2005.

NYCHAS, G. J. E.; SKANDAMIS, P. N.; TASSOU, C. C.; KOUTSOUMANIS, K. P. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, v. 78, p. 77-89, 2008.

ORBAN, E., DI LENA, G., NEVIGATO, T., CASINI, I., MARZETTI, A., CAPRONI, R. Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. **Food Chemistry**, v. 77, p. 57, 2002.

ORDÓÑEZ-PEREDA, J. A. **Tecnologia de alimentos – Componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: ARTMED, p. 294, 2005.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putia* strain isolated from meat. **Meat Science**, v. 71, p. 236-244, 2006.

OYARZABAL, M. E. M.; SCHUCH, L. F. D.; PRESTES, L. S.; SCHIAVON, D. B. A.; RODRIGUES, M. R. A.; MELLO, J. B. Antimicrobial action of *Origanum vulgare* L. essential oil leche bovino. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 16, p. 260-266, 2011.

OYEDEMI, S. O.; OKOH, A. I.; MABINYA, L. V.; PIROCHENVA, G.; AFOLAYAN, A. J. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol,  $\alpha$ -terpinol and  $\gamma$ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. **African Journal Biotechnology**, v. 8, p. 1280-1286, 2009.

ÖZKAN, G.; SAGDIÇ, O.; ÖZCAN, M. Inhibition of Pathogenic Bacteria by Essential Oils at Different Concentrations. **Food Science and Technology International**, v. 9, n. 2, p. 85-88, 2003.

PAREDES-AGUILLAR, M. D. L. C.; GASTÉLUM-FRANCO, M. G.; SILVA-VÁZQUEZ, R.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V. Antimicrobial effect of Mexican oregano (*Lippia berlandieri Schauer*) and its essential oil against five *Vibrio* species. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 30, p. 261-267, 2007.

PARKER, R. O. **Introduction to food science**. United States of American: Delmar, 2001.

PELEG, M. **Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems: models for predicting growth and inactivation**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.

PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 15, p. 546-553, 2007.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v.311, n. 5762, p.808-811, 2006.

PHUA, S. T. G.; DAVEY, K. R. Predictive modeling of high pressure ( $\leq 700$ MPa) cold pasteurization ( $\leq 25$  °C) of *Escherichia coli*, *Yersinia*

*enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in three liquid foods. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 458-464, 2007.

PIRIGHARNAEI, M.; ZARE, S.; HEIDARY, R.; KHARA, J.; EMAMALISABZI, R.; KHEIRY, F.; The essential oils compositions of Iranian Oregano (*Origanum vulgare L.*) populations in field and provenance from Piranshahr district, West Azarbaijan province, Iran. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 1, n. 2, p. 106-114, 2011.

PIMENTA RODRIGUES, M. V.; NOGUEIRA, N. G. P.; PILLA, C. M. P.; FUSCO ALMEIDA, A. M.; PIETRO, R. C. L. R. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Eugenia uniflora*. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, Campinas, 2005. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), 2005.

POSCHET, F.; VAN IMPE, J. F. Quantifying the uncertainty of model outputs in predictive microbiology. **Applied Biotechnology**, v. 64, n. 5, p. 499-506, 1999.

POTENZA, M. R.; JOCYS, T. NAKAOKA SAKITA, M.; RAMOS, A. C. O.; COSTA, N. S.; FERREIRA, E. B. Avaliação inseticida de óleos essenciais para o controle do caruncho do milho (*Sitophilus zeamais*). In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, Campinas, 2005a. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), p. 77, 2005.

POTENZA, M. R.; JUSTI JUNIOR, J.; NAKAOKA SAKITA, M.; RAMOS, A. C. O.; NASCIMENTO, M. N.; OLIVEIRA, R. C. G. Avaliação de óleos essenciais de eucalipto (*Eucalyptus spp*) para o controle de baratas (*Blattella germânica*). In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, Campinas 2005b. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), p. 77, 2005.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie (LWT)**, v. 38, p. 859-865, 2005.

PYRGOTOU, N.; GIATRAKOU, V.; NTZIMANI, A.; SAVVAIDIS, I. N. Quality assessment of salted, modified atmosphere packaged rainbow

trout under treatment with oregano essential oil. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 406-411, 2010.

RATKOWSKY, D. A.; OLLEY, J.; McMEEKIN, T. A.; BALL, L. A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 149, p. 1-5, 1982.

