

CAMILA CASAGRANDE PAGANINI

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE FILME ATIVO
INCORPORADO COM ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO NO
CRESCIMENTO DE *Weissella viridescens* E *Pseudomonas fluorescens***

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.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gláucia M. Falcão Aragão

FLORIANÓPOLIS, 2017

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

Paganini, Camila Casagrande

Ação antimicrobiana de filme ativo incorporado
com óleo essencial de orégano no crescimento de
Weissella viridescens e *Pseudomonas fluorescens* /
Camila Casagrande Paganini ; orientador, Gláucia
Maria Falcão Aragão, 2017.

84 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Óleo essencial de
orégano. 3. vida útil. 4. filme ativo. I. Falcão
Aragão, Gláucia Maria. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos. III. Título.

**“AÇÃO ANTIMICROBIANA DE FILME ATIVO
INCORPORADO COM ÓLEO ESSENCIAL DE
ORÉGANO NO CRESCIMENTO DE *Weissella viridescens* E
Pseudomonas fluorescens”**

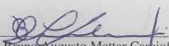
Por

Camila Casagrande Paganini

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.

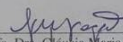


Prof.ª. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão
Orientadora




Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi
Coordenador

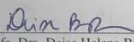
Banca Examinadora:



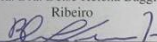
Prof.ª. Dra. Gláucia Maria Falcão de
Aragão



Prof. Dr. João Borges Laurindo



Prof.ª. Dra. Deise Helena Baggio
Ribeiro



Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar
Carciofi

Florianópolis, 10 de março de 2017.

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por sempre me dar saúde e força para superar as dificuldades. Aos meus pais, meus maiores exemplos. Obrigada, pelos ensinamentos, por cada incentivo e orientação, pelas orações em meu favor e pela preocupação para que eu sempre estivesse no caminho certo, por todo amor, paciência e compreensão que me dedicaram. A meu pai (in memoriam), que onde

quer que esteja, nunca deixou de me amar, nem de confiar em mim. Pai, meu amor eterno. À minha mãe, amor incondicional. Que sempre fez e faz de tudo para me ver bem. A vocês dois que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria deste momento.

À minha família, tios, tias, irmã e sobrinhas, que sempre tiveram presentes na minha vida. Obrigada pelo apoio, carinho e a amizade.

À minha orientadora, Prof^a Gláucia, pelos ensinamentos, palavras de apoio nos momentos difíceis, mas acima de tudo, por acreditar e confiar em mim e no meu trabalho. Aos professores Bruno, Deise e João por participarem da defesa desta dissertação, enriquecendo o trabalho com suas contribuições.

Ao professor Bruno e Pedro e aos colegas Denise e Cristian, por me ajudarem no desenvolvimento desse trabalho.

Ao laboratório de Engenharia Bioquímica e a todos os amigos que fiz lá.

Aos meus amigos do Engebio, em especial a Kellen, Pami, Carol, Wil, Nati, Dani, De, Deia e Cintia, que estão sempre comigo, me ajudando no que preciso.

A todos os amigos e amigas de Floripa, em especial Lara, Ana, Nina, Thizinha, obrigada pela paciência, pelo sorriso, pelas festas, pela mão que sempre se estendia quando eu precisava. Sem vocês esta caminhada não seria a mesma.

Obrigada a todos os amigos da minha cidade que sempre me ajudaram e incentivaram, me ajudando nos momentos difíceis, mesmo que de longe.

Obrigada a todos que, mesmo não citados aqui, contribuíram para conclusão e realização deste trabalho e para a Camila que sou hoje.

RESUMO

As bactérias ácido lácticas (BAL) são consideradas os principais microrganismos deteriorantes de produtos cárneos cozidos, embalados à vácuo, mantidos sob refrigeração. A principal flora responsável pela deterioração na carne fresca e produtos lácteos, durante a armazenagem refrigerada aeróbia, é composta por espécies de *Pseudomonas*. Essas bactérias podem causar alterações como sabores estranhos,

descoloração, diminuição do pH e produção de limo. Devido à demanda dos consumidores por embalagens de alimentos mais naturais, potencialmente biodegradáveis e recicláveis, os estudos têm focado na incorporação de compostos antimicrobianos naturais, como os óleos essenciais (OEs) nos materiais de embalagens biodegradáveis. O óleo essencial de orégano (OEO) tem sido utilizado como agente antimicrobiano natural visando aumentar a vida útil de produtos alimentares. O acetato de celulose vem ganhando destaque para a utilização em embalagens, por ser um polímero biodegradável e por suas diferentes aplicabilidades. Frente ao exposto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana de filmes ativos de acetato de celulose incorporados com diferentes concentrações de OEO no crescimento de *Weissella viridescens* e *Pseudomonas fluorescens*, para posterior aplicação em presunto nas concentrações mais efetivas. Para a avaliação do efeito antimicrobiano do OEO foram determinadas a Concentração Mínima Inibitória (CMI) (fase líquida), Dose mínima inibitória (DMI) (fase vapor) e efeito bacteriostático e bactericida sobre o crescimento de *W. viridescens* e *P. fluorescens*. O efeito dos filmes ativos, incorporado com diferentes concentrações de OEO, sobre o crescimento de *W. viridescens* e *P. fluorescens* foi avaliado em fase vapor. 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 de *W. viridescens* e *P. fluorescens* no presunto a 8 °C, com e sem adição de filme ativo nas concentrações de 10 e 15%. O filme incorporado com 15% de OEO levou a um aumento da vida útil em 7 dias. A determinação das propriedades mecânicas dos filmes (Tensão de ruptura, Elongação e Módulo de Young) foi realizada nas concentrações mais efetivas (10 e 15% de OEO) sobre as bactérias estudadas, obtendo-se uma diferença significativa em relação ao controle (sem óleo) apenas para a elongação. Os resultados mostraram que os filmes ativos incorporados com OEO se mostraram eficazes no controle do crescimento das bactérias estudadas, mesmo quando aplicados no presunto, podendo ser uma boa alternativa para prolongar a vida útil do alimento.

Palavras-chave: Óleo essencial de orégano, filme ativo, vida útil.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are considered the main spoilage microorganisms in cooked meat products, vacuum packed, keep under refrigeration. The main flora responsible for deterioration in fresh meat and dairy products, during aerobic refrigeration, is composed of *Pseudomonas* species. These bacteria can result in changes such as foreign flavors, discoloration, decreased pH and limo production. Due to consumer

demand for more natural, potentially biodegradable and recyclable food packaging, studies have focused on the incorporation of natural antimicrobial compounds, like essential oils on biodegradable packaging materials. Oregano essential oil (OEO) has been used as a natural antimicrobial agent to increase the shelf life of food products. Cellulose acetate has been gaining attention for its use in packaging, because it is biodegradable and due its different applications. Thus, the aim of this study was evaluated the antimicrobial activity of cellulose acetate films incorporated with different concentrations of the OEO on *Weisella viridescens* and *Pseudomonas fluorescens* growth, for latter application in ham (most effective concentrations). To evaluated the antimicrobial effect of OEO, it was determined the minimal inhibitory concentration (CMI) (liquid phase), minimal inhibitory dose (DMI) (vapor phase) and bacteriostatic and bactericidal effects on *W. viridescens* and *P. fluorescens* growth. The effect of active films, incorporated with different concentrations of the OEO, on *W. viridescens* and *P. fluorescens* growth was evaluated on vapor phase. The ham was characterized in terms of pH, water activity and sodium chloride concentration, and these were within the optimal range of BAL development described in the literature. The growth of *W. viridescens* and *P. fluorescens* was evaluated in ham at 8 °C, with and without active film addition, at concentrations of 10 and 15%. The film incorporated with 15% of OEO led to an increase of the shelf life of 7 days. The determinations of the mechanical properties of the films were performed at the most effective concentrations (10 and 15% OEO) on the studied bacteria, obtaining the rupture stress (TR), elongation (E) and Young's Modulus (MY). A significant change was observed from control only for elongation. The obtained results showed that the films incorporated with the OEO were effective on the studied bacteria growth, even when applied on ham, and could be a good alternative to prolong the shelf life of the food.

