

Natielle Maria Costa Menezes

Efeito da adição de óleo essencial de orégano sobre a vida útil de presunto fatiado embalado a vácuo: modelagem em condições isotérmicas e não isotérmicas

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.^a Dr.^a Gláucia Maria Falcão de Aragão

Florianópolis
2016

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

Menezes, Natielle Maria Costa

Efeito da adição de óleo essencial de orégano sobre a vida útil de presunto fatiado embalado a vácuo: modelagem em condições isotérmicas e não isotérmicas / Natielle Maria Costa Menezes ; orientadora, Gláucia Maria Falcão de Aragão - Florianópolis, SC, 2016.

77 p.

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

Inclui referências

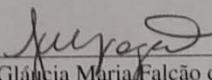
1. Engenharia de Alimentos. 2. Engenharia de Alimentos. 3. Microbiologia preditiva. 4. Bactérias ácido lácticas. 5. Deterioração. I. Aragão, Gláucia Maria Falcão de . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

**“EFEITO DA ADIÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL
DE ORÉGANO SOBRE A VIDA ÚTIL DE
PRESUNTO FATIADO EMBALADO A VÁCUO:
MODELAGEM EM CONDIÇÕES
ISOTÉRMICAS E NÃO ISOTÉRMICAS”**

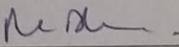
Por

Natielle Maria Costa Menezes

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia 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.

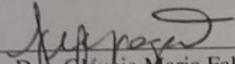


Prof. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão
Orientadora



Prof. Dr. Marco Di Luccio
Coordenador

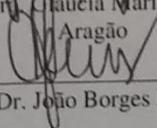
Banca Examinadora:



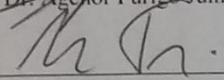
Prof. Dra. Gláucia Maria Falcão de
Aragão



Prof. Dr. Agenor Furigo Junior



Prof. Dr. João Borges Laurindo



Dr. Giustino Tribuzi

Florianópolis, 1 de março de 2016.

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é um dos sentimentos mais belos do ser humano. Através dos agradecimentos que aqui escrevo, gostaria de demonstrar um pouquinho do quanto me sinto grata e feliz pelo apoio e carinho de todos que me ajudaram a concluir mais essa importante etapa em minha vida.

A Deus pelo dom da vida, por abençoar e iluminar meu caminho colocando ao longo dele pessoas, oportunidades e lugares maravilhosos. Por ter me socorrido sempre e me dado forças para seguir em frente.

Ao meus pais, Maria e Nato, que sempre me apoiaram nas minhas escolhas, que abriram mão de muitas coisas para me ajudar. É de vocês a minha eterna gratidão não só pelas oportunidades que eles me proporcionaram ao longo da vida, mas também por serem meus exemplos de honestidade, humildade, coragem e força. A certeza desse amor incondicional sempre me deu força e esperança de lutar pelos meus sonhos.

Ao meu irmão, Vinícius, que apesar das brigas e desentendimentos normais de irmãos é o meu melhor amigo, paciente e companheiro e sempre “disposto” (um pouco de ironia nesse “disposto” rrsrrrs) a me ajudar nos probleminhas do dia a dia. Você é um chato, mas é meu irmão preferido que amo muito.

Quero agradecer muito a minha orientadora Professora Gláucia, pelos ensinamentos, incentivo, dedicação e por sempre se preocupar comigo. Pelo seu exemplo de profissionalismo e competência. Pela paciência de rodar quilômetros e quilômetros atrás de alguns presuntos. Obrigada Prof^a é uma sorte aprender com pessoas inspiradoras e que buscam sempre o melhor.

Aos professores Dr. João, Dr. Agenor, Dr. Giustino pela disponibilidade em participarem da banca e contribuírem com este trabalho.

Um agradecimento muito especial ao meu amigo Wil, por ser essa pessoa maravilhosa, divertida, espirituosa, inteligente e confiável. Por toda sua ajuda com os experimentos, as modelagens, os presuntos, o óleo (que você adora), pelas noites de experimentos e pelos muitos plaqueamentos que ficaram melhores na sua companhia. Pelos bolos, pamonhas delícias que partilhamos, ah e claro as festas e farras também. Valeu amigo!

A todos os meus colegas do Engebio e Ltbr, pelo companheirismo, conversas e troca de experiências. Muito obrigada Eduardo, Cíntia, Kellen, Denise, Marquinhos, Cris, Camila, e também a Pâmela, essa menininha muito especial e maravilhosa que eu conheci e ganhei como amiga.

Ao Daniel pela disponibilidade e ajuda nas rotinas do Matlab e tratamento dos dados.

Aos amigos e colegas de mestrado e doutorado, Paloma, Wantie, Ju, Gio, Ju, Cris, Pâmela, Roma, Francine, Pedro, Polly, Paúlia, Tati, Jean, Guri, Mireli, Fernanda valeu pelos churrascos, passeios, trilhas, praias, festas e as horas e horas de estudo. Foi muito bom conhecer pessoas alegres, divertidas, motivadas e diferentes. A nossa mistura de sotaques e culturas foi demais.

À Lídia, uma das primeiras pessoas que conheci aqui em Floripa. Obrigada pelo carinho e amizade, pelas horas de estudo, passeios e as comidas deliciosas.

À Savana, pelas boas risadas, conversas, pelas pipocas, pelo incentivo, amizade e companheirismo.

Às minhas amigas lindas, animadas, divertidas, companheiras de festas e baladas, passeios, bons e maus momentos, Ju, Leidi, Fernanda, Gio, Lídia e Dani obrigada pelas boas conversas, pelas risadas e por estarem comigo e tornarem esses momentos ainda mais alegres.

Às minhas amigas de Minas que, mesmo à distância, sempre me apoiaram, incentivaram, com uma palavra amiga: Iara, Letícia, Simone, Paula, Cíntia, Gabi, Roberta. Nossas horas e horas no telefone, whats app e os nossos raros encontros foram muito especiais, sou muito grata por ter encontrado amigas sinceras, companheiras e maravilhosas iguais a vocês.

A todos os meus familiares e amigos, que são muitos, que com uma palavra amiga, um gesto de carinho, uma carona ou um abraço também contribuíram nessa minha conquista.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, pela oportunidade de desenvolvimento desse trabalho. A Jeovana que sempre foi muito prestativa, me auxiliando e ajudando.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Este trabalho pode ser realizado somente com a contribuição direta ou indireta de todos.

Muito obrigada!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original”
(Albert Einstein)

RESUMO

Produtos cárneos prontos para comer são economicamente importantes e de consumo elevado em todo o mundo. A vida útil desses produtos é limitada principalmente devido à deterioração. As bactérias ácido lácticas (BAL) são consideradas os principais microrganismos deteriorantes de produtos de carne cozidos e embalados a vácuo, mantidos sob refrigeração. Essas bactérias podem causar alterações como sabores estranhos, descoloração, produção de gás, diminuição do pH e produção de limo. A variação de temperatura é um dos principais fatores que altera a dinâmica de crescimento microbiano durante o armazenamento e distribuição de alimentos. O óleo essencial de orégano (OEO) tem sido utilizado como agente antimicrobiano natural visando aumentar a vida útil de produtos alimentares. A microbiologia preditiva é uma importante ferramenta na predição da vida útil de alimentos, pois utiliza modelos matemáticos capazes de descrever o comportamento microbiano considerando diferentes condições ambientais. Mediante isto, o objetivo geral deste trabalho foi modelar o efeito da utilização de OEO como agente antimicrobiano sobre a vida útil de presunto fatiado embalado a vácuo, em condições isotérmicas e não isotérmicas, com base no crescimento da flora natural de bactérias ácido lácticas (BAL). O presunto foi caracterizado quanto ao seu pH, atividade de água e concentração de cloreto de sódio, que encontravam-se dentro da faixa ótima de desenvolvimento de BAL descrita pela literatura. Foi avaliado o crescimento da flora natural de bactérias ácido lácticas no presunto em diferentes perfis de temperaturas (6, 12, 15, 20 e 25 °C), com o tratamento com OEO na concentração de 0,4% (v/m de OEO) e sem OEO. O modelo de Baranyi e Roberts (BAR) foi ajustado às curvas de crescimento e foram obtidos os parâmetros $\mu_{\text{máx}}$, λ e $y_{\text{máx}}$, para cada temperatura. Três modelos secundários foram avaliados para descrever a influência da temperatura sobre o parâmetro de crescimento $\mu_{\text{máx}}$, o que foi melhor descrito pelo modelo exponencial. O modelo secundário para o parâmetro $y_{\text{máx}}$ foi considerado como a média dos valores obtidos pelo ajuste. Com base nos modelos selecionados, o modelo de Baranyi e Roberts (1994) foi utilizado para prever o crescimento de flora natural sob condições não isotérmicas. O modelo proposto foi validado com dados experimentais do crescimento de flora natural de bactérias ácido lácticas em presunto fatiado embalado a vácuo, sob diferentes perfis de temperatura, com temperaturas acima da temperatura de refrigeração, e sua capacidade de predição foi avaliada por meio de índices estatísticos. Os resultados mostraram que o modelo preditivo estudado tem a possibilidade de ser utilizado para prever a vida útil de produtos cárneos e o óleo essencial de

orégano apresentou um bom efeito como antimicrobiano em temperaturas de refrigeração, estendendo a vida útil do produto.

Palavras-chave: microbiologia preditiva, bactérias ácido lácticas, produtos cárneos, deterioração, óleo essencial de orégano, modelos não isotérmicos.

ABSTRACT

Ready-to-eat meat products are economically important chilled products widely consumed in world. The shelf-life of this products is limited mainly due to the deterioration. The lactic acid bacteria (LAB) are considered the main spoilage microorganisms of vacuum packed cooked meat products and kept under refrigeration. These bacteria can cause change such as off-flavours, discoloration, gas production, pH decrease and slime production. The temperature change is the main factor that changes the dynamics of microbial growth during storage and distribution of food. The oregano essential oil (OEO) has been used as a natural antimicrobial agent to increase the shelf life of food products. The predictive microbiology is an important tool in predicting the shelf life of foods, because it uses mathematical models able to describe the microbial behavior considering different environmental conditions. The aim of this study was to model the effect of using OEO as an antimicrobial agent on the shelf life of sliced vacuum packed ham in isothermal and non-isothermal conditions, based on the growth of the natural flora of lactic acid bacteria (LAB). The ham was characterized by pH, water activity and sodium chloride concentration, which the optimum range of BAL development described in the literature. The growth of the natural flora of lactic acid bacteria in the ham with OEO at a concentration of 0.4% (v/w OEO) and without OEO was evaluated at different temperatures profiles (6, 12, 15, 20 and 25 ° C). The Baranyi and Roberts (BAR) model was adjusted to the growth curves and the parameters were obtained ($\mu_{\text{máx}}$, λ e $y_{\text{máx}}$) for each temperature. Three secondary models were evaluated to describe the influence of temperature on the $\mu_{\text{máx}}$ growth parameter, and this was better described by the exponential model. The secondary model for the parameter $y_{\text{máx}}$ was considered as the average of the values obtained by the adjustment. Based on the selected models, the Baranyi and Roberts (1994) model was used to predict the natural flora growth under non-isothermal conditions. The proposed model was validated with natural flora of lactic acid bacteria growth experimental data in sliced vacuum packed ham under different temperature profiles, with temperatures above refrigeration temperature, and its predictive ability was evaluated by statistical indices. The results showed that the predictive model studied can be used to predict the shelf life of meat products, moreover the oregano essential oil showed a good antimicrobial effect and at refrigerated temperatures, extend the life of the product.

Keywords: predictive microbiology, lactic acid bacteria, meat products, spoilage, oregano essential oil, non-isothermal models

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Curva de crescimento. λ (fase lag), $\mu_{\text{máx}}$ (taxa máxima específica de crescimento), n_0 (concentração celular inicial) e $n_{\text{máx}}$ (concentração celular máxima)..... 33
- Figura 2 - Processo de fatiamento das amostras de presunto. 38
- Figura 3 - Fluxograma do preparo das amostras de presunto fatiado com a adição de OEO. 39
- Figura 4 - Curvas de crescimento de flora natural nas temperaturas de 6 °C (a), 12 e 15 °C (b) e 20 e 25 °C (c), com e sem OEO e ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto. As linhas pretas (contínuas - s/OEO; tracejadas – c/OEO) representam o ajuste do modelo primário. A linha vermelha indica a contagem final que define a vida útil do presunto..... 46
- Figura 5 - Curvas de crescimento de flora natural nas temperaturas de 6, 12, 15, 20 e 25°C, com e sem OEO e ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto. As linhas pretas (contínuas - s/OEO; tracejadas - c/OEO) representam o ajuste do modelo primário. A linha vermelha indica a contagem final que define a vida útil do presunto. 48
- Figura 6- Influência da temperatura sobre a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de flora natural de BAL em presunto s/ OEO. A linha contínua representa o ajuste do modelo secundário exponencial (a) e raiz quadrada (b) aos dados experimentais. Os resíduos decorrentes do ajuste dos modelos são apresentados em (c) e (d)..... 54
- Figura 7 - Influência da temperatura sobre a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de flora natural de BAL em presunto c/ OEO. A linha contínua representa o ajuste do modelo secundário exponencial (a) e (b) raiz quadrada aos dados experimentais. Os resíduos decorrentes do ajuste dos modelos são apresentados em (c) e (d)..... 55
- Figura 8- Influência da temperatura sobre a vida útil de presunto fatiado embalado a vácuo. A linha contínua representa o ajuste do modelo secundário exponencial. (a)S/ OEO e (b) C/ OEO. 56

Figura 9 - Crescimento de flora natural em presunto submetido às condições não isotérmicas do perfil (NI-1), previstas pelo modelo de Baranyi e Roberts, com e sem OEO e validada pelos dados experimentais.	57
Figura 10 - Crescimento de flora natural em presunto submetido às condições não isotérmicas do perfil (NI-2), previstas pelo modelo de Baranyi e Roberts, com e sem OEO e validada pelos dados experimentais.	58
Figura 11 - Relação entre os dados de crescimento observados vs previstos pelo modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts obtidos para flora natural nos perfis de temperatura: (a) NI-1(S/ OEO), (b) NI-1 (C/ OEO), (c) NI-2 (S/ OEO) e (d) NI-2 (C/ OEO).	60
Figura 12 - Comparação da capacidade preditiva do modelo obtido usando cultura pura de <i>W. viridescens</i> (Martins (2015)) com o modelo utilizando flora natural de BAL.	63
Figura 13 - Crescimento de flora natural em presunto, crescimento de <i>W. viridescens</i> (presunto/ meio de cultivo MRS) e previsões geradas pelo Modelo de Baranyi e Roberts para o perfil de temperatura NI-2.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Modelos secundários usados para descrever a influência da temperatura no parâmetro velocidade específica máxima de crescimento.	42
Tabela 2 - Índices estatísticos utilizados para comparação e validação dos modelos.	43
Tabela 3 - Valores de média e desvio padrão das análises realizadas em presunto.	45
Tabela 4 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto a 6, 12, 15, 20 e 25 °C com óleo essencial de orégano.	50
Tabela 5 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto a 6, 12, 15, 20 e 25 °C sem óleo essencial de orégano.	50
Tabela 6 - Índices estatísticos obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto a 6, 12, 15, 20 e 25 °C.	51
Tabela 7 - Modelos secundários que melhor descrevem a influência da temperatura sobre o parâmetro velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) de flora natural de BAL.	53
Tabela 8 - Modelos secundários que descrevem a influência da temperatura sobre a vida útil de presunto fatiado embalado a vácuo.	56
Tabela 9 - R^2 , RMSE, Fator bias e Fator exatidão da predição do crescimento de pelo modelo de Baranyi e Roberts nas duas condições não isotérmicas avaliadas.	61
Tabela 10 - Vida útil predita e observada nos perfis não isotérmicos avaliados.	62
Tabela 11 - Índices estatísticos obtidos pelos ajustes dos modelos obtidos utilizando cultura pura de <i>W. viridescens</i> (Martins (2015)) e flora natural de BAL.	63
Tabela 13- Compostos identificados no OEO antes e após pasteurização, com os tempos de retenção e concentração relativa (%) detectados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.	78