RATLEDGE, C.; WILKINSON, S. G. An overview of microbial lipids. **In Microbial Lipids**. Ed: Academic Press, v. 1, p. 3 -22, 1988.

RAY, B. **Fundamental Food Microbiology**. 3 ed. New York: CRC PRESS, 555-556, 2003.

RESGALLA JR, C. R.; WEBER, L. I.; CONCEIÇÃO, M. B. **O mexilhão *Perna perna* (L): biologia, ecologia e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

RIBEIRO-COSTA, C. S.; ROCHA, R. M. **Invertebrados: manual de aulas práticas**. 2 ed. Ribeirão Preto: Holo, 2006.

RODGERS, S. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures – A Review. **Trends in Food Science and Techonology**, v. 12, p. 276-284, 2001.

RODRIGUES, A. D.; SCHMIDT, F. L.; VITALI, A. A.; TEIXEIRA NETO, R. O; TEIXEIRA, A. A.; GERMER, S. P. M.; SADAHIRA, M.S. Comparação entre técnicas numéricas para a resolução do problema de transferência de calor em alimentos enlatados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 2, 1998.

RODRIGUES, P. F. **Caracterização sanitária de áreas de criação de moluscos bivalves no litoral norte do Estado de São Paulo**. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências , Universidade de São Paulo, 1998.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 501-508, 1996.

ROSS, T.; McMEEKIN, T. A. Predictive Microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.41-264, 1994.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional e evolutiva**. Tradução Antonio Carlos Marques. 7 ed. São Paulo: Roca, 2005.

SAJJADI, S. E. Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. **Daru**, v. 14, p. 128-130, 2006.

SALEHI-SURMAGHI M. H. Medicinal plants and phytotherapy. **Nutrition world publications**, v. 3, p. 368-371, 2010.

SANJUÁS-REY, M.; POURASHOURI, P.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; AUBOURG, S. P. Effect of oregano and thyme essential oils on the microbiological and chemical quality of refrigerated (4 °C) ready-to-eat squid rings. **Food Science and Technology**, v. 47, p. 1439-1447, 2012.

SANTANA, E. H. W. **Contaminação do leite por micro-organismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos em diferentes pontos do processo de produção leiteira**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.

SANTOS, F. W. M. **Período de permanência de cordas do mexilhão *Perna perna* (L., 1758) em cultivo**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. **Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis**. Campinas: CETEA/ITAL, 2001.

SARANTÓPULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. **Embalagens plásticas flexíveis – Principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 2002.

SAUCEDO-REYES, D.; MARCO-CELDRÁN, A.; PINA-PÉREZ, M. C.; RODRIGO, D.; MARÍNEZ-LÓPEZ, A. Modeling survival of high hydrostatic pressure treated stationary and exponential phase *Listeria*

*innocua* cells. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 135-141, 2009.

SCANAVINI, H. F. A. **Destilação em batelada de aroma natural de caju e óleo essencial de manjeriço: investigação via simulação computacional**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

SCHELLEKENS, M. New research issues in sous vide cooking – Review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 7, p. 256-262, 1996.

SCHROETER, J.; KLAENHAMMER, T. Genomics of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Lett.**, v. 292, p. 1-6, 2009.

SILVA, C. S. A. **Avaliação microbiológica de enchidos de ovino e caprino**. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) – Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2012.

SILVA, J. P. L. **Avaliação da ação de antimicrobianos naturais no controle de *Salmonella Enteritides* em salada de legumes com maionese**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007).

SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 229p. 2001.

SILVA, V. M. **Estudo da hidrólise enzimática, microencapsulação e secagem por spray dryer da carne de mexilhão**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. In: **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento – Óleos Voláteis**. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre, RS/Florianópolis/SC, p. 387, 1999.

SMITH, P. G. **Introduction to food process engineering**. USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 466, 2003.

SINGH, S.; SINGH, M.; SINGH, A. K.; KALRA, A.; YADAV, A.; PATRA, D.D. Enhancing productivity of Indian basil (*Ocimum basilicum* L.) through harvest management under rainfed conditions of subtropical north Indian plains. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 601-606, 2010.