Keywords: Oregano essential oil, active film, shelf life.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 Esquema da reação de produção do acetato de celulose.....	23
Figura 2 Curva característica do crescimento microbiano em função do tempo. Parâmetros de crescimento. λ (fase lag), $\mu_{\text{máx}}$ (velocidade específica máxima de crescimento), N_0 (concentração celular inicial) e $N_{\text{máx}}$ (concentração celular máxima).	34
Figura 3 Adição da suspensão bacteriana nos cinco pontos na superfície do Ágar.	40

Figura 4 Adição o papel filro e do composto ativo.	40
Figura 5 Processo de fatiamento do presunto.....	44
Figura 6 Presunto embalado à vácuo com e sem adição de filme.	45
Figura 7 Efeito do OEO (0,92 (▲),1,38 (□),1,84 mg/mL (◇) e controle-sem OEO (●)) sobre o crescimento de <i>W. viridescens</i> a 30 °C. N é a concentração bacteriana (UFC/mL) e as linhas são apenas para ligar os dados nas mesmas condições experimentais.	50
Figura 8 Efeito do OEO (0.46 (□) e controle - sem OEO (●)) no crescimento de <i>P. fluorescens</i> a 30 °C. N é o a concentração bacteriana (UFC/mL) e as linhas são apenas para ligar os dados nas mesmas condições experimentais.	50
Figura 9 Efeito do filme ativo incorporado com OEO sobre o crescimento de <i>W. viridescens</i> . (A1) Controle; (A2) Controle; (B) 5%; (C) 7%; (D) 10%; (E) 15 %.....	53
Figura 10 Efeito do filme ativo incorporado com OEO no crescimento de <i>P. fluorescens</i> . (A) Controle; (B) 10%; (C) 15%.	53
Figura 11 Curvas de crescimento de <i>W. viridescens</i> em presunto fatiado embalado a vácuo, armazenado a 8 °C, com e sem filme ativo incorporado com 10 % de OEO e ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto. As linhas pretas (contínuas - s/filme de 10 % de OEO; tracejadas – c/filme de 10% de OEO) representam o ajuste do modelo primário. Os símbolos representam os dados experimentais do crescimento de <i>W. viridescens</i> com e sem filme ativo ((□) com filme ativo, (◆) sem filme ativo). A linha vermelha indica a contagem final que define a vida útil do presunto (10^7 UFC/g).	57
Figura 12 Curvas de crescimento de <i>W. viridescens</i> em presunto fatiado embalado a vácuo, armazenado a 8 °C, com e sem filme ativo incorporado com 10 % de OEO e ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto. As linhas pretas (contínuas - s/filme de 15 % de OEO; tracejadas – c/filme de 15% de OEO) representam o ajuste do modelo primário. A linha vermelha indica a contagem final que define a vida útil do presunto (10^7 UFC/g).	57

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 Composição do óleo essencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>), tempos de retenção (min) e concentração relativa (%).	38
Tabela 2 Índices estatísticos utilizados para comparação e validação dos modelos.	47
Tabela 3 Dose mínima inibitória (DMI) (mg por placa de Petri) de OEO avaliada pelo método na fase de vapor.	51
Tabela 4 Valores de média e desvio padrão das análises realizadas em presunto.....	55
Tabela 5 Índices estatísticos obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto embalados a vácuo, com e sem filme incorporado com OEO armazenados a 8 °C..	58
Tabela 6 Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos no crescimento de <i>W. viridescens</i> em presunto a 8 °C, com e sem filme ativo incorporado com OEO.	59
Tabela 7 Espessura e ensaios de tração dos filmes de acetato de celulose com e sem OEO.	62

NOMENCLATURA E ABREVIACES

OEs - 3leos essenciais
OEO - 3leos essenciais de 3regano
BAL - bact3ria 3cido l3ctica
CMI - Concentrao M3nima Inibit3ria
DMI - Dose m3nima inibit3ria
 λ - Fase lag
 μ_{m3x} - velocidade espec3fica m3xima de crescimento
 N_0 - concentrao celular inicial
 N_{m3x} - concentrao celular m3xima)
N(t) - contagem da populao no instante t
 $\mu(t)$ - velocidade espec3fica de crescimento da populao
m - par3metro de curvatura do modelo
 h_0 - considerado o estado fisiol3gico das c3lulas
MRS - Rogosa e Sharpe
BHI - Brain Heart Infusion
NaCl - Concentrao de cloreto de s3dio
 x_{NaCl} - concentrao de cloreto de s3dio (g NaCl/100g presunto)
 C_{Cl} - leitura do equipamento (g Cl/L de soluo)
V - volume da soluo (amostra + 3gua destilada) (L)
m - massa da amostra (g)
 M_{NaCl} - massa molar do cloreto de s3dio (58,44 g/mol)
B.O.D - estufa incubadora
 R^2 - coeficiente de determinao
RMSE - raiz do erro m3dio quadr3tico
UFC - Unidades formadoras de col3nia
UV – ultravioleta
V - Volume (L)
rpm - rotaes por minuto
t - Tempo (h)
T - Temperatura (3C)
TR - Tens3o na Ruptura
E - Elongao
MY - M3dulo de Young
NIST - National Institute of Standards and Techonology
CG-DIC - Cromatografia Gasosa com Detector de Ionizao em Chama
CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada 3 Espectrometria de Massas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 OBJETIVOS.....	17
1.1.2 Objetivos Específicos.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS (OEs).....	19
2.1.1 Óleo essencial de orégano (OEO).....	20
2.2 ACETATO DE CELULOSE.....	22
2.3 EMBALAGEM ATIVA.....	24
2.4 ALTERAÇÕES EM PRODUTOS CÁRNEOS.....	26
2.5 PSEUDOMONAS.....	28
2.5.1 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	29
2.6 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL).....	30
2.6.1 <i>Weissella viridescens</i>	32
2.7 MICROBIOLOGIA PREDITIVA.....	33
2.7.1 Modelos Primários.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 MICRORGANISMOS E PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	37
3.2 ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO.....	37
3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO OEO.....	39
3.3.1 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) em fase líquida.....	39
3.3.2 Determinação da dose mínima inibitória (DMI) na fase vapor.....	39
3.3.3 Determinação do efeito bacteriostático/bactericida.....	41
3.4 ELABORAÇÃO DOS FILMES ATIVOS.....	41
3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO FILME NO MEIO	41

3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIOANA DO FILME ATIVO NA VIDA ÚTIL DO PRESUNTO	42
3.6.1 Caracterização do presunto	42
3.6.2 Preparo e condições de armazenamento das amostras.....	43
3.6.3 Análise microbiana.....	45
3.7 MODELAGEM MATEMÁTICA DAS CURVAS DE INATIVAÇÃO MICROBIANA.....	46
3.7.1 Modelo primário.....	46
3.7.2 Análises estatísticas.....	46
3.8 PROPRIEDADES MECÂNICAS	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO OEO	49
4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO FILME NO MEIO.....	52
4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO FILME NO PRESUNTO.....	56
4.5 PROPRIEDADES MECÂNICAS	62
5. CONCLUSÕES.....	65
6. REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

Evitar a deterioração e a contaminação de alimentos é um desafio crucial e de fundamental importância para a indústria. Por esta razão, a indústria de alimentos está constantemente buscando inovações para atender às diversas exigências nessa área (JACOB; MATHIASSEN; POWELL, 2010). Por um lado, tenta atender às demandas dos consumidores por alimentos de qualidade, tanto do ponto de vista nutricional, quanto sensorial, sem aumentar seu custo. Por outro lado, busca a melhoria da segurança dos alimentos, através do controle do crescimento de microrganismos deteriorantes de alimentos, reduzindo ao mesmo tempo, a utilização de conservadores sintéticos associados a riscos para a saúde e resistência microbiana e buscando utilizar materiais para produção de embalagens sustentáveis e ecológicas (BALAGUER et al., 2013).

O polímero de acetato de celulose é um composto biodegradável, amorfo, não tóxico e inodoro. Com este polímero, é possível formar filmes transparentes (CERQUEIRA et al., 2010), que suportam alta tensão à temperatura ambiente, e com certa flexibilidade. Os filmes à base de acetato de celulose têm sido produzidos e utilizados em alimentos, visto que já se mostraram eficientes na tecnologia de embalagem ativa (UGALDE, 2014).

Nos últimos anos, as embalagens ativas vêm despertando atenção da comunidade científica, especialmente aquelas que apresentam atividades antimicrobianas. A capacidade de interagir de forma desejável com o alimento, mudando as condições de acondicionamento para prolongar a sua vida útil e melhorar a sua segurança ou as suas propriedades sensoriais, fornece a esse tipo de embalagem uma gama de aplicações potenciais (POLA et al., 2016; UGALDE, 2014).

Os filmes antimicrobianos são uma classe particular de embalagens ativas que denotam um meio promissor de aumentar a segurança através da interação com os alimentos ou com o seu ambiente circundante, visando retardar, reduzir ou mesmo inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes (ESPITIA et al., 2013). Filmes que recebem aditivos quando em contato com a superfície do produto liberam, de forma gradativa, o composto para a superfície do alimento, onde a maioria das reações químicas e microbiológicas ocorre (SOARES et al., 2006).

Uma opção seria a incorporação de óleos essenciais (OEs) à matriz polimérica utilizada para a produção dos filmes, com o intuito de promover proteção antimicrobiana ao alimento em questão. Esta

abordagem é de especial interesse para os alimentos à base de carne, produtos lácteos e de panificação, bem como frutas e legumes. Neste contexto, os OEs obtidos de plantas como manjerição, canela, orégano, alecrim, sálvia e tomilho têm ganhando destaque nessa área e sido objeto de estudo (RADAELLI et al., 2016; SANTURIO et al., 2011). Além de suas propriedades organolépticas, esses compostos possuem propriedades antioxidantes e antimicrobianas fortes (BURT, 2004). A atividade antimicrobiana de vários OEs tem sido atribuída à presença de compostos fenólicos. Geralmente, os óleos essenciais têm as propriedades antibacterianas mais fortes, contendo altas concentrações de compostos fenólicos tais como carvacrol, eugenol e timol (BURT, 2004). A eficiência dos óleos essenciais de tomilho, cravo e orégano foi atribuída ao timol, ao eugenol e ao carvacrol, respectivamente (FARAG; DAW; ABO-RAYA, 1989; KIM et al., 1995; LAMBERT et al., 2001; MOLEYAR; NARASIMHAM, 1992).