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e SÍMBOLOS

- aw - Atividade de água
BAL - Bactérias ácido lácticas
BOD - Estufa incubadora para demanda bioquímica de oxigênio
GRAS - *Generally recognized as safe*
F(t) - Função de ajuste
 h_0 - Parâmetro do Modelo de Barany e Roberts (estado fisiológico da célula)
 C_{Cl} - Concentração de Cl (g/L)
 m - Massa (g)
 M_{Cl} - Massa molar do cloreto (g/mol)
 M_{NaCl} - Massa molar do cloreto de sódio (g/mol)
MRS - Meio de cultivo Man, Rogosa e Sharpe
NI-1- Condição não isotérmica 1
NI-2 - Condição não isotérmica 2
N - Concentração microbiana (UFC/g)
 N_0 - Concentração microbiana inicial (UFC/g)
 $N_{máx}$ - Concentração microbiana máxima (UFC/g)
 p - Parâmetro a ser descrito pelos modelos secundários
 q - Parâmetro do Modelo de Barany e Roberts
 q_0 - Parâmetro do Modelo de Barany e Roberts
rpm - rotações por minuto
 t - Tempo (h)
T - Temperatura (°C)
 $T_{mín}$ - Temperatura mínima de observação do crescimento (°C)
UFC - Unidades formadoras de colônia
UV – ultravioleta
V - Volume (L)
 x_{NaCl} - Concentração de cloreto de sódio (g/g)
 $y_{máx}$ - Logaritmo natural da população microbiana máxima [Ln (UFC/g)]
 $\mu_{máx}$ - Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
 λ – duração da fase lag (h)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
1.1 OBJETIVOS.....	26
1.1.1 Objetivo geral.....	26
1.1.2 Objetivos específicos.....	26
2 REVISAO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....	27
2.2 ALTERAÇÕES EM PRODUTOS CARNEOS.....	28
2.3 ANTIMICROBIANOS NATURAIS (ÓLEOS ESSENCIAIS).....	29
2.3.1 Óleo essencial de orégano.....	30
2.4 MICROBIOLOGIA PREDITIVA.....	31
2.4.1 Modelos Primários de Crescimento.....	32
2.4.2 Modelos Secundários.....	34
2.4.3 Modelo Não Isotérmico.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO PRESUNTO.....	37
3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	38
3.3 CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E ARMAZEMAMENTO DAS AMOSTRAS.....	40
3.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	40
3.5 MODELAGEM MATEMÁTICA DAS CURVAS DE CRESCIMENTO MICROBIANO.....	41
3.5.1 Modelo Primário de Crescimento.....	41
3.5.2 Modelos Secundários.....	41
3.5.3 Predições do Modelo Não Isotérmico.....	42
3.5.4 Comparação da capacidade preditiva do modelo obtido para flora natural com o modelo para cultura pura de BAL.....	42
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PRESUNTO.....	45
4.2 AJUSTES DO MODELO PRIMÁRIO.....	45
4.3 MODELOS SECUNDÁRIOS.....	52
4.4 PREDIÇÃO DO CRESCIMENTO DE FLORA NATURAL SOB CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS.....	56
4.5 COMPARAÇÃO ENTRE O MODELO OBTIDO DE FLORA NATURAL E O MODELO DE CULTURA PURA (<i>Weissela viridescens</i>).....	62
5 CONCLUSÕES.....	66
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXO 1- Composição do óleo essencial de orégano.....	78

1 INTRODUÇÃO

A demanda por parte dos consumidores por alimentos de fácil preparo e consumo, seguros, menos processados e com características mais naturais tem aumentado nos últimos anos.

Os produtos alimentares prontos para consumo, como presunto, peito de peru e peito de frango, têm grande importância econômica, e seu consumo vem crescendo cada vez mais (AUDENAERT et al., 2010). O controle de qualidade e segurança destes alimentos em todas as fases da cadeia do frio são uma das principais preocupações da indústria. Esse controle é importante para reduzir as perdas de alimentos e os riscos para a saúde do consumidor (STAHL et al., 2015). A vida útil de tais produtos, como do presunto fatiado, é limitada devido a problemas de deterioração. As contaminações ocorrem porque as manipulações, como corte e embalagem, inevitavelmente reintroduzem microrganismos após o processo de cozimento (VERCAMMEN et al., 2011).

As bactérias ácido lácticas (BAL) são o principal grupo de bactérias associadas com a deterioração de produtos de carnes cozidos e embalados a vácuo mantidos sob refrigeração, incluindo presunto. Essas bactérias podem causar efeitos indesejáveis, tais como sabores estranhos, produção de gás, diminuição do pH, descoloração e / ou cor esverdeada e produção de limo, diminuindo a vida útil desses produtos (BORCH et al., 1996; SAMELIS et al., 2000; SLONGO et al., 2009; LLORET et al., 2016).

Agentes antimicrobianos, incluindo conservantes de alimentos, têm sido utilizados para inibir bactérias e estender a vida útil dos alimentos processados. O uso de agentes antimicrobianos naturais tem aumentado cada vez mais, devido à opção cada vez maior dos consumidores por ingredientes naturais e com menos aditivos químicos (PETROU et al., 2012; CALO et al., 2015).

Os óleos essenciais são compostos naturais voláteis complexos, caracterizados por um forte odor e formados por metabólitos secundários de plantas aromáticas (BURT, 2004). Eles são conhecidos por sua atividade antimicrobiana e vêm sendo utilizados como conservantes naturais para aumentar a vida útil de produtos alimentares (TEIXEIRA et al., 2013). O óleo essencial de orégano é tido como um dos óleos essenciais de ação antimicrobiana mais eficaz (EMIROĞLU et al., 2010; AGUIRRE et al., 2013).

A modelagem matemática é uma ferramenta importante para descrever a vida útil dos alimentos (KOUTSOUMANIS e NYCHAS, 2000;

MATARAGAS et al., 2006). A microbiologia preditiva utiliza modelos matemáticos para descrever o comportamento microbiano frente às diversas condições ambientais, permitindo assim uma avaliação objetiva do efeito das operações de transformação, distribuição e armazenamento sobre a segurança e qualidade dos alimentos (MCMEEKIN et al., 2002).

O principal parâmetro de determinação de vida útil no pós-processamento de alimentos resfriados e congelados é a temperatura (GOGOU et al., 2015). A temperatura é um fator que pode variar muito dentro da cadeia de produção e distribuição de produtos alimentares (NYCHAS et al., 2008; LONGHI et al., 2013). O uso de modelos matemáticos que levam em conta estas variações podem ser muito úteis para prever a vida útil de alimentos em condições reais (VAN IMPE et al., 1992; BARANYI, 1995; GOSPAVIC et al., 2008).

O presunto é um produto cárneo de consumo elevado em todo o país e também no mundo. Esse produto sofre muitas manipulações pós-processamento, pois em geral é vendido em fatias e embalado a vácuo, e por se tratar de um produto refrigerado, as variações de temperaturas que ocorrem durante toda a cadeia do frio podem aumentar os riscos de deterioração diminuindo sua vida útil.

O grupo de pesquisa em Microbiologia Preditiva do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC vem trabalhando com a modelagem matemática do crescimento de bactérias ácido lácticas sob condições isotérmicas e não isotérmicas, em meio de cultura (MRS) e em produtos cárneos. Camargo (2015) modelou o crescimento de BAL (*Lactobacillus plantarum*, *Weissela viridescens* e *Lactobacillus sakei*) em cultura pura e mista, sob condições isotérmicas e não-isotérmicas de cultivo, em MRS. Martins (2015) utilizou um modelo não isotérmico para prever o crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo e Silva (2015) estudou o crescimento de cultura pura de *W. viridescens* sob condições não isotérmicas em presunto comercial fatiado embalado a vácuo. O autor avaliou a capacidade preditiva do modelo matemático de descrever esse crescimento utilizando parâmetros obtidos em meio de cultivo sob condições isotérmicas.

Diante dessas informações, a modelagem do crescimento da flora natural de bactérias ácido lácticas sob condições isotérmicas e não isotérmicas e a avaliação do efeito do óleo essencial como agente antimicrobiano em presunto fatiado e embalado a vácuo é de fundamental importância para a determinação da vida útil deste produto em condições reais de armazenamento.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi modelar o efeito da utilização de óleo essencial de orégano (OEO) sobre a vida útil de presunto fatiado embalado a vácuo em condições isotérmicas e não isotérmicas, com base no crescimento da flora natural de bactérias ácido lácticas (BAL).

1.1.2 Objetivos específicos

Para atingir este objetivo geral, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Realizar a caracterização físico-química do presunto utilizado quanto ao pH, atividade de água e concentração de cloreto de sódio;
- Modelar as curvas de crescimento isotérmico da flora natural de BAL em presunto, em diferentes perfis de temperaturas (6, 12, 15, 20 e 25 °C), com e sem a adição de (OEO) na concentração de 0,4% (v/m de OEO);
- Verificar o efeito do (OEO) sobre o crescimento da flora natural de BAL em presunto;
- Definir os modelos secundários para descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento obtidos pelo modelo primário de Baranyi e Roberts;
- Estabelecer e validar modelo não isotérmico obtido com flora natural de BAL;
- Comparar a capacidade preditiva dos modelos obtidos usando culturas de BAL puras com o modelo usando flora natural.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

As bactérias ácido lácticas (BAL) são amplamente encontradas na natureza e capazes de se desenvolverem sob diferentes condições ambientais. Essas bactérias formam um grupo filogeneticamente muito heterogêneo, geralmente tendo seu estado reconhecido como seguro (GRAS- *generally recognized as safe*) (BURGAIN et al., 2014).

As bactérias pertencentes a este grupo têm numerosas aplicações na indústria de alimentos, especialmente no setor dos produtos lácteos (BURGAIN et al., 2014), e têm recebido atenção considerável por seu grande potencial na biopreservação. As BAL produzem uma série de mecanismos, que restringem o desenvolvimento das populações bacterianas e podem agir como concorrentes ou inibidores de outros microrganismos deteriorantes (GHANBARI et al., 2013). Seu antagonismo e propriedades inibidoras baseiam-se em diferentes atividades, dentre elas, a competição por nutrientes e a produção de um ou mais metabolitos antimicrobianos, tais como ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido acético), peróxido de hidrogênio, e os peptídeos antimicrobianos, como as bacteriocinas (GHANBARI et al., 2013; GHANBARI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014). No entanto, as BAL também são associadas à deterioração de peixes, carnes, produtos cárneos embalados a vácuo ou atmosfera modificada e armazenados a temperaturas de refrigeração (BORCH et al., 1996; SANTOS et al., 2005; RUSSO et al., 2006; NYCHAS et al., 2008; AUDENAERT et al., 2010; KALSCHNE et al., 2015).

Embora o grupo das bactérias ácido lácticas não tenha seus limites bem definidos, todos os membros desse grupo apresentam a mesma característica de produzir ácido láctico a partir de hexoses (JAY, 2005). A definição mais comumente encontrada diz que as BAL são bactérias Gram positivas, não tem motilidade, podem ser cocos ou bacilos não esporulados, catalase negativa, desprovidas de citocromos, que crescem sob condições microaerófilas e condições anaeróbias, ácido tolerantes, fastidiosas, que exigem substratos complexos (PACK et al., 1998; ADAMBERG et al., 2003; BURGAIN et al., 2014). Segundo Jay (2005) as BAL são também classificadas quanto aos produtos finais do metabolismo da glicose em dois grupos: homofermentativas e heterofermentativas. As bactérias homofermentativas produzem ácido láctico como único ou principal produto da fermentação da glicose. As heterofermentativas produzem outros produtos além de ácido láctico, que incluem dióxido de carbono, ácido acético e etanol.

De acordo com a classificação adotada por Jay (2005) o grupo das BALs é composto por 15 gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Microbacterium* e *Propionibacterium*.

2.2 ALTERAÇÕES EM PRODUTOS CARNEOS

A carne é um produto alimentar perecível que, senão armazenado, processado, embalado e distribuído corretamente, torna-se altamente suscetível à deterioração microbiana (MCDONALD; SUN, 1999). Fatores intrínsecos como: i) alta atividade de água ($aw > 0,99$); ii) pH correspondente ao intervalo ótimo para o crescimento microbiano (5,5-6,5); iii) disponibilidade de nutrientes, vitaminas e minerais, contribuem para o uma rápida deterioração desses produtos (POTHAKOS et al., 2015; STAHL et al., 2015).

Produtos alimentares refrigerados prontos para o consumo (presunto, peito peru e peito de frango) são economicamente importantes e atualmente, há uma crescente demanda do mercado consumidor (AUDENAERT et al., 2010). A vida útil destes produtos é limitada principalmente devido à deterioração. As contaminações ocorrem porque as manipulações, como corte e embalagem inevitavelmente reintroduzem microrganismos após o processo de cozimento (VERCAMMEN et al., 2011; STAHL et al., 2015).

As bactérias ácido lácticas são o principal grupo de bactérias associadas com a deterioração de produtos de carne cozidos e embalados a vácuo mantidos sob refrigeração, incluindo presunto. As condições de microaerofilia, alta atividade de água (normalmente entre 0,96 e 0,98) e pH em torno 6,0 são algumas das características que favorecem o crescimento de bactérias ácido lácticas (RUSSO et al., 2006; SLONGO et al., 2009; AUDENAERT et al., 2010; DUSKOVÁ et al., 2016).

A deterioração causada por estas bactérias inclui alguns efeitos indesejáveis, como sabores estranhos, produção de gás, diminuição do pH, descoloração e / ou cor esverdeada e produção de limo, resultando em degradação prematura e redução na vida útil do produto final (BORCH et al., 1996; CAYRÉ et al., 2003; AUDENAERT et al., 2010; KALSCHNE et al., 2015). A produção de muco viscoso em produtos à base de carne cozida embalada a vácuo tem sido atribuída a *Lactobacillus* spp. *Leuconostoc* spp. (Hu et al., 2009).

As bactérias predominantemente associadas à deterioração de carnes e produtos cárneos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada são

composta por *Lactobacillus* spp. geralmente *L. plantarum*, *L. sakei* e *L. curvatus*, *Leuconostoc* spp. como *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc carnosum* e *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella* [*Lactobacillus*] *viridescens*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium maltaromicus* e *Brochothrix thermosphacta* (BORCH et al., 1996; SAMELIS et al., 2000; AMMOR et al., 2005; VASILOPOULOS et al., 2010; VERMEIREN et al., 2004).