SLONGO, A. P. **Uso da alta pressão hidrostática em presunto fatiado: avaliação físico-química e sensorial e modelagem do crescimento microbiano**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SLONGO, A. P.; ROSENTHAL, A.; CAMARGO, L. M. Q.; DELIZA, R.; MATHIAS, S. P.; ARAGÃO. Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p. 303-306, 2009.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; FILHO, J. M. B.; MARQUES, O. M. M. Interference of heating on the antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 2, p. 418-422, 2008.

SOUZA, R. V.; NOVAES, A. L. T.; SANTOS, A. A.; RUPP, G. S.; SILVA, F. M. Controle higiênico-sanitário de moluscos bivalves no litoral de Santa Catarina. **Panorama da Aquicultura**, nov./dez., 2009. STUMBO, C.R. **Thermobacteriology in Food Processing**. 2<sup>a</sup> ed. USA: Academic Press, p. 329, 1973.

SUTHERLAND, J. P.; BAYLISS, A. J. ROBERTS, T. A. Predictive modeling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 217-236, 1994.

TEIXEIRA, B. MARQUES, A.; RAMOS, C.; NENG, N. R.; NOGUEIRA, J. M. F.; SARAIVA, J. A.; NUNES, M. L. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Productions**, v. 43, p. 587-595, 2013.

TOLDRÁ, F. **Safety of Meat and Processed Meat**. In: DELIGNETTE-MULLER, M. L. (Ed.) Principles of Predictive Modeling. Nova York, Springer, 2009.

TOMAIO, A.; CIMINO, F.; ZIMBALATTI, V.; VENUTTI, V.; SULFARO DE PASQUALE, A.; SAIJA, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, v. 89, p. 549-554, 2005.

TRUELSTRUP HANSEN, L.; GILL, T.; HUSS, H. H. Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon. **Food Research International**, v. 28, p. 123-130, 1995.

UGAZ, O. L. **Investigación Fitoquímica – Terpenoides y Esteroides**. Fondo Edictorial: Pontificia Universidad Católica del Peru, Lima: 2 ed. p. 23, 1994.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of outer membrane. **Microbiological Reviews**, v. 56, n. 3, p. 395-411, 1992.

VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium for the microbiological examination of foods**. American Public Health Association. 3 ed. Washington, DC., 1992. 1219p.

VAN IMPE, J. F.; NICOLAI, B. M.; MARTENS, T.; BAERDEMAEKER, J. A. Dynamic mathematical to predict microbial growth and inactivation during food processing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2901-2909, 1992.

VASUT, R. G.; ROBECCI, M. D. Food contamination with psychrophilic bacteria. **Lucrări Stiințifice Medicină Veterinară**, vol. 42, n. 2, p. 325-330, 2009.

VAZ-PIRES, P.; BARBOSA, A. Sensory, microbiological, physical and nutritional properties of iced whole common octopus (*Octopus vulgaris*). **LWT – Food Science and Technology**, v. 37, p. 105-114, 2004.

VELIZ, C. J. V. **Estudio de penetración de calor en una conserva de camarón envasada en empaque flexible**. Tesis de Grado (Ingeniero de Alimentos) – Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador, 2008.

VERMA, R. S.; PADALIA, R. C.; CHAUHAN, A.; VERMA, R. K.; YADAV, A. K.; SINGH, H. Chemical Diversity in Indian Oregano (*Origanum vulgare* L.). **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, p. 2054-2064, 2010.

VERNOCCI, P.; MAFFEI, M.; LANCIOTTI, R.; SUZZI, G.; GARDINI, F. Characterization of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) harvested in Adriatic Sea (Italy). **Food Control**, v. 18, p. 1575-1583, 2007.

VIANEI, R. M. **Ensaio de degradação destrutivos: Aplicação em tempo de vida de prateleira**. Dissertação (Mestrado em Estatística) – Departamento de Estatística, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

YOKOYAMA, V. A. **Qualidade do camarão da espécie *Xyphopenaeus kroyeri* mediante a ação dos agentes antimelanóticos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

YUST, J.; FUNG, D. Y. C. Evaluation of *Salmonella thyphimurium*, *Yersinia enterocolitica* and *Staphylococcus aureus* counts in apple juice with cinnamon, by conventional media and thin agar layer method. **Food Microbiology**, v. 20, p. 365-370, 2003.

XING, S.; ZHANG X.; LIU, W.; TIAN, D.; HU, J. Modeling growth of specific spoilage organisms in tilapia: Comparison Baranyi with chi-square automatic interaction detection (CHAID) model. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 26, p. 6910-6917, 2012.