Os óleos essenciais de orégano (OEO) e outros OEs derivados de especiarias e ervas tiveram suas atividades antimicrobianas testadas contra uma ampla gama de microrganismos deterioradores de alimentos, incluindo diferentes estirpes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SIVROPOULOU et al., 1996). As suas propriedades antimicrobianas foram demonstradas em numerosos estudos (PESAVENTO et al., 2015; SEYDIM; SARIKUS, 2006; TSIGARIDA; SKANDAMIS; NYCHAS, 2000).

Muitas bactérias têm efeitos sobre a vida útil de produtos alimentares refrigerados. As espécies de *Pseudomonas fluorescens* Gram-negativas são capazes de crescer sob temperatura de refrigeração tornando-as um dos principais microrganismos de decomposição em carnes frescas e produtos lácteos (DE SOUSA et al., 2012). A bactéria ácido láctica (BAL) Gram-positiva *Weissella viridescens* é capaz de crescer em condições microaerófilas e anaeróbias, sendo um dos principais microrganismos de decomposição de produtos cárneos refrigerados e embalados à vácuo ou embalagens de atmosfera modificada (SILVA et al., 2017).

Frente ao exposto, o desenvolvimento de filmes ativos incorporados com OEO e a avaliação do efeito dos filmes como embalagem antimicrobiana em presunto fatiado e embalado a vácuo é de fundamental importância, tendo em vista que atende a várias necessidades da indústria de alimentos, além da utilização como embalagem biodegradável e a possibilidade de redução do uso de aditivos sintéticos. A utilização desse agente antimicrobiano pode contribuir para o aumento da vida útil de alimentos

1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana de filmes ativos de acetato de celulose incorporados com diferentes concentrações de OEO no crescimento de *W. viridescens* e *P. fluorescens*, para posterior aplicação dos filmes em presunto em presunto nas concentrações mais efetivas.

1.1.2 Objetivos Específicos

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

- Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) (fase líquida), Dose mínima inibitória (DMI) (fase vapor) e efeito bacteriostático e bactericida do OEO sobre o crescimento de *W. viridescens* e *P. fluorescens*
- Avaliação do efeito do filme ativo, incorporado com diferentes concentrações de OEO, sobre o crescimento de *W. viridescens* e *P. Fluorecens* em fase vapor.
- Caracterização físico-química do presunto utilizado quanto ao pH, atividade de água e concentração de cloreto de sódio.
- Modelagem do crescimento de *W. Viridescens* para avaliação do efeito do filme ativo, incorporado com OEO utilizado no presunto embalado a vácuo e armazenado refrigerado.
- Determinação das propriedades mecânicas do filme ativo, nas concentrações mais efetivas sobre as bactérias estudadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS (OES)

A busca pelo aumento da vida útil e as novas tendências do mercado consumidor por alimentos livres de aditivos sintéticos e produtos com menor impacto ambiental levam à necessidade de novos métodos para a preservação de alimentos. A indústria de alimentos vem mostrando grande interesse em usar derivados de plantas como compostos antimicrobianos, afim de inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes de alimentos (HABERBECK, 2011; MENEZES, 2016).

A aplicação de conservadores naturais, como OEs de plantas e especiarias, vem ganhando destaque na conservação dos alimentos nos últimos anos, sendo bastante estudada (HABERBECK, 2011; KARABAGIAS; BADEKA; KONTOMINAS, 2011; MENEZES, 2016; PETROU et al., 2012).

Segundo Burt (2004), os OEs são óleos líquidos aromáticos e voláteis obtidos de diferentes componentes das plantas (flores, brotos, cascas, ervas, frutas, folhas e raízes) resultando em diferentes composições. Esses compostos voláteis podem ser produzidos por uma variedade de métodos, sendo a destilação a vapor o mais empregado na indústria.

Os OEs são conhecidos por suas propriedades bactericidas, viricida, fungicida e propriedades medicinais, sendo usados na conservação de alimentos e como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, anestésicos locais e remédios espasmolíticos (BAKKALI et al., 2008; NTZIMANI; GIATRAKOU; SAVVAIDIS, 2010).

A composição dos OEs pode ser dependente de fatores como localização geográfica do cultivo, clima, solo, parte da planta utilizada e técnica de extração. A composição molecular do extrato determina seu poder antimicrobiano, sendo de grande importância a identificação de suas moléculas (BURT, 2004).

Os OEs podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações muito diferentes, sendo de duas a quatro moléculas majoritárias (entre 20 a 70%) e traços de outras moléculas, geralmente essas moléculas principais determinam as propriedades biológicas dos OEs (BAGAMBOULA; UYTTENDAELE; DEBEVERE, 2004; BAKKALI et al., 2008; LAMBERT et al., 2001). Porém, alguns estudos concluem que o poder antimicrobiano dos OEs não pode ser confirmado

com base apenas na ação de algumas moléculas predominantes, ele é consequência da sinergia entre todas as moléculas constituintes (CALO et al., 2015; HABERBECK, 2011).

As principais moléculas dos OEs estão, geralmente, divididas em dois grupos, o grupo principal compostos por terpenos e terpenóides, e compostos aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por baixa massa molecular (BAKKALI et al., 2008). A ação antimicrobiana dos OEs 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 (BAGAMBOULA; UYTTENDAELE; DEBEVERE, 2004; BAKKALI et al., 2008).

Vários mecanismos de ação antimicrobiana vêm sendo estudados e propostos ao longo dos anos, mas o efeito antimicrobiano dos OEs ainda não é completamente compreendido (CALO et al., 2015). Autores afirmam que a ação antimicrobiana dos OEs pode ser atribuída à sua capacidade de penetrar através das membranas para o interior das células, inibindo as propriedades funcionais e lipofílicas das células. Os compostos fenólicos podem atuar rompendo a membrana celular, resultando na inibição das propriedades funcionais da célula e, eventualmente, causam vazamento dos conteúdos internos da células (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012). Os mecanismos de ação podem relacionar-se à capacidade dos compostos fenólicos de alterar a permeabilidade das células microbianas, danificar as membranas citoplasmáticas, interferir com o sistema de geração de energia celular (ATP) e interromper a força motora do próton (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012; FRIEDLY et al., 2009). A permeabilidade interrompida da membrana citoplasmática pode resultar na morte celular.

Muitos OEs têm demonstrado potencial antimicrobiano contra uma vasta gama de microrganismos deteriorantes de alimentos (*Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Enterococcus Faecalis*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus Spp.*, *Enterobactérias*, *Vibrio parahaemolyticus*, *P. Fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus spp.*) (BEUCHAT, 1976; CERRUTTI; ALZAMORA, 1996; FARBOOD; MACNEIL; OSTOVAR, 1976; OUATTARA et al., 1997; PANDIT; SHELEF, 1994; POL; SMID, 1999; ULTEE et al., 2000).

2.1.1 Óleo essencial de orégano (OEO)

O OEO é extraído da erva *Origanum vulgare* L., pertencente à família *Lamiacea*, o gênero *Origanum* possui mais de 38 espécies destacando-se *Origanum majorana* e *Origanum vulgare* entre as mais importantes. Nativa de regiões montanhosas do sul da Europa e da Ásia

ocidental, a espécie *Origanum vulgare* L. é cultivada no Brasil principalmente nas regiões sul e sudeste (HABERBECK, 2011; LEE et al., 2016; MENEZES, 2016).

Estudos sobre o potencial antimicrobiano dos OEs mostram que o OEO apresenta resultado de destaque, por ser um dos mais eficazes na atuação como agente antimicrobiano. O OEO é rico em composto fenólicos, responsáveis por sua intensa atividade antimicrobiana, devido à sua capacidade de penetrar o interior da célula e interagir com os mecanismos do metabolismo microbiano (BOTRE et al., 2010; MENEZES, 2016; SOARES; SANTIAGO-SILVA; SILVA, 2008). Carvacrol e timol são reportados na literatura como os compostos fenólicos presentes em maior quantidade no OEO, sendo os principais responsáveis pela intensa atividade antimicrobiana, que pode estar relacionada com danos na membrana celular, equilíbrio do pH e dos íons orgânicos (HABERBECK, 2011; LAMBERT et al., 2001).

O OEO tem se revelado eficiente contra uma série de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras e fungos, suas propriedades antimicrobianas têm sido demonstradas em diversos estudos (BOSKOVIC et al., 2015; MARTUCCI et al., 2015; MAZZARRINO et al., 2015; TSIGARIDA; SKANDAMIS; NYCHAS, 2000).

Diferentes frações de OEO vêm demonstrando ter atividade contra várias espécies de bactérias (AGUIRRE; BORNEO; LEON, 2013; MARTUCCI et al., 2015; MAZZARRINO et al., 2015; PASTER et al., 1990). A atividade antimicrobiana do OEO no crescimento da flora natural de bactérias ácido lácticas em presunto embalado à vácuo foi avaliada, o OEO apresentou efeito antimicrobiano principalmente sobre as amostras armazenadas em temperatura de refrigeração, prolongando a vida útil do presunto armazenado a 6 °C em 30 dias (MENEZES, 2016). Atrea et al. (2009) adicionaram OEO a polvos armazenados em embalagem à vácuo sob refrigeração e a vida útil do produto passou de 9 dias, sem OEO, para 17 e 23 dias quando 2000 e 4000 ppm de OEO foi utilizado, respectivamente.