Vários autores identificaram as BAL como principais contaminantes de carnes e produtos cárneos. Ao analisarem uma pequena instalação de produção de salsichas Ammor et al. (2005) identificaram *L. sakei*, *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecium*, *Lactococcus garvieae*, *Vagococcus carniphilus* e *L. mesenteroides*. Audenaert et al. (2010) analisaram através de testes moleculares a diversidade de bactérias ácido lácticas presentes em três diferentes produtos cárneos fatiados e embalados a vácuo (presunto, peito de peru e peito de frango) e encontraram uma flora predominante de BAL (*L. sakei* e / ou *L. fuchuensis*, *L. curvatus*, *C. divergens*, *Leuconostoc* spp *L. carnosum*, *Leuconostoc mesenteroides*). Hu et al. (2009) identificaram as bactérias ácido lácticas presentes em presunto fatiado e embalado a vácuo armazenado a 4 °C em diferentes tempos de armazenamento, as principais cepas encontradas foram *L. sakei* e *L. curvatus*, *Leuconostoc* spp, *Leuconostoc mesenteroides*. A legislação brasileira não estabelece um limite para a concentração de flora deteriorante, mas muitos autores (Slongo et al., 2009; Kreyenschmidt et al., 2010; Karabagias et al., 2011) utilizam o critério definido por ICMFS (1986) que estipula a concentração de 10^7 UFC/g ou $16,12 [\text{Ln}(\text{UFC/g})]$ para a contagem de microrganismos totais como critério para determinação da vida útil.

2.3 ANTIMICROBIANOS NATURAIS (ÓLEOS ESSENCIAIS)

Devido às novas tendências do mercado consumidor por refeições “saudáveis”, minimamente processadas e livres de conservantes químicos convencionais, o uso de embalagens ativas, novas tecnologias de processamento e agentes antimicrobianos "naturais", tais como óleos essenciais, têm aumentado (KARABAGIAS et al., 2011; PETROU et al., 2012).

Óleos essenciais (OE) são conhecidos por suas propriedades bactericidas, viricida, fungicida e propriedades medicinais sendo usados na preservação de alimentos e como antimicrobianos, analgésico, sedativos, anti-inflamatórios, anestésicos locais e remédios espasmolíticos (BURT, 2004; NTZIMANI et al., 2010).

De acordo com Bakkali et al. (2008), os óleos essenciais são compostos naturais voláteis complexos, caracterizados por um forte odor e formados por metabólitos secundários de plantas aromáticas. Eles podem ser sintetizados por diferentes partes das plantas (botões, flores, folhas, caules, ramos, sementes, frutas, raízes) e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Os óleos essenciais podem ser extraídos por uma variedade de métodos, sendo a destilação a vapor o mais empregado na indústria.

A composição dos OE pode variar em qualidade, quantidade e composição de acordo com o clima, composição do solo, localização geográfica, órgão da planta, idade e fase do ciclo vegetativo. Os óleos essenciais são misturas naturais muito complexas, que podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações muito diferentes. Eles são caracterizados por dois ou três componentes principais em concentrações bastante elevadas (20-70%) e traços de outras moléculas. Geralmente, esses componentes principais determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (BURT, 2004; BAGAMBOULA et al., 2004; BAKKALI et al., 2008).

A ação antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser atribuída ao elevado teor de compostos terpênicos (α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol, mentol, linalol) ou compostos fenólicos como carvacol, eugenol e timol (BURT, 2004; BAGAMBOULA et al., 2004; BAKKALI et al., 2008; MARTUCCI et al., 2015).

Os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais foram estudados para uma vasta gama de microrganismos ao longo dos anos, mas seus mecanismos de ação ainda não são completamente compreendidos (CALO et al., 2015). Vários autores propuseram que a ação antimicrobiana dos OE pode ser atribuída à sua capacidade de penetrar através das membranas para o interior das células e alterar a permeabilidade das membranas (ZINOVIADOU et al., 2009; BAJPAI et al., 2012; CALO et al., 2015). Os compostos fenólicos podem atuar rompendo a membrana celular, resultando na inibição das propriedades funcionais da célula e, eventualmente, causar a fuga dos conteúdos internos das células (BURT, 2004). Este rompimento leva a alterações na permeabilidade da célula microbiana, a danos à membrana citoplasmática, ao sistema de geração de energia, e força motriz de prótons. A permeabilidade perturbada da membrana citoplasmática pode resultar em morte celular (BURT, 2004; BAJPAI et al., 2012; CALO et al., 2015).

2.3.1 Óleo essencial de orégano

O óleo essencial de orégano é extraído da *Origanum vulgare* L., erva pertencente à família *Lamiacea*, que possui uma grande variedade de espécies, destacando-se a *Origanum vulgare*, a *Origanum marjoram*, e a *Origanum dictamnus* entre as mais importantes (LEE et al., 2016).

Dentre os óleos essenciais, o óleo essencial de orégano tem sido apontado por ser um dos mais eficazes na atuação como agente antimicrobiano, que pode ser atribuído à presença de compostos fenólicos em sua composição, particularmente timol e carvacol (EMIROĞLU et al., 2010; AGUIRRE et al., 2013). As suas propriedades antimicrobianas têm sido demonstradas em diversos estudos (TSIGARIDA et al., 2000; GOULAS; KONTOMINAS, 2007; ZINOVIADOU et al., 2009; FRANGOS et al., 2010; HASAPIDOU; SAVVAIDIS, 2011; BOSKOVIC et al., 2015).

O óleo essencial de orégano (OEO) tem atividade antimicrobiana contra diversas bactérias gram-positivas, gram-negativas, leveduras e fungos. A alta atividade antimicrobiana do OEO é devido à sua grande concentração de monoterpêneos e compostos oxigenados, como carvacrol, timol, ρ -cimeno e γ -terpineno (LIOLIOS et al., 2009). Benavides et al., (2012) analisaram o efeito antimicrobiano de filmes de alginato incorporados com OEO e observaram que estes eram mais eficazes contra as bactérias Gram-positivas do que contra as bactérias gram-negativas.

Muitos trabalhos têm utilizado o OEO como agente microbiano contra microrganismos deteriorantes e patogênicos em carnes e produtos derivados. Frangos et al. (2010) analisaram o efeito antimicrobiano da adição de sal e OEO na contagem de microrganismos totais, BAL, *Pseudomonas* spp. e *Enterobacteriaceae* em filés de trutas refrigerados e embalados a vácuo e observaram uma extensão da vida útil do produto em 8 dias (solução salina (10%NaCl), OEO (0,2% (v/m))) e em 14 dias (solução salina (10%NaCl), OEO (0,4% (v/m))).

Petrou et al. (2009) avaliaram o efeito do OEO (0,25% v/m) aplicado em peito de frangos embalados em atmosfera modificada (AM) e observaram redução de um 1 Log(UFC/g) em relação ao controle e extensão de 6 dias na vida útil do produto. Ao avaliar o efeito da utilização do OE como agente antimicrobiano na extensão da vida útil de mexilhões Costa (2013) avaliou duas diferentes concentrações de OEO (0,2 e 0,4% v/m) e obteve melhores resultados utilizando uma concentração de 0,4% (v/m de OEO).

2.4 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A microbiologia preditiva é uma ferramenta importante para descrever a vida útil dos alimentos (KOUTSOUMANIS e NYCHAS, 2000; MATARAGAS et al., 2006). Um modelo preditivo é uma expressão matemática que descreve a dinâmica (crescimento e inativação) das populações de microrganismos submetidos às complexas alterações físicas, químicas e biológicas no ambiente durante processamento, transporte, distribuição e armazenamento de alimentos (GEERAERD et al., 2004; LERBET e LEBERT, 2006; HUANG, 2014).

O uso de modelos matemáticos na microbiologia de alimentos começou em aproximadamente 1920, com o desenvolvimento de métodos para calcular o tempo de destruição térmica de microrganismos. No entanto, foi a partir da década de 1980 que os modelos matemáticos para prever o comportamento dos microrganismos experimentaram um grande desenvolvimento (NAKASHIMA et al., 2000; CARRASCO et al., 2012).

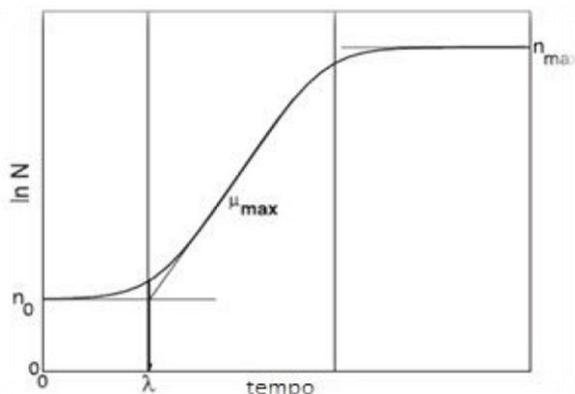
Os modelos matemáticos utilizados em microbiologia preditiva podem ser classificados em modelos primários, secundários e terciários. Os modelos primários descrevem as mudanças na população microbiana em função do tempo, sob um único conjunto de condições constantes. Os modelos secundários descrevem as respostas de um ou mais parâmetros de um modelo de primário a uma ou mais condições ambientais (HUANG, 2014).

Segundo a modelagem está voltada para a obtenção de modelos dinâmicos, ou seja, modelos que permitam prever a segurança ou a vida útil dos alimentos sob condições que variam com o tempo, principalmente condições não isotérmicas (CORRADINI et al., 2006).

2.4.1 Modelos Primários de Crescimento

Os modelos primários descrevem as alterações na população microbiana ou nas respostas microbianas em função do tempo para um determinado conjunto de condições ambientais. Normalmente, o crescimento microbiano pode ser descrito por uma curva sigmoide (Figura 1) com três fases: uma fase de latência, em que as células microbianas adaptam-se ao novo ambiente, seguido por uma fase em que as células se multiplicam de forma exponencial e, finalmente, uma fase estacionária durante a qual a população máxima é atingida (LERBET e LEBERT, 2006).

Figura 1 - Curva de crescimento. λ (fase lag), $\mu_{\text{máx}}$ (taxa máxima específica de crescimento), n_0 (concentração celular inicial) e $n_{\text{máx}}$ (concentração celular máxima).



Fonte: Swinnen et al. (2004).

Modelos do tipo sigmoide, como Gompertz modificado e modelos logísticos são frequentemente utilizados para ajustes aos dados de crescimento microbiano. O modelo de Baranyi e Roberts é amplamente utilizado entre os investigadores e vários estudos relataram que o mesmo apresenta melhor desempenho que o modelo de Gompertz modificado e modelos logísticos (JUNEJA et al., 2007).

O modelo de Baranyi e Roberts é um dos modelos primários de crescimento mais utilizados na microbiologia preditiva por algumas das razões: (i) é fácil de usar por ter *softwares* disponíveis em que as equações já estão inseridas, (ii) é aplicável em condições ambientais dinâmicas, (iii) tem uma boa capacidade de ajuste, e (iv) a maior parte dos parâmetros do modelo são biologicamente interpretáveis (VAN IMPE et al., 2005; LERBET e LEBERT, 2006). Neste trabalho, foi utilizado o modelo primário de Baranyi e Roberts para obtenção dos parâmetros de crescimento como descrito pelas equações (2.1 e 2.2).

A Equação 2.1 descreve o modelo de Baranyi e Roberts (BARANYI; ROBERTS, 1994) e na Equação 2.2 está representada a função de ajuste deste modelo.

$$\ln(N) = \ln(N_0) + \mu F(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu F(t)} - 1}{e^{m(\ln(N_{\text{máx}}/N_0))}} \right) \quad (2.1)$$

$$F(t) = t + \frac{1}{\mu} \ln \left(e^{(-\mu t)} + e^{(-h_0)} - e^{[(-\mu t) - h_0]} \right) \quad (2.2)$$

em que N é a concentração celular no tempo t , N_0 é a concentração celular inicial, $N_{\text{máx}}$ ($y_{\text{máx}}$) é concentração celular máxima, m é o parâmetro de curvatura do modelo e o parâmetro h_0 é considerado o estado fisiológico das células e é dado pela Equação 2.3:

$$h_0 = \mu \lambda \quad (2.3)$$

2.4.2 Modelos Secundários

Modelos secundários descrevem a dependência dos parâmetros do modelo primário com a temperatura, mas podem descrever a dependência em relação a outros fatores como a atividade da água, pH, concentração de sal, dentre outros. Qualquer modelo que descreva de forma satisfatória essa relação pode ser classificado como modelo secundário. O modelo secundário mais amplamente reconhecido em relação ao crescimento microbiano é o modelo da raiz quadrada (equação 2.4), também conhecido como modelo de Bélerádek proposto por Ratkowsky et al. (1982) (CORRADINI; PELEG, 2005).

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\text{min}}) \quad (2.4)$$

em que: k é o parâmetro de interesse (λ , μ e $y_{\text{máx}}$), T é a temperatura ($^{\circ}\text{C}$), T_{min} é a temperatura mínima para o crescimento ou coeficiente do modelo e a e b são coeficientes do modelo.

Além dos modelos da raiz quadrada, outros modelos empíricos podem ser utilizados para descrever a variação dos parâmetros dos modelos primários com a temperatura e outros fatores como atividade de água, pH, concentração de sal, etc (CORRADINI et al., 2006). Alguns modelos empíricos utilizados são: modelo linear Equação 2.5, modelo exponencial Equação 2.6.

$$k = b + rT \quad (2.5)$$

$$k = a * e^{(bT)} \quad (2.6)$$

em que: k é o parâmetro de interesse (λ , μ e $y_{\text{máx}}$), T é a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e a , b e r são coeficientes do modelo.

2.4.3 Modelo Não Isotérmico

A temperatura é um fator que pode variar muito dentro da cadeia de produção e distribuição de produtos alimentares (LONGHI et al., 2013). A variação de temperatura altera a dinâmica de crescimento microbiano durante o armazenamento de alimentos e o uso de modelos matemáticos que levam em conta estas variações pode ser muito importante para prever a vida útil de alimentos (VAN IMPE et al., 1992; BARANYI, 1995; GOSPAVIC et al., 2008).

A maioria dos modelos é desenvolvida e validada sob condições de temperatura constante. Na prática, no entanto, as flutuações de temperatura podem ser frequentes durante o armazenamento e distribuição de alimentos. Assim, a validação dos modelos em condições de temperatura dinâmicas é de grande importância para a avaliação do desempenho de modelos para previsão da vida útil, sob condições reais da cadeia do frio (NYCHAS et al., 2008).

Para a modelagem do crescimento microbiano em condições ambientais variáveis os modelos são utilizados como equações diferenciais de primeira ordem, sendo que os parâmetros destas equações tornam-se funções das variações ambientais, dadas por modelos secundários apropriados (LONGHI 2013).

Koutsoumanis et al., (2006) utilizaram o modelo dinâmico de Barany e Roberts para prever a deterioração por *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta* *Enterobacteriaceae* e bactérias ácido lácticas em carne moída bovina e suína, sob variação de temperatura e de pH. O modelo de Baranyi e Roberts foi utilizado como modelo primário para a estimativa dos parâmetros de crescimento e o modelo modificado de Arrhenius foi usado para descrever o efeito do pH e das temperaturas de armazenamento sobre os parâmetros cinéticos.

Lytou et al., (2016) desenvolveram um modelo preditivo para descrever a cinética de crescimento da população microbiana aeróbia sobre filés de frango marinado em suco de romã sob condições isotérmicas e não isotérmicas. A estimativa dos parâmetros primários foi feita através do modelo primário de Baranyi e Roberts, e a influência da temperatura sob o crescimento microbiano foi descrita pelo modelo secundário da raiz quadrada. O modelo foi validado em condições dinâmicas através do modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts.

Um dos modelos isotérmicos mais utilizados é o modelo de Baranyi e Roberts (1994), na forma diferencial (seção 3.5.3).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO PRESUNTO

Foram realizadas análises de pH, atividade de água (aw) e concentração de cloretos (para posterior cálculo da concentração de cloreto de sódio) em cada peça de presunto utilizada, com o objetivo de caracterizar o produto utilizado.