WAN, J.; COVENTRY, J.; SWIERGON, P.; SANGUANSRI, P.; VERSTEEG, C. Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety – pulsed electric field and low temperature plasma. **Trends in Food Science and Technologies**, v. 20, p. 414-424, 2009.

WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. Microbial modeling. **Food Technology**, v. 48, n. 6, p. 113-120, 1994.

WOOD, P. C. **Manual de higiene de los mariscos**. Zaragoza: Acribia, 1979.

ZHELJAZKOV, V. D.; ASTATKIE, T.; SCHLEGEL, V. Distillation time changes oregano essential oil yields and composition but not the antioxidant or antimicrobial activities. **HortScience**, v. 47, p. 777-784, 2012.

ZHOU, K.; GEORGE, S. M.; LIA, P. L.; BARANYI, J. Effect of periodic fluctuation in the osmotic environment on the adaptation of *Salmonella*. **Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 298-302, 2012.

ZHOU, G. H. XU, X. L.; LIU, Y. Preservation technologies for fresh meat – a review. **Meat Science**, v. 86, p. 119-128, 2010.

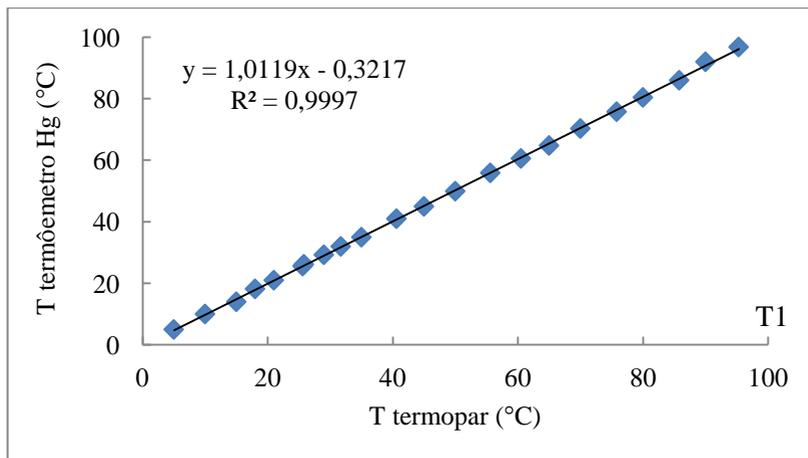
ZHOU, K.; CUI, T. T.; LI, P. L.; LIANG, N. J.; LIU, S. C.; MA, C. W.; PENG, Z. H. Modelling and predicting the effect of temperature, water activity and pH on growth of *Streptococcus iniae* in Tilapia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1956-1965, 2008.

ZIMMERMANN, M.; MIORELLI, S.; MASSAGUER, P. R.; ARAGÃO, G. M. F. Model on the influence of water activity and ascospore age on the growth of *Neosartorya fischeri* in pineapple juice. **LWT – Food Science and Technology**, In Press, Corrected Proof, 2010.

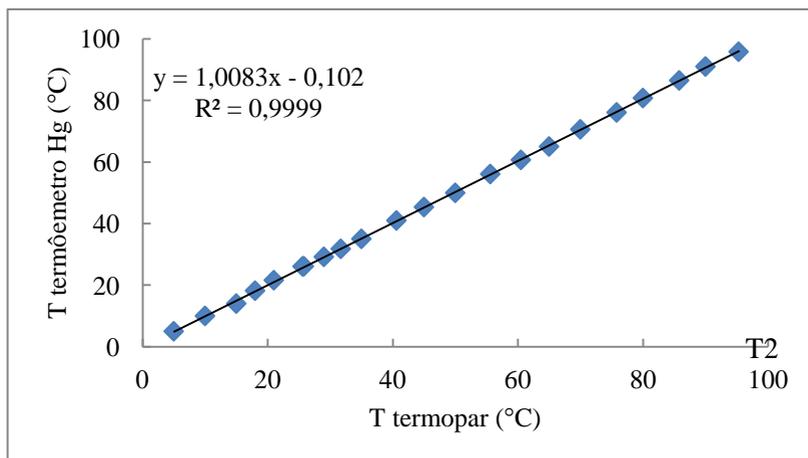
ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990.

ZWIETERING, M. H.; HEIDY, M. W.; DEN BESTEN. Modelling: One word for many activities and uses. *Food Microbiology*, v.8, p. 818-822, 2011.