Seydim e Sarikus (2006) compararam filmes comestíveis de proteína de soro de leite combinados com OEO com filmes incorporados com óleo essencial de alho e alecrim e os com OEO se mostraram mais eficazes contra o crescimento de *E. coli* O157: H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *L. monocytogenes* e *Lactobacillus plantarum*.

Extrato de chá verde e OEO foram incorporados em um copolímero de etileno-álcool vinílico e a capacidade antimicrobiana dos filmes foi testada contra *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* e

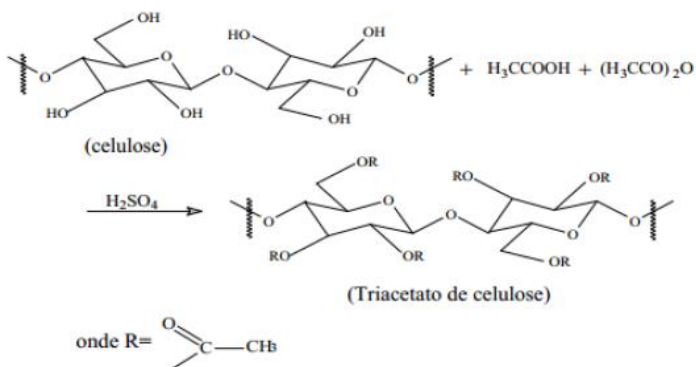
Penicillium expansum. Os resultados mostraram a inibição do crescimento microbiano em meios líquidos e em fase vapor, demonstrando que os filmes desenvolvidos apresentam forte potencial para a utilização como filmes ativos de embalagens de alimentos (MURIEL-GALET et al., 2015).

2.2 ACETATO DE CELULOSE

A demanda por materiais para produção de embalagens sustentáveis e ecológicas com propriedades físicas, mecânicas e de barreira superiores está aumentando. A maioria dos materiais utilizados atualmente em embalagens para produtos alimentares, médicos e farmacêuticos, bem como em aplicações industriais, não são degradáveis (ABDUL KHALIL et al., 2016). Numerosos estudos têm sido realizados sobre a utilização de materiais que atendam tais requisitos para o desenvolvimento de embalagens. Embora melhorias significativas tenham sido obtidas, continua a faltar um equilíbrio entre as preocupações ambientais, as considerações econômicas e o desempenho das embalagens nos produtos.

Um material importante e que vem ganhando destaque para a utilização em embalagens é o acetato de celulose, devido às suas diferentes aplicabilidades, como fibra, filmes e diversos tipos de filtros e membranas (EDGAR et al., 2001). O acetato de celulose é produzido a partir da reação de acetilação da celulose, em que o grau de substituição pode variar de 0 a 3, dependendo da sua estrutura e das condições reacionais. Diferentes graus de acetilação podem afetar características como a solubilidade e a biodegradabilidade do composto (MELO, 2010; EDGAR et al., 2001). É um éster produzido pela reação da celulose com anidrido acético e ácido acético, utilizando o ácido sulfúrico como catalisador da reação (Figura 1) (UGALDE, 2014; WAN DAUD; DJUNED, 2015).

Figura 1 Esquema da reação de produção do acetato de celulose.



Fonte: (MEIRELES, 2007).

O acetato de celulose é um polímero biodegradável, amorfo, não tóxico e inodoro, permeável ao vapor de água, estável e solúvel em acetona dependendo do grau de substituição. Este polímero pode formar filmes transparentes e rígidos, com certa flexibilidade que suportam alta tensão à temperatura ambiente (CERQUEIRA et al., 2010).

Filmes à base de acetato de celulose vêm sendo bastante estudados, devido às excelentes propriedades mecânicas, estabilidade química, características de permeação e compatibilidade biológica apresentadas pela celulose, que são requisitos importantes para a indústria alimentícia. Esses filmes à base de acetato de celulose têm sido produzidos e utilizados em alimentos, visto que já se mostraram eficientes na tecnologia de embalagem ativa (UGALDE, 2014) pois, quando em contato com o alimento, o polímero é capaz de libertar antimicrobianos eficazmente, garantindo sua conservação (COOKSEY, 2005).

Pires et al. (2008) avaliaram o efeito de biofilmes à base de acetato de celulose incorporados com nisina, natamicina e a combinação de ambos, *in vitro* frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Penicillium* sp. e *Geotrichum* sp., em fatias de queijo mozzarella, com relação ao desenvolvimento de *S. aureus*, bolores e leveduras, ao longo de 15 dias. Os biofilmes contendo nisina mostraram um efeito antimicrobiano *in vitro* contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*, enquanto o biofilme contendo natamicina mostrou-se eficaz frente a *Penicillium* sp. e *Geotrichum* sp.. Os biofilmes contendo nisina + natamicina

prolongaram a vida útil dos queijos por 6 dias, em comparação ao controle (sem os aditivos).

Resultados positivos foram obtidos no estudo da produção de filmes ativos à base de acetato de celulose incorporados com diferentes concentrações de OEO e argila montmorilonita organofílica para controlar o crescimento de fungos fitopatogênicos (*Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer* e *Geotrichum candidum*). Os filmes apresentaram alta atividade antifúngica contra os fitopatógenos testados, principalmente em fase de vapor. Este estudo também denota um potencial para a utilização dos filmes ativos como embalagens para alimentos (POLA et al., 2016).

2.3 EMBALAGEM ATIVA

A embalagem tem como função preservar ao máximo a qualidade do produto, criando condições que minimizem suas alterações químicas, bioquímicas e microbiológicas. Entretanto, o conceito de que todas essas funções devem ser exercidas com a mínima interação entre o alimento e a embalagem nem sempre deve ser considerado pois várias tecnologias vêm sendo desenvolvidas nas últimas décadas, no sentido de proporcionar uma interação que objetiva manter a qualidade e a segurança do alimento. Desta forma, as embalagens ativas vêm despertando muita atenção do mercado e da comunidade científica.

A embalagens ativas são amplamente utilizadas para manter a qualidade dos alimentos, aumentar a vida útil e manter a higiene dos produtos perecíveis, especialmente os susceptíveis à oxidação e aos efeitos microbiológicos (ABDUL KHALIL et al., 2016; GEMILI; YEMENICIOĞLU; ALTINKAYA, 2009; OTONI et al., 2016).

Wurlitzer (2007) conceituou embalagem ativa como aquela que interage com o produto nos pontos de contato embalagem-alimento, para restringir o crescimento de microrganismos ou então reduzir os processos de deterioração da qualidade. Segundo Scannell et al. (2000), embalagem ativa é um conceito que combina avanços em tecnologia e segurança dos alimentos, embalagens e materiais, em um esforço para atender às demandas dos consumidores por alimentos mais frescos e seguros.

Dentre as embalagens ativas, destacam-se as embalagens antimicrobianas pela capacidade de interagir com os alimentos e prolongar a sua vida útil (EMIROĞLU et al., 2010). As embalagens antimicrobianas surgem como um meio promissor, a fim de aumentar a segurança dos alimentos através da interação destes e/ou ambiente

circundante, tendo como objetivo retardar, reduzir ou mesmo inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e de deterioração (ESPITIA et al., 2013; GEMILI; YEMENICIOG˘LU; ALTINKAYA, 2009).

As embalagens antimicrobianas permitem a liberação do agente de interesse a uma taxa adequada durante o armazenamento, podendo manter uma concentração crítica necessária para inibir o crescimento microbiano (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

Este tipo de embalagem ativa é de especial interesse para os alimentos comumente sujeitos à deterioração, incluindo carne, produtos lácteos e de padaria, bem como frutas e legumes (CORBO et al., 2015). Cada um destes produtos tem mecanismos diferentes de deterioração, que deverão ser entendidos para que se possa definir uma embalagem antimicrobiana apropriada para cada caso em particular.

Estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver novas embalagens com propriedades antimicrobianas (HAUSER; WUNDERLICH, 2011). Observou-se que o efeito da embalagem antimicrobiana dependerá do microrganismo alvo e da sua velocidade de crescimento e das características físico-químicas do alimento em questão, entre outros fatores. As embalagens ativas antimicrobianas podem reduzir a velocidade de crescimento microbiano, aumentar a fase de latência e/ou inativar os microrganismos presentes no alimento alvo ou na própria embalagem (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

Com o objetivo de atender às demandas dos consumidores por materiais de embalagem de alimentos mais naturais, potencialmente biodegradáveis e recicláveis, os estudos têm focado na incorporação de compostos antimicrobianos naturais, como extratos de plantas nos materiais de embalagens biodegradáveis (CUTTER, 2006; DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Foram desenvolvidos e avaliados filmes ativos incorporados com agente antimicrobiano (7% de ácido sórbico) na conservação da manteiga, após a mesma ser fatiada e inoculada com fungos filamentosos e leveduras. As amostras foram envolvidas com o filme ativo, embaladas em papel alumínio e armazenadas sob temperatura de refrigeração (7 °C). A contagem inicial de fungos filamentosos com leveduras na manteiga foi de 3×10^6 UFC/g e após 10 e 20 dias de estocagem observou-se redução de 1 ciclo *log* (9×10^5 UFC/g) e 2 ciclos *log* (8×10^4 UFC/g) respectivamente, para a manteiga embalada com filme incorporado com 7% de ácido sórbico. Os pesquisadores concluíram que o filme antimicrobiano apresentou alta eficiência na redução de fungos filamentosos e leveduras em manteiga (MORAES et al., 2007).