Para as análises de atividade de água, aproximadamente 2,5 g de amostra levemente triturada de cada peça de presunto foram colocadas em recipiente para leitura de atividade de água. A leitura da atividade de água de cada amostra foi realizada em medidor de atividade de água (marca Aqualab, modelo SERIES 3T3) previamente calibrado, com resolução de 0,001.

O pH foi medido em três diferentes partes de cada amostra de presunto, utilizando-se um pHmetro para sólidos (TESTO, modelo 205) previamente calibrado, com resolução de 0,01.

A concentração de cloreto de sódio (NaCl) no presunto foi determinada mediante a análise total de cloretos e conversão em cloreto de sódio, segundo a metodologia proposta por ALIÑO et al., (2011). Para determinar a concentração de cloretos totais, foram homogeneizadas 2 g de cada amostra previamente triturada com água destilada em homogeneizador Ultra Turrax (IKA, modelo T25 Digital) a 20.000 rpm durante um minuto. A solução obtida foi transferida para um balão volumétrico, sendo o volume de 100 ml completado com água destilada. Essa solução foi centrifugada (Centrífuga Sigma, modelo 4k15) a 9.000 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 0,5 ml de sobrenadante foi analisada em um analisador automático de cloretos (Cole Parmer, modelo 926), previamente calibrado. Os resultados foram expressos em miligramas de Cl por litro de solução, sendo a resolução do equipamento de 1 [mg/L]. A partir desse valor, foi calculada a concentração de NaCl na amostra de acordo com a Equação 3.1.

$$x_{\text{NaCl}} = \left(\frac{C_{\text{Cl}} V}{m} \right) \left(\frac{M_{\text{NaCl}}}{M_{\text{Cl}}} \right) 100 \quad (3.1)$$

Em que:

x_{NaCl} = concentração de cloreto de sódio (g NaCl/100g presunto)

C_{Cl} = leitura do equipamento (g Cl/L de solução)

V = volume da solução (amostra + água destilada) (L)

m = massa da amostra (g)

M_{NaCl} = massa molar do cloreto de sódio (58,44 g/mol)

M_{Cl} = massa molar do cloreto (35,45 g/mol)

3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de presunto utilizadas durante os experimentos eram da marca Seara (Presunto Seara Cozido, sem capa de gordura), todas as peças foram adquiridas no comércio local, optando sempre por peças com data de produção inferior a 30 dias e armazenadas a 4 °C. As peças foram fatiadas utilizando um fatiador de frios (Metvisa, modelo CFIE 250), com espessura ajustada em 1,5 mm, em uma câmara de fluxo (Figura 2). O fatiador e a câmara de fluxo foram previamente higienizados com álcool 70% (v/v) e submetidos à luz UV por 30 minutos.

Figura 2 - Processo de fatiamento das amostras de presunto.



Fonte : Menezes, 2016.

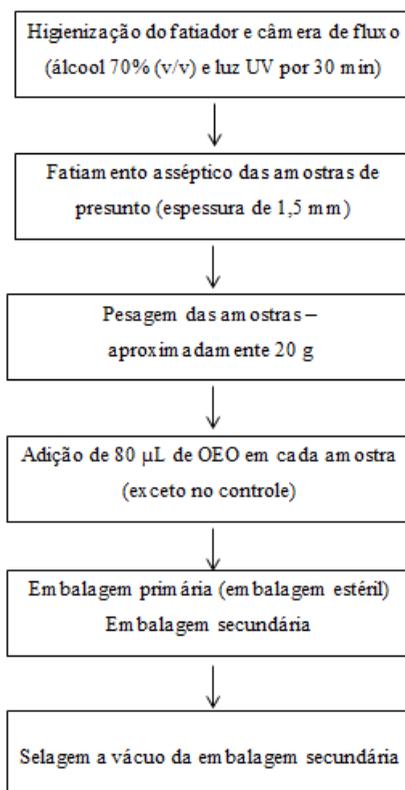
Após o fatiamento, as amostras foram divididas em dois grupos, um grupo controle e outro grupo no qual foi adicionado óleo essencial de orégano (OEO). O óleo essencial de orégano, utilizado nos experimentos, foi adquirido na comercial Inter-link LTDA, localizada em Jandira – SP e sua composição química, descrita no Anexo 1, foi determinada por Costa (2013). O óleo essencial de orégano foi aplicado uniformemente na superfície das amostras utilizando uma micropipeta. 80 μ L de OEO foram adicionados em cada amostra contendo 20 g de presunto, resultando em uma concentração de 0,4% (mL/g de OEO).

Cada amostra foi acondicionada em duas embalagens, a embalagem primária (em contato direto com o presunto) foi uma embalagem plástica estéril de homogeneização com capacidade para 384 ml, a qual foi dobrada

e armazenada dentro da embalagem secundária para alimentos refrigerados. A embalagem secundária foi, então, selada a vácuo (Selovac, modelo 200b) e as amostras foram submetidas a diferentes condições de temperatura de armazenamento, que estão descritas no item (3.3).

O fluxograma da Figura 3, mostra de forma simplificada, a metodologia do preparo das amostras de presunto fatiado com a adição de OEO.

Figura 3 - Fluxograma do preparo das amostras de presunto fatiado com a adição de OEO.



Fonte: Menezes, 2016.

3.3 CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E ARMAZEMAMENTO DAS AMOSTRAS

Após a selagem, as amostras de presunto foram incubadas em estufa incubadora (B.O.D), sendo a temperatura no ambiente interno da estufa registrada em *datalogger* (Testo 174, Lenzkirch, Alemanha), previamente calibrado (com resolução de 0,1 °C), a cada dez minutos.

O crescimento da flora natural em presunto fatiado embalado a vácuo com e sem o tratamento com óleo essencial de orégano (OEO), foi avaliado em cinco condições isotérmicas, nas temperaturas de 6, 12, 15, 20 e 25 °C, e em duas condições não isotérmicas NI-1 e NI-2(12-16-20-25 °C). As variações de temperatura selecionadas procuraram simular falhas na refrigeração do presunto ao longo do armazenamento e distribuição e a influência dessa variação sobre a vida útil do produto.

3.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Utilizando técnicas assépticas, em cada ponto experimental avaliado, retirou-se uma amostra de presunto controle (sem adição de OEO) e com adição de OEO para determinação da concentração celular. Como as amostras de presunto foram acondicionadas em embalagens de homogeneização, a água peptonada 0,1% (p/v) esterilizada foi adicionada diretamente à embalagem primária, na proporção 9:1 (volume de água peptonada (mL)/massa de presunto (g)), obtendo-se a diluição 1:10 (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, que variaram com o tempo e as condições de armazenamento. Os tubos de ensaio com cada diluição foram agitados em agitador de tubos tipo Vortex (Marca BIOMIXER, Modelo VTX-F).

Para contagem de bactérias lácticas, semeou-se 1 mL de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis (técnica *pour plate*), adicionando-se, posteriormente, 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, as placas receberam uma camada extra de Ágar MRS, para

garantir a microaerofilia adequada para BAL. As placas foram incubadas invertidas em estufa a 30 °C por 48 horas.

As diluições foram plaqueadas em função do nível estimado de contaminação, de modo a se obter placas com contagens entre 25 a 250 unidades formadoras de colônias (UFC). Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama da amostra.

3.5 MODELAGEM MATEMÁTICA DAS CURVAS DE CRESCIMENTO MICROBIANO

3.5.1 Modelo Primário de Crescimento

A partir dos dados de crescimento da flora natural das amostras de presunto cozido fatiado e embalado a vácuo com e sem a adição de OEO armazenados em diferentes temperaturas (6, 12, 15, 20 e 25 °C), o modelo de Baranyi e Roberts descrito pela Equação 2.1 foi ajustado aos dados experimentais para a estimativa dos parâmetros de crescimento: duração da fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e população máxima atingida ($y_{\text{máx}}$). O ajuste foi realizado no *software* MATLAB R2013a (The MathWorks Inc®, Natick, USA) utilizando o algoritmo desenvolvido por Longhi (2012). Para a obtenção de melhores ajustes do modelo aos dados, a estimativa foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, a estimativa dos parâmetros ($\mu_{\text{máx}}$, λ , $y_{\text{máx}}$ e h_0 ($h_0 = \mu_{\text{máx}} * \lambda$)) foi realizada pelo ajuste do modelo aos dados experimentais. O parâmetro h_0 foi fixado como a média aritmética dos valores obtidos para todas as temperaturas no primeiro ajuste e, em uma segunda etapa, os parâmetros λ , $\mu_{\text{máx}}$ e $y_{\text{máx}}$ foram estimados pelo novo ajuste.

3.5.2 Modelos Secundários

Após a obtenção do parâmetro primário de crescimento $\mu_{\text{máx}}$, dois modelos secundários foram comparados, e o melhor modelo foi utilizado para descrever a influência da temperatura sobre este parâmetro. Os valores de $\mu_{\text{máx}}$ foram obtidos às temperaturas isotérmicas de 6, 12, 15, 20 e 25 °C. Na tabela 1 são apresentadas as equações dos modelos secundários utilizados. Os modelos foram ajustados com auxílio do *software* Excel (Microsoft®).

Tabela 1- Modelos secundários usados para descrever a influência da temperatura no parâmetro velocidade específica máxima de crescimento.

Modelos Secundários	Equações
Raiz Quadrada	$k^{1/2} = b (T - T_{\text{mim}})$
Exponencial	$k = a \exp(bT)$

em que: k é o parâmetro de interesse ($\mu_{\text{máx}}$), T é a temperatura ($^{\circ}\text{C}$), T_{mim} é a temperatura mínima para o crescimento ou coeficiente do modelo e a e b são coeficientes do modelo.

As médias para o parâmetro da população máxima atingida $y_{\text{máx}}$ [ln (UFC/g)] foram utilizadas como modelo secundário.

3.5.3 Predições do Modelo Não Isotérmico

O modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts na sua forma diferencial (Equações 3.2 e 3.3) foi utilizado para a predição do crescimento da flora natural nas condições não isotérmicas avaliadas, com as respectivas condições iniciais (Equações 3.2, 3.4, 3.5 e 3.6):

$$\frac{d(\ln(N(t)))}{dt} = \mu_{\text{máx}} \left[\frac{1}{1 + e^{-Q(t)}} \right] \left[1 - \exp(\ln(N(t)) - \ln(y_{\text{máx}})) \right] \quad (3.2)$$

$$\frac{d(\ln(q(t)))}{dt} = \mu_{\text{máx}} \quad (3.3)$$

$$\ln(q(t=0)) = \ln(q_0) \quad (3.4)$$

$$\ln(N(t=0)) = \ln(N_0) \quad (3.5)$$

$$\ln(q_0) = -\ln(\exp(h_0) - 1) \quad (3.6)$$

3.5.4 Comparação da capacidade preditiva do modelo obtido para flora natural com o modelo para cultura pura de BAL

O modelo não isotérmico obtido neste trabalho foi comparado ao modelo não isotérmico de crescimento da bactéria ácido láctica *W. viridescens*, descrito por Martins (2015), a partir dos dados experimentais de Camargo (2015). Martins (2015) usou o modelo não isotérmico de

Baranyi e Roberts (Equações 3.2 e 3.3) , inserindo o valor de $h_0=0,0629$ e modelo secundário para $\mu_{\text{máx}}$, apresentado na equação 3.7.

$$\mu_{\text{máx}} = 0,0217 * \exp(0,134 * T) \quad (3.7)$$

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A avaliação da capacidade preditiva dos modelos primários, secundários e não isotérmicos em descrever os dados experimentais foi analisada através dos índices estatísticos: coeficiente de determinação (R^2), raiz do erro médio quadrático (RMSE), fator bias e fator exatidão (ROSS, 1996).

As equações utilizadas para calcular os índices estatísticos são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Índices estatísticos utilizados para comparação e validação dos modelos.

Índices Estatísticos	Equações
R^2	$R^2 = \frac{\sum_i (\hat{y}_{ij} - \bar{y})^2}{(\sum_i (y_{ij} - \bar{y})^2)} = \frac{SQRL}{SQTc}$
RMSE	$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (\text{valor}_{\text{observado}} - \text{valor}_{\text{predito}})^2}{n - p}}$
Fator bias	$\text{fator bias} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{valor}_{\text{predito}}/\text{valor}_{\text{observado}})}{n}\right)}$
Fator exatidão	$\text{fator exatidão} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{valor}_{\text{predito}}/\text{valor}_{\text{observado}}) }{n}\right)}$

em que n é o número de dados experimentais, p é o número de parâmetros do modelo.

O coeficiente de determinação (R^2) fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas.

Quanto menor o valor do RMSE melhor é o desempenho do modelo analisado.

O fator bias é uma estimativa para avaliar a diferença média entre os valores observados e preditos. Fator bias igual a 1 significa que o valor observado é exatamente igual ao predito. No entanto, quando bias maior 1, o valor predito é maior que o observado e indica que o modelo falha de forma segura (*fail-safe*), enquanto fator bias menor 1, significa que o predito é menor que o observado e que o modelo falha de forma perigosa (*fail-dangerous*) (LONGHI et al., 2013).

O fator exatidão é a medida da diferença média absoluta entre os valores preditos e observados, por se tratar de valores absolutos é sempre maior ou igual a 1, sendo que quanto maior o seu valor, menos precisa a estimativa da média.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PRESUNTO

Os resultados das médias das análises de pH, aw e concentração de cloreto de sódio, realizados para a caracterização do presunto, são apresentados na Tabela (3). As análises foram realizadas em triplicata para cada peça de presunto utilizada nos experimentos.

Tabela 3 - Valores de média e desvio padrão das análises realizadas em presunto.

Análise	Média	Desvio Padrão
pH	6,22	±0,04
Atividade de água	0,970	±0,001
NaCl (% massa)	2,88	±0,57

Lloret et al. (2016) encontraram valores de aw de 0,98 e Garrido et al. (2010) analisaram presunto fatiado em diversas temperaturas de armazenamento e encontraram valores em torno de 0,95 e 0,961. Kalschne et al. (2014) e Stekelenburg e Kant-muermans (2001) encontraram valores de aw de (0,97) para o presunto cozido. O valor de atividade de água para o presente trabalho (0,97) encontra-se de acordo com os valores citados na literatura.

O valor de pH para o presunto encontrado de 6,22 está dentro de uma faixa de valores citados por diversos autores. Stekelenburg e Kant-muermans (2001) encontraram valores de pH em torno de 6,2. Garrido et al. (2010) encontrou valores de pH entre 6,19 e 6,73. Holley (1997) afirma que, para a garantia da qualidade sensorial, o pH do presunto deve apresentar-se maior que 6,0.

Segundo Bressan et al. (2007), os produtos cárneos fatiados, de modo geral, apresentam teores de sal entre 2 a 4%. A concentração de NaCl em amostras comerciais de presunto pode variar com a empresa fabricante e o lote de fabricação. A concentração de cloreto de sódio no presunto analisado foi em torno de 2,88.

Pode-se afirmar, com base nos resultados obtidos das análises, que as amostras de presunto utilizadas apresentam características esperadas para este produto.