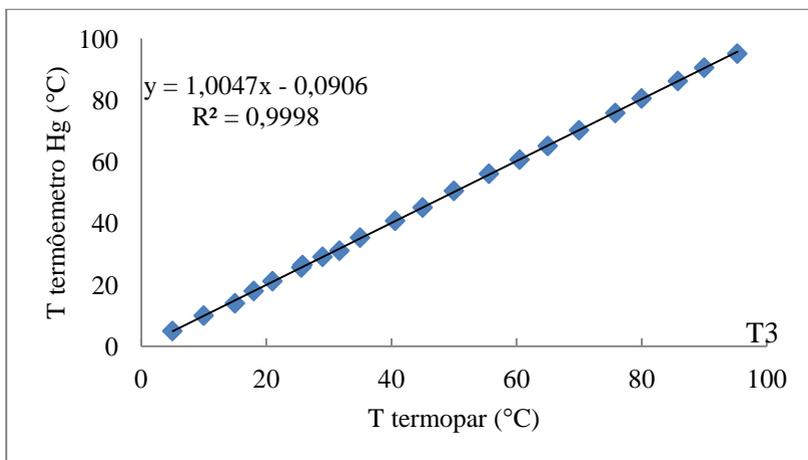
**ANEXO A – Curvas de calibração para os termopares utilizados no tratamento térmico de mexilhões tratados com óleo essencial de orégano processados em embalagens flexíveis termoprocessáveis.**



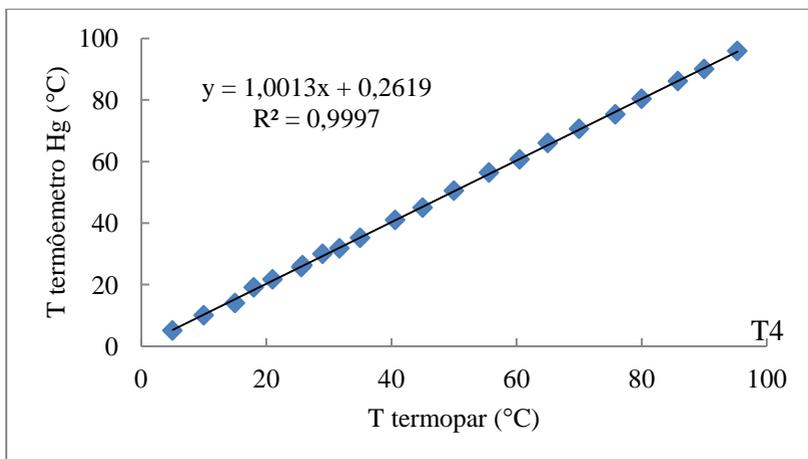
Curva de calibração Termopar 1 (T1)



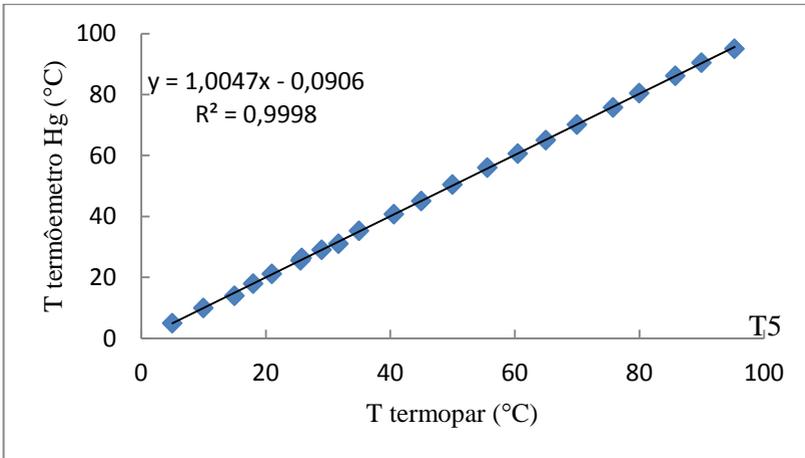
Curva de calibração Termopar 2 (T2)



Curva de calibração Termopar 3 (T3)