2.4 ALTERAÇÕES EM PRODUTOS CÁRNEOS

Produtos cárneos são parte importante da dieta humana, porém são suscetíveis à decomposição com o tempo, levando a perdas econômicas na indústria de carnes (GRAM et al., 2002). Em geral, além das alterações físico-químicas, o alimento é propenso também ao crescimento microbiano, resultando na deterioração indesejável (POTHAKOS et al., 2015).

A carne fresca é altamente perecível (BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996), devido aos parâmetros intrínsecos e à exposição direta da carcaça ao meio ambiente (POTHAKOS et al., 2015). O alto teor de água, pH que corresponde ao intervalo ótimo para o crescimento microbiano, disponibilidade de nutrientes, bem como vitaminas e minerais, tornam a carne e os produtos à base de carne alimentos favoráveis ao crescimento microbiano (BUNCIC et al., 2014).

Os microrganismos presentes na carne e em seus derivados podem ser bactérias, leveduras, bolores e vírus, dependendo do tipo de produto. As questões microbianas na indústria de carnes têm surgido principalmente devido a bactérias (HUI, 2012). Segundo Jayasena e Jo (2013), as principais bactérias de deterioração na carne são *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Brochothri thermosphacta*, *Moraxella*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Proteus*. Essas bactérias deteriorantes levam a mudanças negativas na aparência da carne e seus derivados, produzindo odor, textura, sabor e cor indesejáveis (BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996).

Quando se combina temperatura de refrigeração e condições de microaerofilia (embalagens a vácuo ou embalagens com atmosfera modificada) no armazenamento de produtos cárneos, as bactérias deteriorantes que predominam no alimento são as ácido lácticas (BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996; VERMEIREN; DEVLIEGHIERE; DEBEVERE, 2004). Franz e Von Holy (1996), isso ocorre, também, devido ao fato das BAL serem resistentes ao sal e ao nitrito.

As principais espécies de BAL encontradas de forma natural em carnes e produtos cárneos são: *Leuconostoc mesenteroides*, *L. plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus viridescens* (*W. Viridescens*) e *Lactobacillus curvatus* (HUGAS, 1998). Dentre essas, de acordo com (MORISHITA; SHIROMIZU, 1986), a espécie de *Lactobacillus* encontrada mais frequentemente em produtos cárneos é a *L. viridescens* (*W.viridescens*).

Também classificada como sendo do gênero *Weissella* (PATTERSON et al., 2010), a espécie *L. viridescens* pode produzir peróxidos que reagem com os pigmentos dos produtos cárneos, causando o esverdeamento dos mesmos (MILBOURNE, 1983). Patterson et al. (2010) avaliaram o crescimento de *L. viridiscens* em carne cozida de aves, pois esse foi o microrganismo deteriorante encontrado em maior quantidade no alimento. 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*).

Um outro grupo de bactérias comumente ligado à deterioração de produtos cárneos são as *Pseudomonas* sp., na maioria dos casos este grupo de bactérias é responsável pela deterioração de carne armazenada aerobicamente em diferentes temperaturas. Sob armazenamento aeróbio, três espécies de *Pseudomonas* sp. são as mais importantes como bactérias deteriorantes de produtos cárneos, *Pseudomonas. fragi*, *P. fluorescens* e *Pseudomonas. lundensis* (NYCHAS et al., 2008).

A população de *Pseudomonas* sp. ao nível arbitrário de 10^{5-6} UFC / g foi atribuída à formação de limo e odores. No entanto, na prática, essas características se tornam evidentes quando as *Pseudomonas* esgotam a glicose e o lactato presentes na carne e começam a metabolizar compostos nitrogenados, como aminoácidos (NYCHAS et al., 2008). A *Pseudomonas* mais comumente encontrada na carne é *Pseudomonas fluorescens*, que é caracterizada pela produção de um pigmento solúvel chamado pioverdina (GONÇALVES et al., 2017).

Widders et al. (1995) relataram que a contaminação em carcaças inteiras de carne a 4 °C por *Pseudomonas* sp. atingiu um pico de $3,90 \log_{10}$ UFC/cm² e $4,54 \log_{10}$ UFC/cm² em superfícies de carne à mesma temperatura. *P. fragi* e *P. fluorescens* causam deterioração na qualidade da carne e dos produtos lácteos devido à produção de proteases extracelulares e lipases a baixas temperaturas (LEBERT; BEGOT; LEBERT, 1998). Muitos estudos têm sido realizados sobre a ocorrência e níveis de contaminação em produtos cárneos por *Pseudomonas* sp. (COATES et al., 1995; MOLIN; TERNSTRÖM, 1982; WIDDERS et al., 1995). Além da deterioração microbiana, a carne e seus produtos também são propensos à contaminação por microrganismos patogênicos. Nove principais bactérias patogênicas associadas a carnes e produtos derivados incluem *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni*, *E.*

coli O157: H7, *Clostridium perfringens*, *C.botulinum*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *Yesinia enterocolitica*, causando doenças ou mesmo morte em humanos (HUI, 2012).

Diferentes tecnologias podem ser aplicadas a produtos cárneos, a fim de inativar microrganismos deteriorantes. Alguns processos, como o congelamento, a refrigeração ou o processamento térmico, no entanto, podem não proporcionar completamente a segurança dos produtos. Os agentes antimicrobianos têm sido amplamente utilizados neste meio. A incorporação de compostos antimicrobianos ganharam destaque como uma técnica alternativa para este problema. Os compostos ativos preservam as características desejáveis da maioria dos alimentos, proporcionando efeitos preventivos durante e pós processamento, prolongando a vida útil dos alimentos (ROSS et al., 2003).

A legislação brasileira não estabelece um limite para a concentração de microbióta deteriorante, mas muitos autores (KARABAGIAS; BADEKA; KONTOMINAS, 2011; KREYENSCHMIDT et al., 2010; SLONGO et al., 2009) 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. BUOSI (2016) definiu $6,5 \log (15 \text{ Ln})$ de *Pseudomonas* spp. como o valor determinante do final da vida útil do peito de peru *in natura* resfriado.

2.5 PSEUDOMONAS

Ao gênero *Pseudomonas* pertencem as bactérias Gram-negativas, aeróbias, mesófilas e psicrotófilas, caracterizadas por necessidades nutricionais simples (FRAPOLLI; DÉFAGO; MOËNNE-LOCCOZ, 2007). As bactérias do gênero *Pseudomonas* se adaptam a várias condições, portanto, podem ser encontradas em plantas, tecidos animais, alimentos e especialmente no solo e na água (FRANZETTI; SCARPELUNI, 2007).

A produção enzimática de proteases, lipases e fosfolipases pelos microrganismos está relacionada com a temperatura, fase de crescimento do microorganismo, oxigênio disponível e composição do meio, tendo sua atividade dependente de temperatura, pH e concentração do substrato. A produção de enzimas por espécies de *Pseudomonas* ocorre principalmente no final da fase lag de crescimento celular e em temperaturas mais baixas que aquelas ótimas para a multiplicação do microorganismo (RIBEIRO, 2015).

Este gênero compreende várias espécies, como a *Pseudomonas aeruginosa*, conhecida como agente patogênico humano, frequentemente observado em infecções nosocomiais, especialmente em doentes imunodeficientes e a *P. fluorescens*, que provoca deterioração dos alimentos (TÜMMLER et al., 2014).

As bactérias pertencentes a esse grupo são produtoras de enzimas proteolíticas e lipolíticas. É importante notar que muitas enzimas produzidas por bactérias do gênero *Pseudomonas*, em particular as proteases, são resistentes ao calor, o que resulta na dificuldade de inativação da sua atividade após os processos de tratamento térmico. Esse fenômeno é muito importante no leite UHT e nos produtos lácteos, nos quais a protease pode causar fenômenos de coagulação e instabilidade, respectivamente (DATTA; DEETH, 2001).

Os membros deste gênero estão frequentemente envolvidos na degradação e deterioração de uma vasta gama de alimentos derivados de plantas ou animais. (MELO, 2010).

2.5.1 *Pseudomonas fluorescens*

P. fluorescens é uma bactéria deteriorante de alimentos, capaz de causar perdas econômicas graves na indústria de alimentos, devido à sua capacidade de produzir compostos extracelulares e muitas vezes termoestáveis (ANDREANI et al., 2015). É uma bactéria Gram-negativa, aeróbia, da família *Pseudomonadaceae*, que não forma esporos. A sua morfologia corresponde a um bastonete, e é facilmente encontrada na água e nos solos, sendo bastante versátil, no que diz respeito à sua fonte de nutrientes. Possui temperatura ótima de crescimento compreendida entre 25 e 30 °C, a pH neutro (RAMOS, 2008).