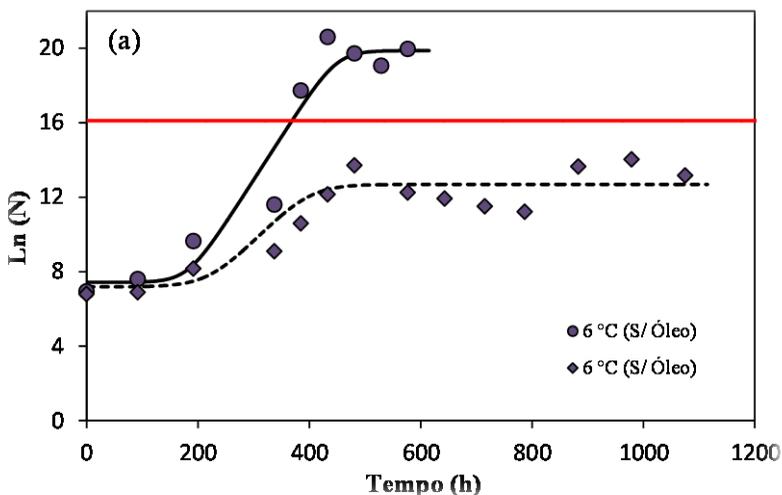
4.2 AJUSTES DO MODELO PRIMÁRIO

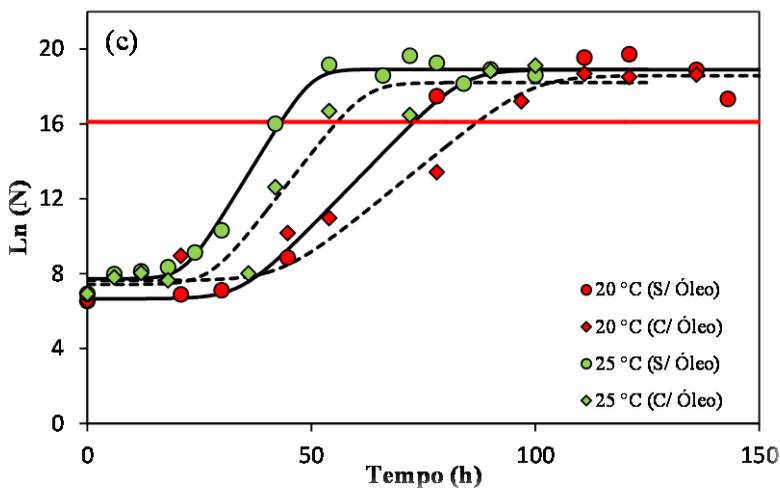
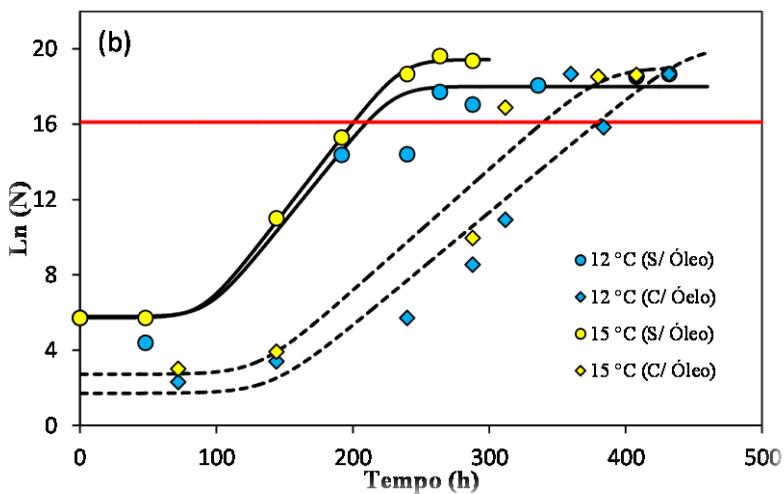
Com relação à estimativa dos parâmetros dos modelos, o valor da média aritmética calculada para o parâmetro h_0 do modelo Barany e

Roberts, na primeira etapa de ajuste, foi de 8,44 (com desvio padrão da média igual a 2,58). Vários autores (Baranyi et al. (1995), Amézquita et al. (2005), Gospavic et al. (2008), Longhi et al. (2013)) sugerem a utilização de uma abordagem média para o parâmetro h_0 a fim de melhorar o desempenho do modelo. De acordo com Baranyi et al. (1995), o valor do parâmetro h_0 depende apenas do estado fisiológico inicial da células. Após a inoculação, este valor deve ser o mesmo para diferentes temperaturas.

As curvas de crescimento da flora natural em presunto fatiado embalado a vácuo em condições isotérmicas nas temperaturas de 6, 12, 15, 20 e 25 °C, ajustadas pelo modelo de Baranyi e Roberts (1994) (equações 2.1 e 2.2), com e sem o tratamento com óleo essencial de orégano são representadas na figura 4. As linhas pretas (contínuas - s/OEO; tracejadas - c/OEO) representam o ajuste do modelo primário. A linha vermelha indica a contagem final que define a vida útil do presunto. A contagem de flora deteriorante acima de 10^7 (UFC/g) equivalente a 7 [Log(UFC/g)] ou 16,12 [Ln(UFC/g)] é considerada o critério para determinação da vida útil (SLONGO et al., 2009; KREYENSCHMIDT et al., 2010; KARABAGIAS et al., 2011).

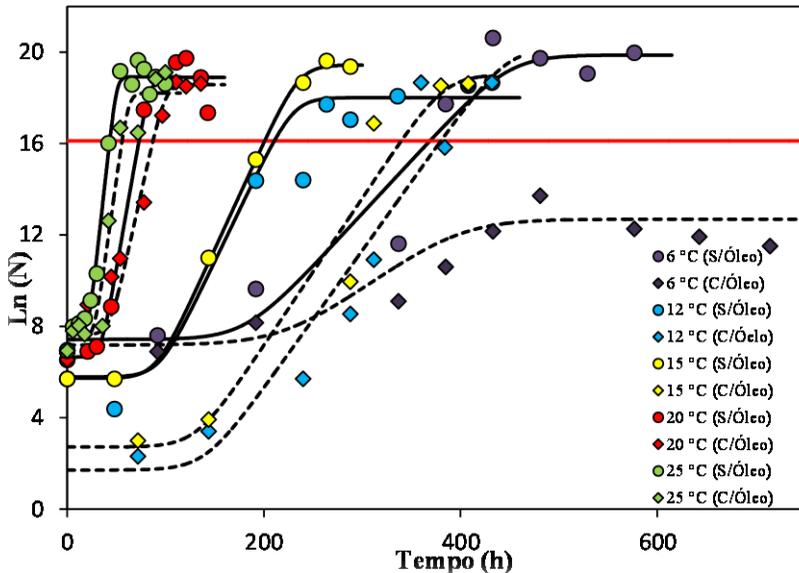
Figura 4 - Curvas de crescimento de flora natural nas temperaturas de 6 °C (a), 12 e 15 °C (b) e 20 e 25 °C (c), com e sem OEO e ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto. As linhas pretas (contínuas - s/OEO; tracejadas - c/OEO) representam o ajuste do modelo primário. A linha vermelha indica a contagem final que define a vida útil do presunto.





A Figura 5 mostra uma visão geral do crescimento da flora natural de BAL nos perfis de 6, 12, 15, 20 e 25 °C.

Figura 5 - Curvas de crescimento de flora natural nas temperaturas de 6, 12, 15, 20 e 25°C, com e sem OEO e ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto. As linhas pretas (contínuas - s/OEO; tracejadas - c/OEO) representam o ajuste do modelo primário. A linha vermelha indica a contagem final que define a vida útil do presunto.



As BAL são anaeróbias facultativas, consideradas a principal causa de deterioração microbiana nos produtos cárneos embalados a vácuo (BORCH et al., 1996; SANTOS et al., 2005; MATARAGAS et al., 2006; HU et al., 2009; KALSCHNE et al., 2015; ZHANG et al., 2015). A média das contagens iniciais para BAL foi de $7,45 \times 10^2$ (UFC/g) (com desvio padrão da média igual a 0,22).

A Figura 4 (a) apresenta os dados e a modelagem do crescimento de flora natural de BAL com e sem OEO para temperatura de 6 °C. Nota-se que o tratamento com óleo foi eficaz na extensão da vida útil do presunto, a aplicação do OEO reduziu a contagem bacteriana em 3,0 ciclos logarítmicos, em relação ao controle. As amostras sem OEO atingiram a concentração de 10^7 (UFC/g) no 15º dia de armazenamento. Em relação às amostras com óleo essencial, as mesmas foram armazenadas a 6 °C por 45 dias e não atingiram concentrações superiores a $9,0 \times 10^5$ UFC/g. Chouriará

et al. (2007) analisaram a influência do uso de OEO nas concentrações de 0,1 e 1% (ml/g) em carne de frango fresca armazenada a 4 °C, com contagens iniciais médias de $5,0 \times 10^3$ (UFC/g) as amostras controle atingiram a contagem de 10^7 (UFC/g) em 9 dias de armazenamento, a utilização de OEO (0,1%) resultou na redução de 1[Log (UFC/g)] durante o mesmo período e a concentração de 1% inibiu completamente o crescimento de BAL até o período de 12 dias e estendeu em 16 dias a vida útil do produto. Ntzimani et al. (2010) observaram uma extensão na vida útil de carne de frango pré-cozida embalada a vácuo e com a adição de OEO (0,2% (ml/g)) de 6 dias em relação ao controle.

Nas temperaturas de 12 e 15 °C (temperaturas de abuso), representadas na Figura 4 (b), o efeito do óleo essencial de orégano foi menor que a 6 °C. As amostras com OEO a 12 °C atingiram a concentração de 10^7 (UFC/g) no 16° dia, 7 dias a mais se comparadas às amostras sem OEO na mesma temperatura. A vida útil do produto à temperatura de 15 °C foi de 14 dias nas amostras com OEO e 8 dias para as amostras sem OEO. Para as temperaturas de 20 e 25 °C (Figura 4 (c)) os resultados obtidos com e sem óleo essencial foram similares. Foi observado que para temperaturas de armazenamento próxima à temperatura ótima de crescimento dos microrganismos o OEO apresentou menor ação antimicrobiana. Costa (2013) avaliou o efeito do tratamento termoquímico (óleo essencial de orégano e calor) e observou que, com o aumento da temperatura de armazenamento, houve uma diminuição da eficiência do tratamento. Comparando o efeito do tratamento com óleo essencial na vida útil do presunto, o mesmo foi mais eficaz quando armazenado dentro do limite de refrigeração, resultado que é de grande interesse, pois o presunto deve ficar armazenado à temperatura de refrigeração.

As Tabelas 4 e 5 apresentam os valores dos parâmetros primários de crescimento de flora natural em presunto a 6, 12, 15, 20 e 25 °C, com e sem OEO, obtidos mediante ajuste demonstrado nas Figuras 4, 5 e 6.

Tabela 4 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto a 6, 12, 15, 20 e 25 °C com óleo essencial de orégano.

Temperatura (°C)	μ (h ⁻¹)	λ (h)	$y_{m\acute{a}x}$	Vida útil (dias)
6	0,03	260,0	12,7	>45*
12	0,06	137,3	20,2	16
15	0,07	128,0	19,0	14
20	0,19	42,4	18,6	3
25	0,31	26,0	18,2	2

* Contagem não atingiu o valor que define o final da vida útil em tempos microbiológicos

Tabela 5 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto a 6, 12, 15, 20 e 25 °C sem óleo essencial de orégano.

Temperatura (°C)	μ (h ⁻¹)	λ (h)	$y_{m\acute{a}x}$	Vida útil (dias)
6	0,05	178,0	20,0	15
12	0,09	92,0	18,0	9
15	0,09	88,0	19,4	8
20	0,25	34,0	19,0	3
25	0,39	21,0	19,0	2

Os parâmetros de crescimento, duração da fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), aumento logarítmico da população microbiana ($y_{m\acute{a}x}$) e o tempo em dias para atingir o final da vida útil foram estimados pelo ajuste do modelo estudado aos dados experimentais, o ajuste foi realizado no *software* MATLAB R2013a (The MathWorks Inc®, Natick, USA) utilizando o algoritmo desenvolvido por Longhi (2012). A estimativa precisa dos parâmetros de crescimento microbiano, particularmente duração da fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), é essencial em muitas áreas da microbiologia, por exemplo, para caracterizar os efeitos antimicrobianos, avaliação da vida útil, para desenvolver modelos cinéticos e usar em fermentação e tecnologia de alimentos (DALGAARD; KOUTSOUMANIS, 2001).

A temperatura de armazenamento apresentou grande influência nos parâmetros fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) e $y_{m\acute{a}x}$. O aumento da temperatura de 6 a 25 °C levou ao aumento da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), variando entre 0,05 a 0,39 h⁻¹ nas amostras sem OEO, e de 0,03 a 0,31 h⁻¹ nas amostras com OEO. Para os valores do parâmetro fase lag (λ), o aumento da temperatura

ocasionou diminuição destes valores, nas amostras sem OEO de 178 para 21 h e nas amostras com OEO de 260 para 26 h.

A utilização do óleo essencial levou a um aumento do λ , uma diminuição do $\mu_{\text{máx}}$ e a um conseqüente aumento da vida útil do presunto em relação às amostras sem OEO. O valor médio de $y_{\text{máx}}$ encontrado no tratamento com OEO e sem tratamento foi de 1×10^8 (UFC/g) (19,0 Ln (UFC/g)) com desvio padrão (0,73 Ln (UFC/g)). Apenas para condição de armazenamento de 6 °C, o tratamento com óleo essencial levou a uma redução no crescimento da população microbiana com valor de $y_{\text{máx}}$ de 9×10^5 (UFC/g) (13,7 [Ln (UFC/g)]). Nas amostras sem OEO, a média dos valores máximos de crescimento microbiano foi de $8,0 \times 10^8 \pm 0,6$ (UFC/g) e outros autores encontram valores próximos ao do presente trabalho. Kreyenschmidt et al. (2010) analisaram a vida útil de presunto fatiado embalado a vácuo e encontrou valores de $y_{\text{máx}}$ entre $6,4 \times 10^7$ e $8,0 \times 10^8$ (UFC/g). Liu et al. (2012) encontraram valores entre $7,0 \times 10^7$ e $8,0 \times 10^8$ (UFC/g) para BALs em presunto fatiado embalado a vácuo com o uso de ATM. Mataragas et al. (2006), na avaliação da flora deteriorante de produtos cárneos fatiados, encontrou valores entre $2,0 \times 10^8$ e $7,0 \times 10^8$ (UFC/g) para a população máxima atingida.

Os índices estatísticos avaliados estão apresentados na Tabela 6, sendo possível observar bom desempenho do modelo de Baranyi e Roberts ao ajustar os dados experimentais, uma vez que a maior parte dos valores de R^2 , fator bias e fator exatidão encontraram-se próximos de 1.

Tabela 6 - Índices estatísticos obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto a 6, 12, 15, 20 e 25 °C.

Temperatura (°C)	Amostra	Índices Estatísticos			
		R^2	RMSE	Fator Bias	Fator Exatidão
6	S/ OEO	0,9388	1,6347	1,0030	1,0754
	C/ OEO	0,8709	0,9607	1,0028	1,0681
12	S/ OEO	0,9920	0,5533	1,0004	1,0218
	C/ OEO	0,9296	2,0651	0,9788	1,1838
15	S/ OEO	0,9993	0,2012	1,0003	1,0082
	C/ OEO	0,9432	2,2215	0,9998	1,0932
20	S/ OEO	0,9866	0,8046	1,0010	1,0335
	C/ OEO	0,9666	1,0641	1,0022	1,0721
25	S/ OEO	0,9908	0,5508	1,0011	1,0362
	C/ OEO	0,9522	1,2607	1,0059	1,0786

Os valores observados na Tabela 6 mostram que o modelo teve melhor ajuste nos dados das amostras sem OEO, com valores de R^2 em torno de $0,98 \pm 0,02$. O valor de R^2 foi menor nas amostras tratadas com óleo essencial em torno de $0,92 \pm 0,05$. Slongo (2009) obteve valores de 0,80 avaliando o 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^2 em torno de 0,98 para o modelo de Baranyi e Roberts. Kreyenschmidt et al. (2010) encontraram valores de R^2 em torno de (0,93 a 0,98) para determinação da vida útil de fatias de presuntos com base no crescimento de BAL. Os valores de RMSE encontrados foram menores para as amostras sem OEO (0,20 a 1,63). As amostras com OEO apresentaram valores superiores (0,80 a 2,22). Kreyenschmidt et al. (2010) encontraram valores de RMSE variando entre 0,409 e 0,800. Esses valores de R^2 e RMSE podem ser explicados pelo fato de se tratar de contagens microbianas (microbiota natural) de um alimento sólido, o que pode levar às variações nas contagens.