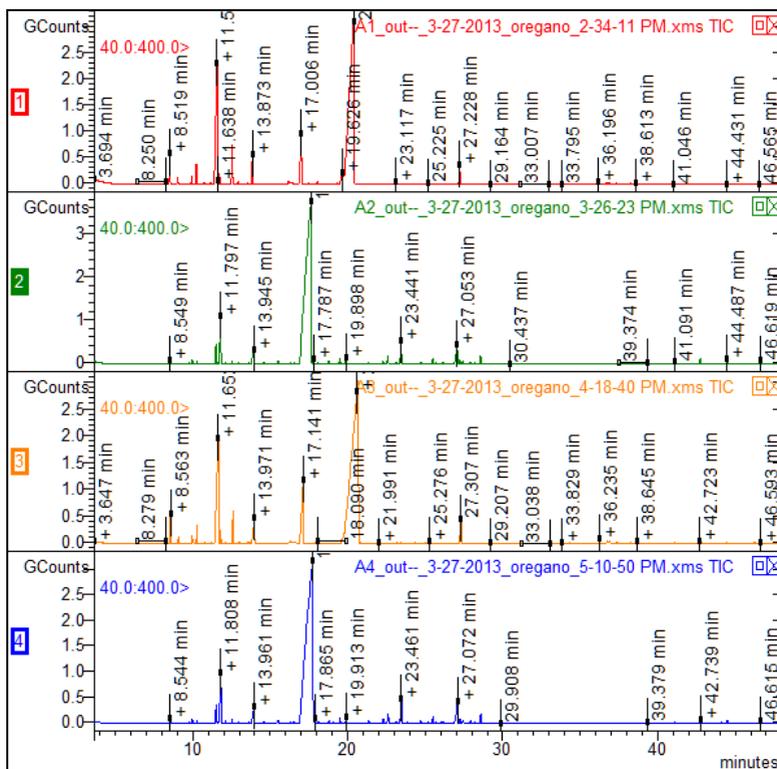


Curva de calibração Termopar 4 (T4)

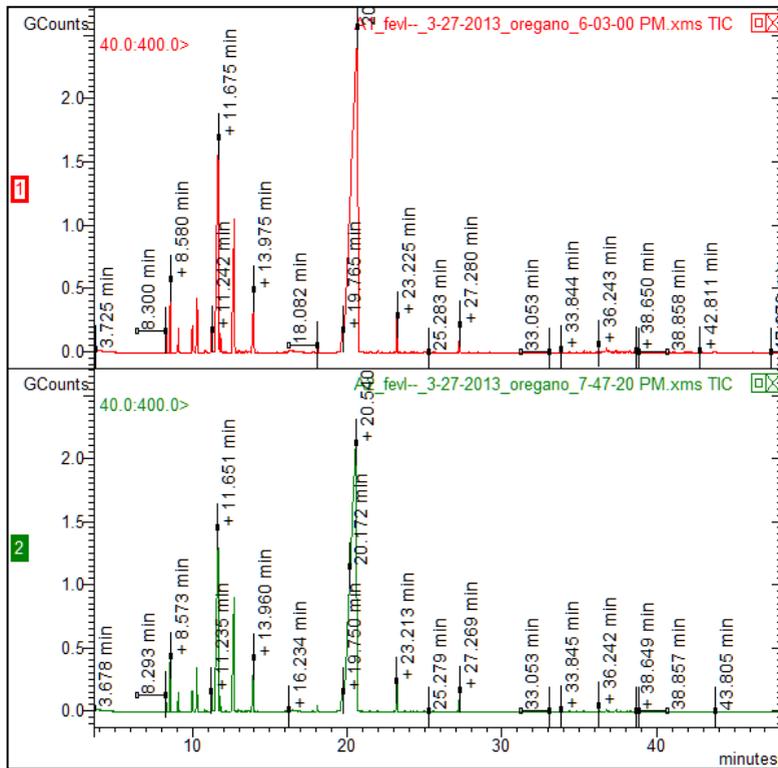


Curva de calibração Termopar 5 (T5)

## ANEXO B – Cromatogramas das análises de O.E.O e O.E.M.



Cromatograma óleos essenciais empresa Givaudan do Brasil: A1 (óleo essencial de orégano controle), A2 (óleo essencial de manjeriçao controle), A3 (óleo essencial de orégano esterilizado) e A4 (óleo essencial de manjeriçao esterilizado).



Cromatograma óleo essencial empresa Comercial Interlink LTDA: A1 (óleo essencial de orégano controle) e A2 (óleo essencial de orégano pasteurizado).

**ANEXO C – Laudos das análises microbiológicas de micro-organismos patogênicos.**