Esta bactéria psicrófila é capaz de crescer em temperaturas de refrigeração, utilizadas para controlar o crescimento bacteriano em alimentos. Portanto, é de difícil controle limitar o seu crescimento. Assim, os esforços para encontrar métodos alternativos e eficazes para proteger alimentos com compostos naturais, como óleos essenciais e seus constituintes, estão aumentando (DE SOUSA et al., 2012).

P. fluorescens faz parte da microbiota de uma ampla gama de matrizes de alimentos, incluindo legumes prontos para comer (CALDERA; FRANZETTI, 2014), peixe cru (especialmente sushi ou sashimi), carne e produtos lácteos (ARNAUT-ROLLIER et al., 1999; FRANZETTI; SCARPELUNI, 2007). Isto é devido à sua extrema adaptabilidade e versatilidade (SILBY et al., 2011) e sua capacidade de se multiplicar a temperaturas de refrigeração (DECIMO et al., 2014).

Este tipo de microrganismo pode provocar modificações indesejáveis em produtos alimentares como resultado de reações enzimáticas ou produção de moléculas pigmentadas (ANDREANI et al., 2015b). Um exemplo bem conhecido é representado pelo "queijo mozarela azul" que ocorreu na Europa em 2010 (Relatório Anual do RASFF), quando os consumidores notaram uma coloração azul no queijo mozarela depois de abrir as embalagens. Cerca de 70.000 bolas de queijo mozarela foram apreendidas pelas autoridades competentes. As estirpes foram identificadas como sendo pertencentes ao grupo *P. fluorescens*.

O peixe fresco e minimamente processado é um dos produtos alimentares mais perecíveis devido a reações químicas e enzimáticas e sua rápida deterioração microbiológica. De acordo com (GRAM et al., 2002; GRAM; DALGAARD, 2002) *P. fluorescens* é um dos microrganismos deteriorantes de frutos do mar mais relevantes, quando o peixe e os produtos à base de peixe são embalados aerobicamente.

A principal microbiota responsável pela deterioração na carne fresca e produtos lácteos, durante a armazenagem refrigerada aeróbia, é composta por espécies de *Pseudomonas*.

2.6 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

As bactérias pertencentes a este grupo são Gram positivas, não tem motilidade, podem ser cocos ou bacilos, não formadoras de esporos, catalase negativa, desprovidas de citocromos, que crescem sob condições microaerófilas e condições anaeróbias, ácido tolerantes, sendo consideradas fastidiosas porque exigem substratos complexos (ADAMBERG et al., 2003; BURGAIN et al., 2014; GÓMEZ-ROJO et al., 2015). São amplamente encontradas na natureza e capazes de se desenvolverem sob diferentes condições ambientais (BURGAIN et al., 2014).

Segundo Jay (2005), são 15 gêneros que compreendem este grupo: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Microbacterium* e *Propionibacterium*.

As BAL produzem isômeros de ácido láctico como produtos finais de fermentação de glicose (LEITE, 2006), quando o ácido láctico apresenta rotação ótica para a esquerda ele é denominado Levorotatório (L), e quando apresentar rotação para a direita, ele é denominado Dextrorotatório (D), podendo ainda ser chamado de racêmico quando há

mistura dos dois isômeros de ácido lático (DL) (GÓMEZ-ROJO et al., 2015; SILVA, 2015). Possuem a capacidade de fermentar a arginina variando de acordo com as espécies, com uma temperatura de crescimento que varia entre 15 e 45 °C. A sua morfologia varia de células esféricas ou lenticulares para hastes irregulares (CHELO; ZÉ-ZÉ; TENREIRO, 2010; GÓMEZ-ROJO et al., 2015).

De acordo com Jay (2005), as BAL são ainda classificadas quanto aos produtos finais de sua fermentação em dois grupos: homofermentativas e heterofermentativas. As bactérias homofermentativas produzem ácido lático como produto principal da fermentação de glicose. As heterofermentativas produzem outros produtos além de ácido lático, que incluem dióxido de carbono, ácido acético e etanol.

Este grupo de bactérias apresenta muitas aplicações na indústria de alimentos, principalmente no setor lácteo (BURGAIN et al., 2014). As BAL possuem propriedades inibidoras, capazes de produzir uma série de substâncias que restringem o desenvolvimento das populações bacterianas e podem agir como concorrentes ou inibidores de outros microrganismos deteriorantes (GHANBARI et al., 2013; MENEZES, 2016). Alguns autores têm mostrado que as BAL podem reduzir o crescimento de *L. monocytogenes* em carne e frutos do mar (BUDDE et al., 2003; JACOBSEN; BUDDE; KOCH, 2003; TAHIRI et al., 2009) além se serem capazes de inibir outros patógenos de origem alimentar (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella Typhimurim*, *S. enteritidis* e *S. aureus*) (TRIAS et al., 2008).

Apesar da sua influência positiva como inibidora de vários microrganismos, numerosos estudos associaram as BAL a processos de deterioração de peixes, carnes e principalmente produtos cárneos embalados a vácuo ou atmosfera modificada e armazenados a temperaturas de refrigeração. As BAL deteriorantes podem causar efeitos indesejados, tais como sabores e odores desagradáveis, descoloração, produção de gás, diminuição do pH e produção de muco, causando a degradação prematura e redução da vida útil do produto. Um fato bastante conhecido é o aparecimento de manchas verdes na superfície da carne. Este fato é devido à sua capacidade de produzir peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que reage com o pigmentos da carne dando origem a cor verde (NIVEN; EVANS, 1957; PEIRSON; GUAN; HOLLEY, 2003).

2.6.1 *Weissella viridescens*

Entre as BAL, o gênero *Weissella* foi descrito pela primeira vez por Collins et al. (1993) que, com base nas sequências de rRNA 16S, reclassificaram as espécies *Leuconostoc paramesenteroides* e espécies relacionadas, tais como *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor* e *L. viridescens* no novo gênero *Weissella*. As espécies deste gênero não formam esporos, são Gram-positivas, catalase-negativas, obrigatoriamente heterofermentativas e anaeróbias facultativas.

O crescimento microbiano é a causa mais comum de deterioração dos alimentos, que pode ser notada por aspectos visíveis como limo, modificações de textura e/ou sabor indesejável (GRAM et al., 2002). A redução da vida útil da carne e dos produtos à base de carne tem sido associada ao crescimento de BAL, nas quais *W. viridescens* tem sido relatado como um dos principais organismos de decomposição, causando principalmente o esverdeamento da carne (HAN; CASTELL-PEREZ; MOREIRA, 2007; HU et al., 2009; SANTOS et al., 2005).

Além de mudanças na coloração da carne, a *W. viridescens*, juntamente com outras BAL, também está relacionada a numerosos processos de deterioração em produtos cárneos, como a perda de vácuo, inchaço das embalagens, descoloração e uma diminuição do pH (COMI; IACUMIN, 2012; SAMELIS; KAKOURI; REMENTZIS, 2000).

Entre as cepas de BAL resistentes ao calor que causam deterioração de produtos cárneos, *W. viridescens* se mostrou capaz de sobreviver a determinados tratamentos térmicos e induzir alterações sensoriais (COMI; IACUMIN, 2012; SAMELIS; KAKOURI; REMENTZIS, 2000). Borch et al. (1996), Milbourne (1983), relataram que, a resistência térmica relativamente elevada resulta das boas capacidades adaptativas de *W. viridescens* para sobreviver ao tratamento térmico.

Segundo Franz e Von Holy (1996), nem todos os processos térmicos utilizados industrialmente são efetivos na inativação deste grupo de microrganismos, sugerindo que eles possam existir no alimento, após os processos térmicos. Kameník et al. (2015), avaliaram a resistência térmica de quatro cepas de *W. viridescens* isoladas de salsicha defumada a quente, e concluíram que todas as cepas foram capazes de sobreviver à temperatura de 50 °C e nenhuma das cepas foi capaz de sobreviver a 70 °C.

2.7 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

Microbiologia preditiva é uma área de pesquisa que descreve através de modelos matemáticos a dinâmica (crescimento e sobrevivência) populacional de microrganismos submetidos a mudanças físicas, químicas e biológicas durante o processamento, transporte, distribuição e armazenamento de alimentos (HUANG, 2014).

A microbiologia preditiva tornou-se uma ferramenta importante na previsão microbiana de vida útil, controle de qualidade e avaliações de risco (KOUTSOUMANIS; LAMBROPOULOU; NYCHAS, 1999; MATARAGAS et al., 2006). Além disso, a microbiologia preditiva é considerada uma área multidisciplinar, que compreende áreas da matemática, engenharia, química e biologia fornecendo prognósticos comportamentais em determinados alimentos sob condições definidas (SCHAFFNER; LABUZA, 1997; MCDONALD; SUN, 1999).

Na microbiologia de alimentos até por volta de 1920, aproximações qualitativas na descrição do crescimento microbiológico eram predominantes até o advento da microbiologia preditiva (MCMEEKIN et al., 2008). Porém, estima-se que foi a partir da década de 1980 que os modelos matemáticos para prever o comportamento dos microrganismos obtiveram um grande desenvolvimento (CARRASCO et al., 2012; NAKASHIMA; ANDRÉ; FRANCO, 2000).