Os fatores bias e exatidão são índices de desempenho do modelo. Estes valores mostram se a resposta predita está ou não próxima da resposta observada. Um fator bias superior a 1,0 indica que o valor previsto é maior do que o valor observado. Por outro lado, um fator bias menor do que 1,0 indica que o valor previsto é menor do que o valor observado.

O fator exatidão é a soma das diferenças absolutas entre os valores preditos e observados. Um fator exatidão de 1 mostra que há perfeita concordância entre todos os valores preditos e observados. Quanto maior for este valor, mais baixa é a sua precisão (SLONGO et al., 2009). Os valores de bias e exatidão apresentados na Tabela 6 indicam que os valores encontrados de um modo geral estão próximos de 1, mostrando que a resposta observada é igual a resposta predita.

4.3 MODELOS SECUNDÁRIOS

Neste estudo, os modelos secundários raiz quadrada e exponencial, foram ajustados aos valores de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), obtidos pelo ajuste do modelo de Barany e Roberts para flora natural de bactérias ácido lácticas em presunto, no intervalo de temperatura de 6 a 25 °C. Os modelos secundários que melhor descreveram essa influência são apresentados na Tabela 7. Os modelos secundários foram comparados pelo índice estatístico R^2 .

Tabela 7 - Modelos secundários que melhor descrevem a influência da temperatura sobre o parâmetro velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de flora natural de BAL.

Modelo	Amostra	Equação	R ²
Exponencial	S/ OEO	$\mu_{\text{máx}} = 0,0214 * \exp(0,116 * T)$	0,9697
	C/ OEO	$\mu_{\text{máx}} = 0,0134 * \exp(0,1251 * T)$	0,9603
Raiz Quadrada	S/ OEO	$\sqrt{\mu_{\text{máx}}} = 0,022 * (T + 1,95)$	0,9355
	C/ OEO	$\sqrt{\mu_{\text{máx}}} = 0,0209 * (T + 0,502)$	0,9229

Nas Figuras 6 e 7 são apresentados os ajustes do modelo secundário (exponencial e raiz quadrada) e o gráfico dos resíduos de comparação dos dados experimentais com o ajuste do modelo. Apesar de o modelo da raiz quadrada ser o mais comumente usado, o modelo exponencial apresentou melhor desempenho, com valores de R² acima de 0,96, como apresentado na Tabela 7. Os maiores resíduos foram observados no modelo da raiz quadrada.

Longhi (2012) afirmou que a habilidade dos modelos secundários em representar a dependência dos parâmetros com a temperatura influencia a predição do crescimento em condições não isotérmicas. Desta forma, a capacidade preditiva do modelo em descrever o crescimento microbiano em condições não isotérmicas depende muito do bom ajuste dos modelos secundários. A análise conjunta das figuras 6 e 7, e dos índices estatísticos bias (s/ OEO = 1,0010, c/ OEO = 1,0026) e exatidão (s/ OEO = 1,106, c/ OEO = 1,1296) indica que o modelo exponencial pode ser usado para prever a velocidade específica de crescimento da flora natural de BAL em presunto fatiado embalado a vácuo.

Figura 6- Influência da temperatura sobre a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de flora natural de BAL em presunto s/ OEO. A linha contínua representa o ajuste do modelo secundário exponencial (a) e raiz quadrada (b) aos dados experimentais. Os resíduos decorrentes do ajuste dos modelos são apresentados em (c) e (d).

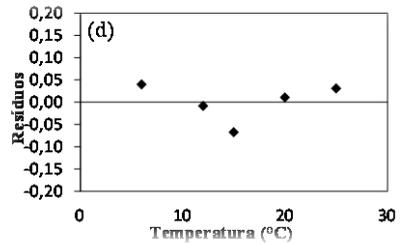
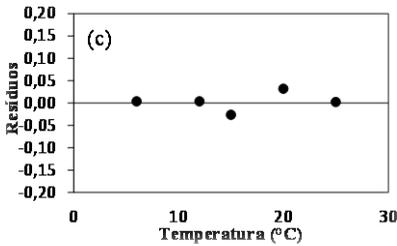
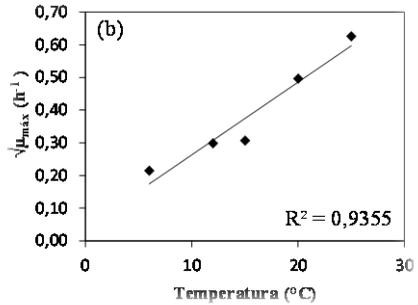
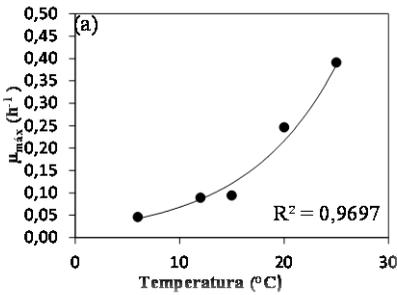
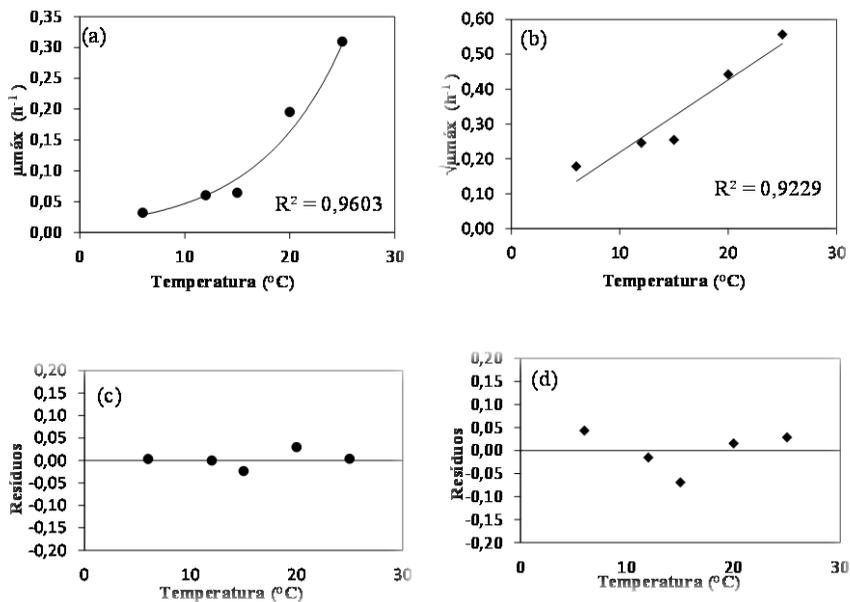


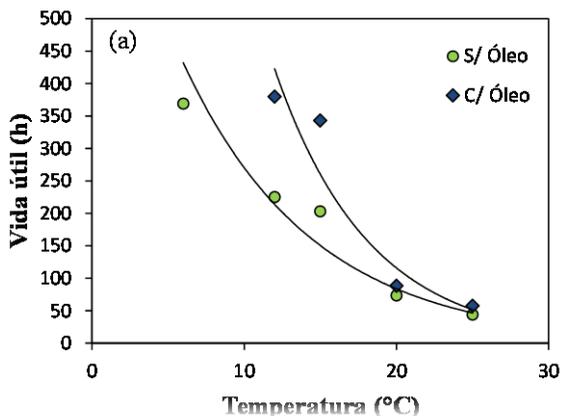
Figura 7 - Influência da temperatura sobre a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) de flora natural de BAL em presunto c/ OEO. A linha contínua representa o ajuste do modelo secundário exponencial (a) e (b) raiz quadrada aos dados experimentais. Os resíduos decorrentes do ajuste dos modelos são apresentados em (c) e (d).



A média aritmética dos valores do parâmetro $y_{m\acute{a}x}$ para todas as temperaturas foi utilizada como modelo secundário. O valor da média aritmética calculada para o parâmetro $y_{m\acute{a}x}$ nas amostras controle e com tratamento com OEO foi de $1,8 \times 10^8$ (UFC/g) ou 19,0 [Ln(UFC/g)].

A influência da temperatura sobre a vida útil foi descrita pelo modelo exponencial. Na figura 8 são apresentados os ajustes do modelo secundário exponencial sobre os valores de vida útil de presunto, considerando-se a flora natural de BAL às temperaturas de 6, 12, 15, 20 e 25 °C com e sem OEO.

Figura 8- Influência da temperatura sobre a vida útil de presunto fatiado embalado a vácuo. A linha contínua representa o ajuste do modelo secundário exponencial. (a) S/ OEO e (b) C/ OEO.



As equações dos modelos e os valores de R^2 estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Modelos secundários que descrevem a influência da temperatura sobre a vida útil de presunto fatiado embalado a vácuo.

Modelo	Amostra	Equação	R^2
Exponencial	S/ OEO	vida útil = $872,66 \cdot \exp(-0,117 \cdot T)$	0,955
	C/ OEO	vida útil = $2944,3 \cdot \exp(-0,162 \cdot T)$	0,936

A utilização do óleo essencial de orégano estendeu a vida útil do presunto. Na temperatura de 6 °C, as amostras com óleo essencial de orégano não atingiram concentração de 10^7 (UFC/g), considerada o critério para determinação da vida útil, durante o todo o período de 45 dias do experimento. Neste caso, outro parâmetro, que não o critério microbiológico utilizado no presente trabalho, definirá a vida útil do presunto armazenado a essa temperatura.

A temperatura teve grande influência sobre o parâmetro de crescimento $\mu_{\text{máx}}$ e na vida útil. Para todas as amostras esta influência foi melhor representada pelo modelo exponencial.

4.4 PREDIÇÃO DO CRESCIMENTO DE FLORA NATURAL SOB CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS

As curvas de crescimento de flora natural em presunto fatiado embalado a vácuo, em condições não isotérmicas envolvendo temperaturas de 5 a 25 °C, previstas pelo modelo de Baranyi e Roberts (1994) (equações 3.2 e 3.3), com e sem OEO e considerando-se os perfis de temperatura NI-1 e NI-2, são representados respectivamente nas figuras 9 e 10 (a linha horizontal preta indica a contagem final que define a vida útil do presunto).

Figura 9 - Crescimento de flora natural em presunto submetido às condições não isotérmicas do perfil (NI-1), previstas pelo modelo de Baranyi e Roberts, com e sem OEO e validada pelos dados experimentais.

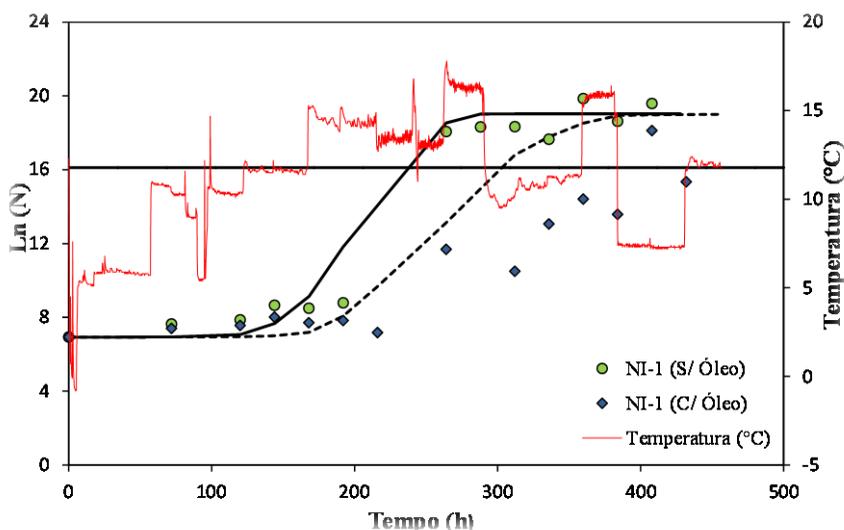
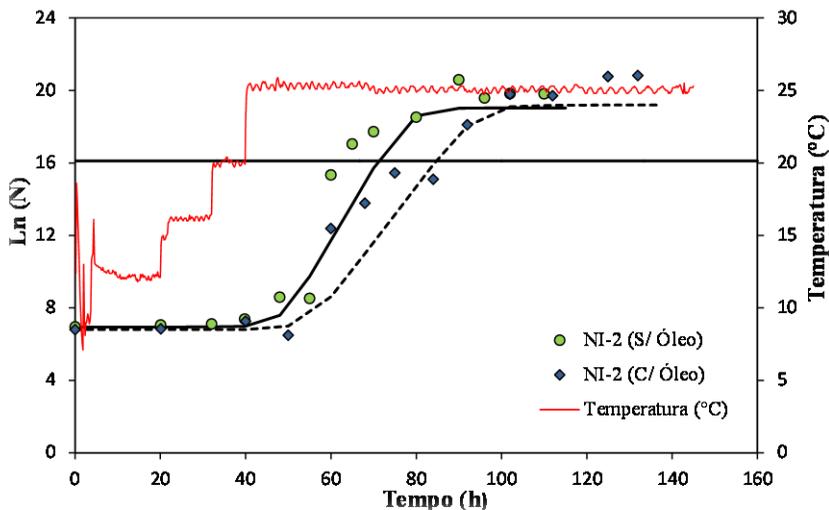


Figura 10 - Crescimento de flora natural em presunto submetido às condições não isotérmicas do perfil (NI-2), previstas pelo modelo de Baranyi e Roberts, com e sem OEO e validada pelos dados experimentais.

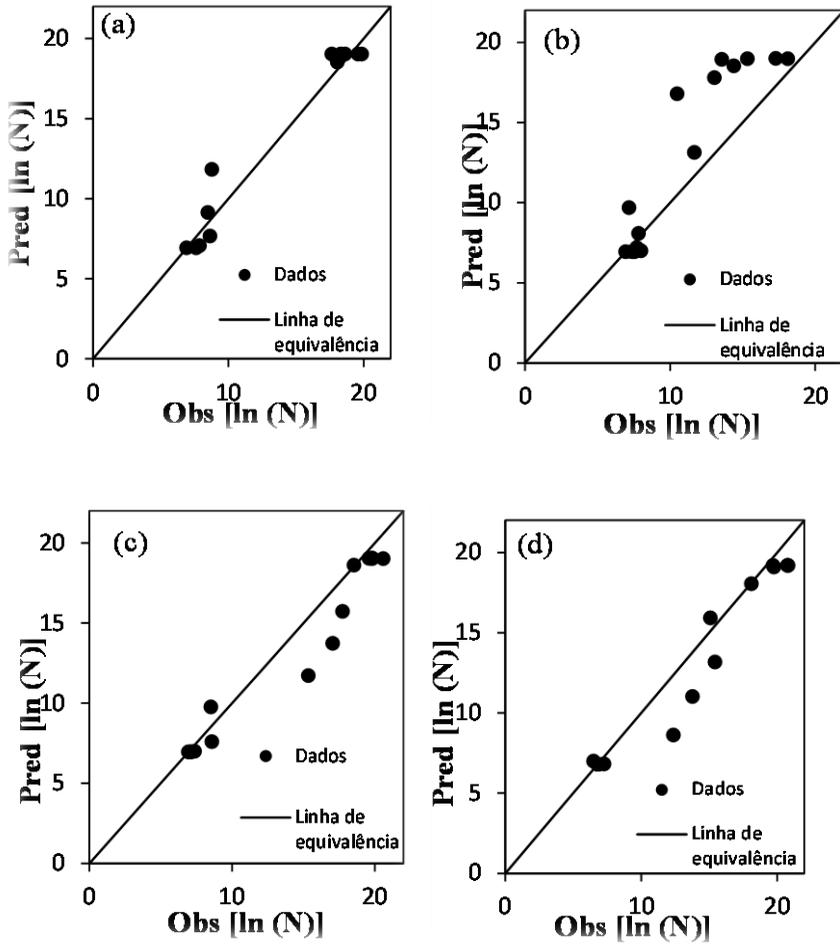


No perfil de temperatura NI-1, com variações de temperaturas oscilando na faixa de 6 a 15 °C, o modelo apresentou boa capacidade de predição para os dados sem OEO e pode-se observar que a fase lag e a fase estacionária foram bem descritas pelo modelo. Com relação aos dados com OEO, a fase lag foi bem descrita, porém o modelo não conseguiu prever bem a ação antimicrobiana do óleo essencial e superestimou os dados de crescimento na fase exponencial e na fase estacionária. A duração da fase lag e a velocidade máxima específica de crescimento são os parâmetros de crescimento de maior interesse, pois, na maioria dos alimentos, a deterioração ocorre antes do crescimento microbiano alcançar a fase estacionária (BARANYI; ROBERTS, 1994; DALGAARD; KOUTSOUMANIS, 2001).

Para o perfil crescente NI-2, que apresenta uma faixa de temperatura mais alta que NI1 (variando de 12 a 25 °C), o modelo apresentou as predições próximas aos dados experimentais para a fase lag, em ambas as amostras (com e sem OEO), porém subestimou a parte exponencial e estacionária da curva, indicando assim que o modelo falhou de forma perigosa.

A Figura 11 apresenta os valores observados vs valores preditos pelo modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts (1994) para os dados de crescimento de flora natural nos perfis não isotérmicos avaliados. Analisando a Figura 11, é possível notar que os valores preditos e valores observados estão mais próximos à linha de equivalência, no perfil (a) NI-1 (S/ OEO), que apresentou melhor desempenho na predição. Na figura 11 (b), pode-se observar que os dados preditos, principalmente na parte superior da curva, foram maiores que os observados no experimento. Os valores preditos são menores que os observados para o perfil NI-2, (c) e (d) na parte superior da curva que representa um abuso de temperatura, porém para as temperaturas mais baixas o modelo previu bem o crescimento.

Figura 11 - Relação entre os dados de crescimento observados vs preditos pelo modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts obtidos para flora natural nos perfis de temperatura: (a) NI-1(S/ OEO), (b) NI-1 (C/ OEO), (c) NI-2 (S/ OEO) e (d) NI-2 (C/ OEO).



Os valores de R^2 , RMSE, Fator bias e Fator exatidão das predições de crescimento de flora natural nas duas condições não isotérmicas avaliadas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - R^2 , RMSE, Fator bias e Fator exatidão da predição do crescimento de pelo modelo de Baranyi e Roberts nas duas condições não isotérmicas avaliadas.

Perfil	Amostra	Índices Estatísticos			
		R^2	RMSE	Fator Bias	Fator Exatidão
NI-1	S/ OEO	0,9612	1,1101	1,0134	1,0768
	C/ OEO	0,8517	3,0008	1,1286	1,1828
NI-2	S/ OEO	0,9461	1,6585	0,9380	1,0894
	C/ OEO	0,9430	1,6145	0,9322	1,0940

Os valores de RMSE encontrados no presente trabalho estão um pouco acima dos valores encontrados na literatura, provavelmente pelo fato de utilizar um meio complexo (presunto) e flora natural. De acordo com Antwi et al. (2007), a estrutura dos alimentos, por ser mais complexa do que o meio de cultivo tradicional, pode afetar o crescimento dos microrganismos.

O valor de RMSE observado no perfil NI-1 (C/ OEO) se deve a fase exponencial e estacionária do crescimento microbiano, pois foi onde os maiores desvios dos valores preditos em relação aos observados. Esse perfil foi feito em temperaturas mais baixas que o perfil NI-2. Nas temperaturas mais baixas o óleo essencial foi mais efetivo o que resultou em uma superestimção dos dados pelo modelo.

O fator bias é uma estimativa para a diferença média entre os valores observados e preditos. Bias maior que 1, significa que a predição do modelo foi, de forma geral, maior do que os dados experimentais. Tal comportamento é chamado de “*fail safe*”, o que quer dizer que o modelo falhou de forma segura, ou seja, superestimou o crescimento microbiano. Quando o fator bias é menor que 1, o modelo falha de forma perigosa “*fail dangerous*”, subestimando o crescimento microbiano. No perfil NI-2 os valores do fator bias (0,938; 0,932) indicam que o modelo falhou de forma perigosa, subestimando os dados experimentais.

O fator exatidão é sempre maior ou igual a 1, sendo que quanto maior o seu valor, menos precisa é a média das estimativas. Os perfis analisados apresentam valores próximos a 1, apenas no perfil NI-1 (C/OEO) este valor foi mais alto, devido a ação antimicrobiana do óleo essencial.

De acordo com Slongo et al. (2009) e Kreyenschmidt et al. (2010) a concentração de BAL definida como ponto para deterioração dos produtos é de 10^7 (UFC/g). É importante observar que esta concentração de BAL foi obtida ainda na fase de crescimento exponencial, considerando todos os experimentos realizados no presente trabalho.

A Tabela 10 mostra a vida útil predita e observada nos perfis analisados. Para as duas condições de temperatura, o tratamento com óleo essencial de orégano estendeu a vida útil do presunto. O perfil NI-1 foi realizado simulando abusos na temperatura de refrigeração. Assim como observado nos perfis isotérmicos, o óleo essencial apresentou maior efeito antimicrobiano nas temperaturas de refrigeração do que nas temperaturas mais elevadas, como no perfil NI-2, em que o efeito da temperatura foi maior que o do óleo.

Observa-se que apenas para o perfil NI-2 (S/OEO) a vida útil predita foi maior que a observada. Nos demais perfis, a vida útil predita foi menor que a observada, que é uma falha segura.

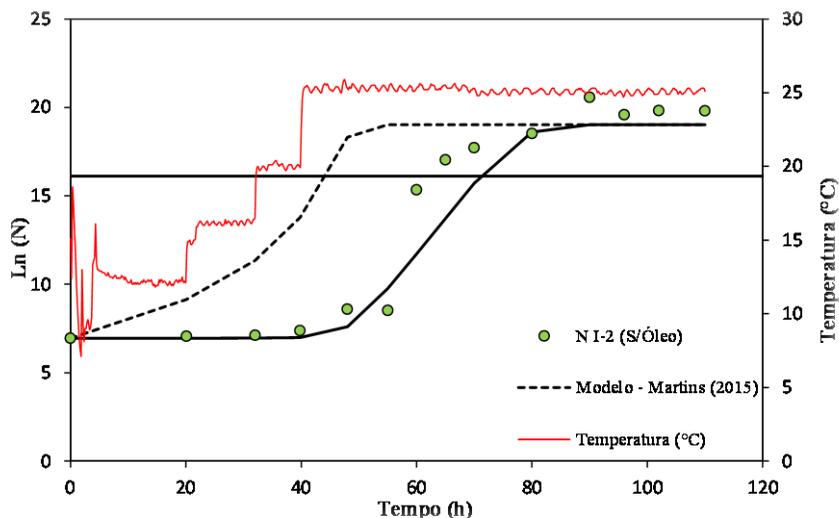
Tabela 10 - Vida útil predita e observada nos perfis não isotérmicos avaliados.

Perfil	Vida útil observada (h)	Vida útil predita (h)
NI-1 (S/OEO)	248,9	237,7
NI-1 (C/OEO)	397,4	303,0
NI-2 (S/OEO)	62,3	71,8
NI-2 (C/OEO)	86,7	84,6

4.5 COMPARAÇÃO ENTRE O MODELO OBTIDO DE FLORA NATURAL E O MODELO DE CULTURA PURA (*Weissella viridescens*)

Camargo (2015) modelou o crescimento de (*Lactobacillus plantarum*, *Weissella viridescens* e *Lactobacillus sakei*) em cultura pura e mista, sob condições isotérmicas e não-isotérmicas em meio de cultivo (MRS) e Martins (2015) utilizou os dados obtidos para *W. viridescens* para obter o modelo secundário. A Figura 12 compara o modelo descrito por Martins (2015) para o crescimento de *W. viridescens* com o modelo obtido neste trabalho, ambos ajustado aos dados de crescimento de flora natural de BAL em presunto no perfil NI-2 (s/OEO).

Figura 12 - Comparação da capacidade preditiva do modelo obtido usando cultura pura de *W. viridescens* (Martins (2015)) com o modelo utilizando flora natural de BAL.



A Tabela 11 apresenta os valores de R^2 , RMSE, Fator bias e Fator exatidão das predições de crescimento de flora natural utilizando o modelo de Martins (2015) e o modelo para flora natural de BAL.

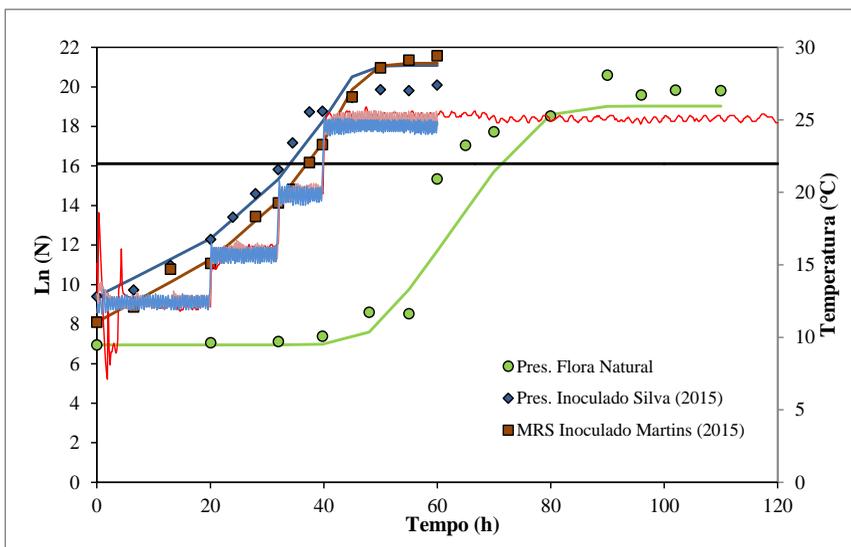
Tabela 11 - Índices estatísticos obtidos pelos ajustes dos modelos obtidos utilizando cultura pura de *W. viridescens* (Martins (2015)) e flora natural de BAL.

Índices Estatísticos	Modelo- Camargo (2015)	Modelo- Flora natural de BAL
R^2	0,5415	0,9461
RMSE	4,7317	1,6585
Fator Bias	1,277	0,9380
Fator Exatidão	1,3072	1,0894

Os valores observados na Tabela 11 mostram que o modelo obtido usando flora natural de BAL apresentou melhor capacidade preditiva quando comparado ao modelo utilizado cultura pura de *W. viridescens*. O modelo para flora natural apresentou melhores valores de R^2 (0,95). Pode-se observar na Figura 12 que o modelo utilizando cultura pura não descreve a fase lag (λ) encontrada no crescimento de flora natural.

Foram realizadas comparações entre o crescimento de flora natural de bactérias ácido lácticas em presunto e o crescimento de *W. viridescens* inoculada em presunto e em meio de cultivo MRS na condição do perfil de temperatura NI-2 (12-16-20-25 °C), apresentadas na Figura 13. As linhas coloridas (rosa, azul e vermelho) representam a temperatura. Os dados de crescimento de *W. viridescens* inoculada em presunto e em MRS foram retirados dos trabalhos de Martins (2015) e Silva (2015), respectivamente.

Figura 13 - Crescimento de flora natural em presunto, crescimento de *W. viridescens* (presunto/ meio de cultivo MRS) e previsões geradas pelo Modelo de Barany e Roberts para o perfil de temperatura NI-2.



Ao analisar a Figura 13, pode-se observar que, para o presunto com flora natural, há o desenvolvimento de uma fase lag que não foi observada no presunto inoculado ou no meio MRS. A estrutura complexa do presunto e a utilização de flora natural para a construção do modelo influenciaram essa diferença no crescimento em relação à utilização do microrganismo inoculado. De acordo com Antwi et al. (2007) e Vereecken et al. (2003), os ensaios de crescimento realizados para desenvolver modelos são geralmente desenvolvidos com organismo alvo em meio de cultura. Porém os alimentos reais contêm uma microflora heterogênea. Em tais sistemas de múltiplas espécies, as interações (interespecies) microbianas podem desempenhar papel significativo e podem influenciar substancialmente as características

de crescimento dos membros individuais (VEREECKEN et al., 2003; (BLANA; NYCHAS, 2014). Zhang et al., 2015 analisaram as interações entre 10 diferentes gêneros bacterianos isolados a partir de carne embalada a vácuo e relataram a importância de se investigar as interações entre as bactérias nos alimentos para que estas informações possam ser traduzidas em modelos que descrevam mudanças dinâmicas em comunidades bacterianas a fim de melhorar estratégias de processamento e preservação do produto e melhor determinação da vida útil dos mesmos.

Os dados do crescimento de *W. viridescens* em presunto e em meio MRS não diferem muito entre si, porém em relação à flora natural há uma visível diferença quanto à fase lag e velocidade máxima específica de crescimento, resultando em uma maior vida útil do presunto não inoculado. O prazo de validade dos produtos cárneos é influenciado, em parte, pela composição do produto e pelo tipo de bactérias deteriorantes presentes (NYCHAS et al., 2008). Essa composição da comunidade bacteriana é baseada em fatores intrínsecos e fatores extrínsecos, incluindo temperatura, atmosfera, pH, e ácidos orgânicos, os quais podem influenciar o crescimento microbiano (DOULGERAKI et al., 2010; NEMERGUT et al., 2013).

5 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como principais objetivos modelar a vida útil de presunto fatiado embalado a vácuo, em condições isotérmicas e não isotérmicas e avaliar o efeito da utilização de óleo essencial de orégano (OEO) como agente antimicrobiano, baseado no crescimento da flora natural de BAL. A partir dos resultados obtidos, conclui-se:

- As análises físico-químicas realizadas no presunto caracterizaram o produto como um meio ótimo para o crescimento de bactérias ácido lácticas. Os valores de pH, aw e concentração de cloreto de sódio estão de acordo com os encontrados na literatura e dentro da faixa ótima de crescimento de BAL.

- O modelo de Baranyi e Roberts pode ser usado no ajuste dos parâmetros primários de crescimento de flora natural de bactérias ácido lácticas em presunto (com e sem OEO) e, segundo a análise dos resultados e índices estatísticos, o mesmo descreveu bem o crescimento das BAL, nas diferentes condições de temperaturas abordadas;

- O óleo essencial de orégano apresentou efeito antimicrobiano sobre a flora natural de BAL, principalmente em temperaturas de refrigeração. O OEO estendeu a vida útil do presunto armazenado a 6°C em 30 dias;

- O modelo secundário exponencial apresentou melhor desempenho na descrição da influência da temperatura sobre o parâmetro da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) em ambos os ensaios (com e sem OEO). Para o parâmetro $y_{\text{máx}}$, a média aritmética dos valores para todas as temperaturas foi utilizada como modelo secundário.