Muitos estudos utilizam a modelagem matemática para avaliar a vida útil de alimentos. Slongo (2008), ajustou os dados de crescimento de bactérias ácido lácticas em presunto fatiado submetido à alta pressão hidrostática, aos modelos primários de Gompertz modificado e logístico. Menezes (2016), utilizou o modelo de Baranyi e Roberts para prever o crescimento de microbiota natural de BAL em presunto embalado à vácuo sob condições não isotérmicas. Os resultados mostraram que o modelo preditivo estudado tem a possibilidade de ser utilizado para prever a vida útil de produtos cárneos.

Os modelos preditivos são classificados de acordo com o comportamento microbiano que descrevem. Portanto, existem modelos de crescimento, de inativação e de limites de crescimento (WHITING, 1995; MCMEEKIN et al., 2002). Os modelos matemáticos utilizados em microbiologia preditiva para descrever o comportamento microbiano de inativação e crescimento isotérmico são classificados como modelos primários e secundários (WHITING; BUCHANAN, 1993). A bem conhecida classificação de modelos primários e secundários foi estabelecida há mais de 20 anos (WHITING; BUCHANAN, 1993) e tem sido amplamente utilizada.

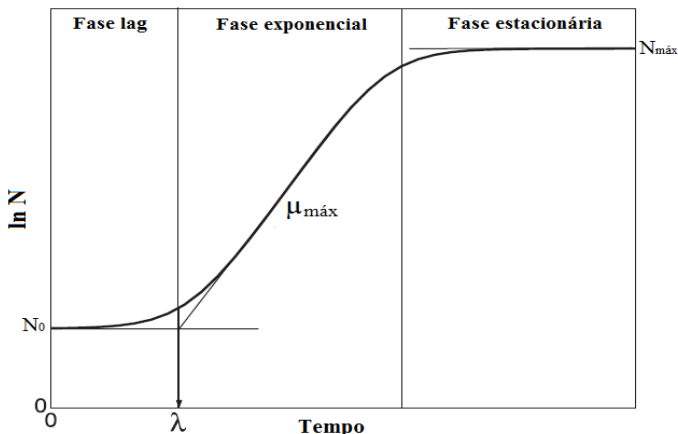
Os modelos primários descrevem a variação do número de microrganismos ou outra resposta microbiana em função do tempo, sob um único conjunto de condições constantes (HUANG, 2014). Os modelos secundários descrevem os parâmetros obtidos no modelo primário em relação a uma ou mais condições ambientais, como variações de temperatura, por exemplo.

2.7.1 Modelos Primários

Os modelos primários descrevem as alterações na população microbiana ou nas respostas microbianas em relação ao tempo, para determinadas condições ambientais. Geralmente, uma curva de crescimento microbiano pode ser caracterizada por três parâmetros: duração da fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ), e população máxima atingida ($N_{m\acute{a}x}$) ou aumento logarítmico da população ($N_{m\acute{a}x} - N_0$), onde N_0 é a população inicial (LEBERT e LEBERT, 2006). Tais parâmetros e as fases distintas do crescimento microbiano, que cada parâmetro representa, estão representados na Figura 2.

Figura 2 Curva característica do crescimento microbiano em função do tempo.

Parâmetros de crescimento. λ (fase lag), $\mu_{m\acute{a}x}$ (velocidade específica máxima de crescimento), N_0 (concentração celular inicial) e $N_{m\acute{a}x}$ (concentração celular máxima).



Fonte: Adaptado de: (SWINNEN et al., 2004).

Os modelos matemáticos de crescimento microbiano têm sua construção baseada em um bloco elementar que descreve a evolução da população através de uma equação diferencial de primeira ordem (BERNAERTS et al., 2004), conforme apresentado na Equação 1:

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu(t, N, \text{cond})N(t) \quad (2.1)$$

Onde $N(t)$ é a contagem da população no instante t e $\mu(t)$ é a velocidade específica de crescimento da população, que depende do conjunto de condições ambientais a que a população é submetida, além de fatores intrínsecos à própria população (LONGHI, 2012).

Um dos modelos primários de crescimento mais utilizados na microbiologia preditiva é o modelo de Baranyi e Roberts, devido aos seguintes fatores: fácil de usar por ter *softwares* disponíveis onde as equações já estão inseridas, é aplicável em condições ambientais dinâmicas, boa capacidade de ajuste, e por fim a maior parte dos parâmetros do modelo são biologicamente interpretáveis (LEBERT e LEBERT, 2006; VAN IMPE et al., 2005). Neste trabalho, foi utilizado o modelo primário de Baranyi e Roberts para obtenção dos parâmetros de crescimento como descrito pelas equações (2.2 e 2.3).

A Equação 2.2 descreve o modelo de Baranyi e Roberts (BARANYI; ROBERTS, 1994) e na Equação 2.3 está representada a função de ajuste deste modelo.

$$\ln(N) = \ln(N_0) + \mu F(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu F(t)} - 1}{e^{m(\ln(N_{\text{máx}}/N_0))}} \right) \quad (2.2)$$

$$F(t) = t + \frac{1}{\mu} \ln \left(e^{(-\mu t)} + e^{(-h_0)} - e^{[-\mu t - h_0]} \right) \quad (2.3)$$

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 que é dado pela Equação 2.4:

$$h_0 = \mu \lambda \quad (2.4)$$

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS E PREPARAÇÃO DO INÓCULO

W. viridescens (CCT 5843 ATCC 12706, Lote 22,07) e *P. fluorescentes* (CCT 7393 ATCC 13525, Lote 25,06) foram adquiridas a partir de culturas puras, na forma liofilizada da coleção de Culturas André Tosello (Fundação Tropical de Culturas André Tosello, Campinas, Brasil). As cepas de *W. viridescens* e *P. fluorescens* foram reidratadas, conforme indicação e cultivadas em meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e Brain Heart Infusion (BHI), respectivamente.

Em seguida, as estirpes foram armazenadas em microtubos de polipropileno com meio MRS e meio BHI contendo 20% de glicerol a -24 °C até sua utilização. Para a preparação do inóculo, *W. viridescens* foi inoculada em caldo MRS a 30 °C durante 18 h, para atingir uma concentração bacteriana de 10⁹ UFC/mL. A reativação da cultura para a preparação do inóculo de *P. fluorescens* foi realizada em caldo BHI a 30 °C por 24 h, para atingir uma concentração bacteriana de 10⁷ UFC/mL. As concentrações bacterianas foram estabelecidas anteriormente, pelo grupo de pesquisa em microbiologia preditiva do laboratório de Engenharia Bíoquímica (Engebio) e confirmadas através de plaqueamento.

3.2 ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

A composição química dos óleos essenciais foi determinada por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama (CG-DIC). As análises foram realizadas no Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau (IPTB), na Universidade Regional de Blumenau (FURB) (SC).

A análise de CG-EM foi realizada em cromatógrafo GC-MS (QP2010 Plus Shimadzu), equipado com uma coluna capilar RTx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O gás Hélio (He) foi utilizado como gás de arraste, sob fluxo constante de 1 mL/min. A coluna foi aquecida a 60 °C por 5 min, elevada a 240 °C a uma taxa de aquecimento de 3 °C/min e mantida nessa temperatura por 5 min. As amostras foram diluídas em éter etílico e injetadas (1 µL) a 250 °C. A identificação dos compostos foi realizada pela comparação do espectro de massa com o banco de dados da Espectroteca NIST (*National Institute of Standards and Technology*) (2008).

A análise de CG-DIC foi realizada em cromatógrafo GC-FID 2010 Shimadzu, equipado com uma coluna capilar OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), nas mesmas condições da análise de CG-EM. A composição dos óleos foi determinada pelo método de normalização de áreas.

Tabela 1 Composição do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), tempos de retenção (min) e concentração relativa (%).

Composto	Tempo de retenção (min)	Concentração relativa (%)	Concentração relativa (%)
		CG-EM	CG-DIC
α -tujeno	6,67	0,40	0,19
α -pineno	6,93	0,69	0,33
canfeno	7,49	0,33	0,17
β -pineno	8,62	1,73	1,00
mirceno	9,25	0,70	0,42
α -felandreno	9,81	0,38	0,14
α -terpineno	10,36	1,28	0,47
o-cimeno	10,73	5,55	3,82
limoneno	10,91	1,75	0,78
1,8 cineol	11,01	1,84	0,85
γ -terpineno	12,33	5,25	3,60
linalol	14,31	3,21	1,93
cânfora	16,34	1,53	0,38
borneol	17,40	2,13	0,88
4-terpineol	17,96	1,68	0,67
α -terpineol	18,63	0,51	0,15
timol	23,50	5,66	2,32
carvacrol	24,22	53,76	76,10
β -cariofileno	28,83	6,32	3,83
β -bisaboleno	32,53	0,24	0,10
óxido de cariofileno	35,43	0,85	0,35

Fonte: ALMEIDA, 2017.