- O modelo de Baranyi e Roberts apresentou boa predição em condições não isotérmicas, na faixa de temperatura de 4 a 25 °C, principalmente em condições de temperaturas próximas às de refrigeração, que são as condições de interesse;

- Ao se comparar os dados de crescimento de flora natural BAL em presunto com os dados de crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo (MRS) e em presunto, observa-se para a flora natural o aparecimento de uma fase lag, que não é observada no crescimento da cultura pura.

- Com base nos resultados obtidos, o modelo pode ser usado para prever o crescimento de flora natural de BAL em presunto fatiado embalado a vácuo e determinar a vida útil deste produto submetido a diferentes condições de temperatura. O óleo essencial de orégano apresentou efeito antimicrobiano sobre as BAL em presunto.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMBERG, K.; KASK, S.; LAHT, T. M.; PAALME, T. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: A pH-auxostat study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 1-2, p. 171–183, 2003.

AGUIRRE, A.; BORNEO, R.; LEÓN, A. E. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. **Food Bioscience**, v. 1, p. 2–9, 2013.

ALIÑO, M.; FUENTES, A.; FERNÁNDEZ-SEGOVIA, I.; BARAT, J. M. Development of a low-sodium ready-to-eat desalted cod. **Journal of Food Engineering**, v. 107, n. 3-4, p. 304–310, 2011.

AMÉZQUITA, A.; WELLER, C. L.; WANG, L.; THIPPAREDDI, H.; BURSON, D. E. Development of an integrated model for heat transfer and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, n. 1-2, p. 123–144, 2005.

AMMOR, S.; RACHMAN, C.; CHAILLOU, S.; et al. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. **Food Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 373–382, 2005.

ANTWI, M.; BERNAERTS, K.; IMPE, J. F. VAN; GEERAERD, A. H. Modelling the combined effects of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* growth in mono- and coculture. **International journal of food microbiology**, v. 120, n. 1-2, p. 71–84, 2007.

AUDENAERT, K.; D'HAENE, K.; MESSENS, K.; et al. Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged sliced cooked meat products at sell-by date assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 12–18, 2010.

BAGAMBOULA, C. .; UYTENDAELE, 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, n. 1, p. 33–42, 2004.

BAJPAI, V. K.; BAEK, K.-H.; KANG, S. C. Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 722–734, 2011.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BARANYI, J. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 199–218, 1995.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3-4, p. 277–294, 1994.

BARANYI, J.; ROBINSON, T. P.; KALOTI, A.; MACKEY, B. M. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. **International journal of food microbiology**, v. 27, p. 61–75, 1995.

BENAVIDES, S. VILLALOBOS-CARVAJAL, R. REYES, J. E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 232-239, 2012.

BLANA, V. A; NYCHAS, G.-J. E. Presence of quorum sensing signal molecules in minced beef stored under various temperature and packaging conditions. **International journal of food microbiology**, v. 173, p. 1–8, 2014.

BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M. L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 103–120, 1996.

BOSKOVIC, M.; ZDRAVKOVIC, N.; IVANOVIC, J.; et al. Antimicrobial Activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oils against Some Food-borne Microorganisms. **Procedia Food Science**, v. 5, p. 18–21, 2015.

BRESSAN, M. C.; LODI, F.; FERREIRA, M. W.; et al. Influência da

embalagem na vida útil de presuntos fatiados. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 433 – 438, 2007.

BURGAIN, J.; SCHER, J.; FRANCIUS, G.; et al. Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 213, p. 21–35, 2014.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–53, 2004.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015.

CAMARGO, A.P.R.S. **Modelagem do crescimento de bactérias ácido lácticas em cultura pura e mista sob condições isotérmicas e não isotérmicas de cultivo**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2015.

CARRASCO, E.; ROSAL, S. DEL; RACERO, J. C.; GARCÍA-GIMENO, R. M. A review on growth/no growth Salmonella models. **Food Research International**, v. 47, n. 1, p. 90–99, 2012.

CAYRÉ, M. E.; VIGNOLO, G.; GARRO, O. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures. **Food Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 561–566, 2003.

CHOULIARA, E.; KARATAPANIS, A.; SAVVAIDIS, I.N.; KONTOMINAS, M.G. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. **Food Microbiology**, v. 24, p. 607-617, 2007.

CORRADINI, M. G.; AMÉZQUITA, A.; NORMAND, M. D.; PELEG, M. Modeling and predicting non-isothermal microbial growth using general purpose software. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 223–228, 2006.

CORRADINI, M. G.; PELEG, M. Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experimental data. **Journal of Applied**

Microbiology, v. 99, n. 1, p. 187–200, 2005.

COSTA, J. C. C. P. **Efeito do tratamento termoquímico (óleo essencial e calor) no crescimento microbiano durante a vida útil de mexilhões (*Perna perna*) processados em embalagens flexíveis.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2013.

DALGAARD, P.; KOUTSOUMANIS, K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. **Journal of Microbiological Methods**, v. 43, n. 3, p. 183–196, 2001.

DOULGERAKI, A. I.; PARAMITHIOTIS, S.; KAGKLI, D. M.; NYCHAS, G.-J. E. Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. **Food Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1028–1034, 2010.

DU, M. Lactic acid bacteria in cooked hams e Sources of contamination and chances of survival in the product. , v. 61, p. 1–5, 2016.

EMIROĞLU, Z. K.; YEMIŞ, G. P.; COŞKUN, B. K.; CANDOĞAN, K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 283–288, 2010.

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, n. 1, p. 115–121, 2010.

GARRIDO, V.; GARCÍA-JALÓN, I.; VITAS, A. I. Temperature distribution in Spanish domestic refrigerators and its effect on *Listeria monocytogenes* growth in sliced ready-to-eat ham. **Food Control**, v. 21, n. 6, p. 896–901, 2010.

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

GHANBARI, M.; JAMI, M.; DOMIG, K. J.; KNEIFEL, W. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 315–324, 2013.

GHANBARI, M.; JAMI, M.; KNEIFEL, W.; DOMIG, K. J. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocins produced by lactobacilli isolated from Sturgeon fish. **Food Control**, v. 32, n. 2, p. 379–385, 2013.

GOGOU, E.; KATSAROS, G.; DERENS, E.; ALVAREZ, G.; TAOUKIS, P. S. Cold chain database development and application as a tool for the cold chain management and food quality evaluation. **International Journal of Refrigeration**, v. 52, p. 109–121, 2015.

GOSPAVIC, R.; KREYENSCHMIDT, J.; BRUCKNER, S.; POPOV, V.; HAQUE, N. Mathematical modelling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 3, p. 290–297, 2008.

GOULAS, A. E.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 287–296, 2007.

HASAPIDOU, A.; SAVVAIDIS, I. N. The effects of modified atmosphere packaging, EDTA and oregano oil on the quality of chicken liver meat. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2751–2756, 2011.

HU, P.; ZHOU, G.; XU, X.; LI, C.; HAN, Y. Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S rDNA-DGGE. **Food Control**, v. 20, n. 2, p. 99–104, 2009.

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

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Ed. ArtMed, Porto Alegre, 6^a ed., p.51-72, 2005.

JUNEJA, V. K.; VALENZUELA MELENDRES, M.; HUANG, L.; et al.

Modeling the effect of temperature on growth of Salmonella in chicken. **Food microbiology**, v. 24, n. 4, p. 328–35, 2007.

KALSCHNE, D. L.; GEITENES, S.; VEIT, M. R.; SARMENTO, C. M. P.; COLLA, E. Growth inhibition of lactic acid bacteria in ham by nisin: A model approach. **Meat Science**, v. 98, n. 4, p. 744–752, 2014.

KALSCHNE, D. L.; WOMER, R.; MATTANA, A.; et al. Characterization of the spoilage lactic acid bacteria in “ sliced vacuum-packed cooked ham .” , v. 181, p. 173–181, 2015.

KARABAGIAS, I.; BADEKA, A.; KONTOMINAS, M. G. Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. **Meat Science**, v. 88, n. 1, p. 109–116, 2011.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 103-125, 1998.

KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. **International journal of food microbiology**, v. 60, n. 2-3, p. 171–84, 2000.

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

KREYENSCHMIDT, J.; HÜBNER, A.; BEIERLE, E.; et al. 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, n. 2, p. 510–520, 2010.

LEBERT, I.; LEBERT, A. Quantitative prediction of microbial behaviour during food processing using an integrated modelling approach: a review. **International Journal of Refrigeration**, v. 29, n. 6, p. 968–984, 2006.

LEE, J. H.; YANG H. J.; LEE, K. Y. SONG, K. B. Physical properties and application of a red pepper seed meal protein composite film containing oregano oil. **Food Hydrocolloids**, v. 55, p. 136-143, 2016.

LIOLIOS, C. C.; GORTZI, O.; LALAS, S.; TSAKNIS, J. CHINO, I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v 112, p. 77-83, 2009.

LIU, G.; WANG, Y.; GUI, M.; et al. Combined effect of high hydrostatic pressure and enterocin LM-2 on the refrigerated shelf life of ready-to-eat sliced vacuum-packed cooked ham. **Food Control**, v. 24, n. 1-2, p. 64–71, 2012.

LLORET, E.; PICOUET, P. A.; TRBOJEVICH, R.; FERNÁNDEZ, A. Colour stability of cooked ham packed under modified atmospheres in polyamide nanocomposite blends. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 582–589, 2016.

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, SC, 2012.

LONGHI, D. A.; DALCANTON, F.; ARAGÃO, G. M. F. DE; CARCIOFI, B. A. M.; LAURINDO, J. B. Assessing the prediction ability of different mathematical models for the growth of *Lactobacillus plantarum* under non-isothermal conditions. **Journal of Theoretical Biology**, v. 335, p. 88–96, 2013.

LYTOU, A.; PANAGO, E. Z.; NYCHAS, G. J. Development of a predictive model for the growth kinetics of aerobic microbial population on pomegranate marinated chicken breast fillets under isothermal and dynamic temperature Conditions. **Food Microbiology**, v. 55, p. 25-31, 2016.

MARTUCCI, J. F.; GENDE, L. B.; NEIRA, L. M.; RUSECKAITE, R. A. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. **Industrial Crops & Products**, v. 71, p. 205–213, 2015.

MARTINS, W. F. **Predição do crescimento de *Weissella viridescens* sob condições não isotérmicas.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2015.

MATARAGAS, M.; DROSINOS, E. H.; VAIDANIS, A.; METAXOPOULOS, I. Development of a Predictive Model for Spoilage of Cooked Cured Meat Products and Its Validation Under Constant and Dynamic Temperature Storage Conditions. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 6, p. M157–M167, 2006.

MCDONALD, K.; SUN, D. W. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International journal of food microbiology**, v. 52, n. 1-2, p. 1–27, 1999.

MCMEEKIN, T. A.; OLLEY, J.; RATKOWSKY, D. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: Towards the interface and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, n. 2-3, p. 395–407, 2002.

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.

NEMERGUT, D. R.; SCHMIDT, S. K.; FUKAMI, T.; et al. Patterns and Processes of Microbial Community Assembly. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 3, p. 342–356, 2013.

NTZIMANI, A. G.; GIATRAKOU, V. I.; SAVVAIDIS, I. N. Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4 °C: Microbiological and sensory evaluation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 187–196, 2010.

NYCHAS, G.-J. E.; SKANDAMIS, P. N.; TASSOU, C. C.; KOUTSOUMANIS, K. P. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, v. 78, n. 1-2, p. 77–89, 2008.

OLIVEIRA, P. M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. **Food Microbiology**, v. 37, p. 78–95, 2014.

PETROU, S.; TSIRAKI, M.; GIATRAKOU, V.; SAVVAIDIS, I. N. Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 264–271, 2012.

POTHAKOS, V.; DEVLIEGHIERE, F.; VILLANI, F.; BJÖRKROTH, J.; ERCOLINI, D. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. **Meat Science**, v. 109, p. 66–74, 2015.

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

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

RUSSO, F.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. **Food Microbiology**, v. 23, n. 8, p. 797–802, 2006.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. **Food Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 329–340, 2000.

SANTOS, E. M.; JAIME, I.; ROVIRA, J.; et al. Characterization and identification of lactic acid bacteria in “morcilla de Burgos.” **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 285–296, 2005.

SILVA, N. B. **Modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus viridescens* sob condições não isotérmicas em presunto fatiado embalado a vácuo.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2015.

SLONGO, A. P. **Uso de 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, SC, 2008.

SLONGO, A. P.; ROSENTHAL, A.; QUARESMA CAMARGO, L. M.; et al. Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by

high hydrostatic pressure. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 303–306, 2009.

STAHL, V.; NDOYE, F. T.; JABRI, M. EL; et al. Safety and quality assessment of ready-to-eat pork products in the cold chain. **Journal of Food Engineering**, v. 148, p. 43–52, 2015.

STEKELBURG, F. K.; KANT-MUERMANS, M. L. T. Effects of sodium lactate and other additives in a cooked ham product on sensory quality and development of a strain of *Lactobacillus curvatus* and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 197–203, 2001.

SWINNEN, I. A. M.; BERNAERTS, E. J.J.; DENS, A. H.; GEERAED, J. F.; VAN IMPE, J. F. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 137–259, 2004.

TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, C.; et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 587–595, 2013.

TSIGARIDA, E.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G. J. E. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 6, p. 901–909, 2000.

VAN IMPE, J. F.; MARTENS, T.; BAERDEMAEKER, J. DE. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food Dynamic Mathematical Model To Predict Microbial Growth and Inactivation during Food Processing. , v. 58, n. 9, p. 2901–2909, 1992.

VANIMPE, J.; POSCHET, F.; GEERAERD, A.; VEREecken, K. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1-3, p. 97–105, 2005.

VASILOPOULOS, C.; MAERE, H. DE; MEY, E. DE; et al. Technology-induced selection towards the spoilage microbiota of artisan-type cooked ham packed under modified atmosphere. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p.

77–84, 2010.

VERCAMMEN, A.; VANOIRBEEK, K. G. A.; LURQUIN, I.; et al. Shelf-life extension of cooked ham model product by high hydrostatic pressure and natural preservatives. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 4, p. 407–415, 2011.

VEREecken, K. M.; DEVLIEGHERE, F.; BOCKSTAELE, A.; DEBEVERE, J.; IMPE, J. F. VAN. A model for lactic acid-induced inhibition of *Yersinia enterocolitica* in mono- and coculture with *Lactobacillus sakei*. **Food Microbiology**, v. 20, n. 6, p. 701–713, 2003.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, n. 2, p. 149–164, 2004.

ZHANG, P.; BARANYI, J.; TAMPLIN, M. Interstrain Interactions between Bacteria Isolated from Vacuum-Packaged Refrigerated Beef. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 8, p. 2753–2761, 2015.

ZINOVIADOU, K. G.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADERIS, C. G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat Science**, v. 82, n. 3, p. 338–345, 2009.

WHITING, R.; BUCHANAN, R. A classification of models in predictive microbiology - reply. **Food Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 175-177, 1993.

ANEXO 1- Composição do óleo essencial de orégano

Tabela 12- Compostos identificados no OEO 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	α -tujeno	0,48		8,28	α -tujeno	0,45	
8,58	α -pineno	1,77		8,57	α -pineno	1,74	
9,09	canfeno	0,58		9,09	canfeno	0,57	
9,98	β -pineno	0,64		9,98	β -pineno	0,69	
10,31	β -mirceno	1,34		10,3	β -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	γ -terpineno	6,25		12,66	γ -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	

Fonte: Costa, 2013.