3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO OEO

3.3.1 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) em fase líquida

A CMI foi determinada conforme o método baseado em Ben arfa., 2006 com modificações. Diferentes concentrações de OEO puro foram avaliadas no crescimento de *W. viridescens* e *P. fluorescens*. As concentrações testadas para *W. viridescens* foram de 0,92, 1,38, 1,84 e 2,3 mg/mL, enquanto que para *P. fluorescens* as concentrações testadas foram 0,46, 0,92 e 2,3 mg/mL. Essas concentrações foram escolhidas com base em estudos anteriores. A concentração foi definida como massa (mg) de OEO por 10 mL de meio. Os tubos contendo 10 mL de meio (MRS para *W. viridescens* e BHI para *P. fluorescens*) foram inoculados com 1 mL da suspensão microbiana (cerca de 10^4 UFC/mL), que foi obtida por diluição do inóculo. Em seguida, um papel de filtro esterilizado (1,3 x 5,5 cm, correspondente à mesma altura do meio no tubo) foi impregnado homoganeamente com uma dose pré-definida de OEO e imediatamente introduzido no tubo. Realizou-se um controle sem papel de filtro. As amostras destrutivas foram analisadas após 12, 24 e 48 h de incubação a 30 ° C. A concentração bacteriana foi determinada por diluição em série em água peptona a 0,1%. A partir de cada diluição, transferiu-se 1 mL para placas de Petri estéreis com uma camada dupla de ágar MRS e uma camada de Agar Contagem de Placas (PCA) para *W. viridescens* e *P. fluorescens*, respectivamente. A concentração celular foi determinada após incubação a 30 ° C, durante 48 h. A CMI foi definida como a menor concentração de OEO necessária para inibir o crescimento bacteriano, nas condições estudadas.

3.3.2 Determinação da dose mínima inibitória (DMI) na fase vapor

A DMI foi determinada conforme o método baseado em ALMEIDA, 2017 com modificações. As suspensões de células de *W. viridescens* e *P. fluorescens* foram preparadas por diluições em série em água peptona 0,1%. Adicionou-se 100 µL de cada suspensão bacteriana (10^4 UFC/mL) em cinco pontos na superfície do Ágar (MRS para *W. viridescens* e PCA para *P. fluorescens*) para a determinação visual do crescimento microbiano (Figura 3).

Figura 3 Adição da suspensão bacteriana nos cinco pontos na superfície do Ágar.



Fonte: PAGANINI (2017).

As quantidades em ordem crescente (9,2, 13,8, 18,4, 23 e 46 mg) de OEO puro foram depositadas homogeneamente em papéis filtro circulares e esterilizados com a mesma área da superfície interna da tampa de placas de Petri (63 cm²). Estes papéis foram colocados na tampa das placas de Petri (placa de Petri + ágar + suspensão/tampa da placa de Petri + papel de filtro), incubadas invertidas, durante 48 h a 30 °C. Os controles foram preparados sem o papel de filtro na tampa (Figura 4).

Figura 4 Adição o papel filro e do composto ativo.



Fonte: PAGANINI (2017).

A dose de inibição mínima (DMI) foi definida como a dose mínima de OEO necessária para inibir completamente o crescimento de bactérias durante 48 h. Os resultados foram baseados na presença ou ausência de crescimento (avaliado visualmente).

3.3.3 Determinação do efeito bacteriostático/bactericida

Após a determinação do DMI, foi retirado o papel de filtro com OEO das placas em que não foi observado crescimento bacteriano aparente, para verificar se, na fase vapor, o OEO teve efeito bactericida (sem crescimento após a retirada do papel de filtro) ou bacteriostático (com crescimento após a retirada do papel de filtro). Estas placas foram incubadas invertidas a 30 °C durante 48 h.

3.4 ELABORAÇÃO DOS FILMES ATIVOS

Os filmes de acetato de celulose foram produzidos pelo método de *casting*, o qual consiste na desidratação de uma solução coloidal, denominada solução filmogênica (SF). Para a produção dos filmes ativos, foi utilizado o solvente acetona (Massa molar: 58,08 g/mol, Ponto de Ebulição: 56 °C, Pureza: 99,5%), escolhido de acordo com a solubilização do acetato de celulose com o grau de substituição de 2,5. A SF foi obtida adicionando-se ao solvente (Acetona) 5% de Acetato de celulose (0,05 g/mL), de modo que, a solução foi mantida sob agitação magnética até completa solubilização do polímero.

Quatro concentrações de OEO (5, 7, 10, 15%) foram adicionadas à SF, seguido de agitação, após a mistura completa (10 min), 10 mL de cada solução foi espalhada em placas de Petri (9 cm de diâmetro), tampadas, mantidas niveladas em uma capela com controle de temperatura e umidade relativa ambiente, a 21-22 °C e 65-70%, respectivamente. O tempo de secagem dos filmes foi de aproximadamente 48 h. Além disso, para criar um ambiente saturado de solvente e diminuir a taxa de secagem para evitar a presença de partes esbranquiçadas nos filmes, as placas foram mantidas fechadas durante todo o processo.

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO FILME NO MEIO

Com base na atividade antimicrobiana do OEO, foram escolhidas as concentrações mais efetivas para a produção dos filmes. Os filmes com área de 63 cm² foram testados nas concentrações de 5, 7, 10 e 15% para *W. viridescens* e 10 e 15% para *P. fluorescens*. As suspensões de células de ambas as bactérias foram preparadas por diluições em série em água peptona 0,1%. Adicionou-se 100 µL de cada suspensão bacteriana (10⁴ CFU/mL) em cinco pontos na superfície do Ágar para determinar o crescimento microbiano visual. Os filmes ativos foram colocados na tampa das placas de Petri (placa de Petri + agar +

suspensão/tampa da placa de Petri + filme ativo), incubadas invertidas, durante 48 h a 30 °C. Os controles foram preparados sem filme ativo. Os resultados foram baseados na presença ou ausência de crescimento, que foi avaliado visualmente.

3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIOANA DO FILME ATIVO NA VIDA ÚTIL DO PRESUNTO

3.6.1 Caracterização do presunto

Análises de atividade de água, pH e concentração de cloretos (para posterior cálculo da concentração de cloreto de sódio) foram realizadas, com o objetivo de caracterizar cada peça de presunto utilizada durante as análises microbiológicas. As análises foram realizadas retirando-se duas amostras das extremidades e uma do meio da peça.

Para as análises de atividade de água, aproximadamente 2,5 g das três partes da peça de presunto levemente triturado e misturado foram colocadas em recipiente próprio para leitura no medidor de atividade de água (Aqualab, modelo SERIES 3TE), previamente calibrado, com resolução de 0,001. Reatalizado em triplica

O pH foi medido em três pontos diferente 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 a determinação da medida 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 foi transferida para um balão volumétrico (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 do 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)

3.6.2 Preparo e condições de armazenamento das amostras

As amostras de presunto utilizadas durante os experimentos foram da marca Seara (Presunto Seara Cozido, sem capa de gordura). O fatiador e a câmara de fluxo (utilizados no experimento foram previamente higienizados com álcool 70% (v/v) e submetidos à luz UV por 30 minutos. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

As embalagens das peças de presunto foram abertas de forma asséptica dentro da câmara de fluxo. As amostras para as análises físico-químicas foram retiradas e a superfície da peça foi esterilizada com álcool 70% (v/v) antes do fatiamento. As peças de presunto foram fatiadas utilizando um fatiador de frios (Metvisa, modelo CFIE 250), com espessura ajustada em 1,5mm (Figura 5). Em seguida, as fatias de presunto foram cortadas com um molde circular de alumínio. Após a moldagem das amostras, as mesmas foram pesadas (aproximadamente 5,32g ($\pm 0,73$)) e 100 μ L de suspensão bacteriana (10^5 UFC/mL) de *W. viridescens* foi superficialmente espalhada na amostra, o filme foi colocado sobre a amostra e dobrado ao meio. As amostras controle foram apenas inoculadas com a suspensão bacteriana e dobradas ao meio.

Figura 5 Processo de fatiamento do presunto.



Fonte: PAGANINI (2017).

Cada amostra foi duplamente embalada, sendo ambas as embalagens plásticas e transparentes. A embalagem primária (que entra em contato direto com o presunto) foi um saco plástico estéril de homogeneização com capacidade para 75 mL, o qual foi dobrado e colocado dentro da embalagem secundária, uma “stand-up” própria para alimentos refrigerados (Figura 6). A embalagem secundária foi selada a vácuo (Selovac, modelo 200b) e as amostras armazenadas 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 de *W. viridescens* em presunto fatiado embalado a vácuo, foi avaliado na temperatura de 8 °C até que a curva de crescimento atingisse a fase estacionária.

Figura 6 Presunto embalado à vácuo com e sem adição de filme.



Fonte: PAGANINI (2017)

3.6.3 Análise microbiana

Em cada ponto experimental avaliado, uma amostra contendo o filme e uma controle foram retiradas da B.O.D para a determinação da concentração celular de *W. viridescens*, em tempos pré-determinados. Como as embalagens de homogeneização foram acondicionadas juntamente com o presunto, colocou-se água peptonada (1%) na proporção 9:1 (volume de água peptonada (mL)/massa de presunto(g)) e foi realizada a homogeneização por 60 segundos em Stomacher (ITR, modelo 1204) para realizar a primeira diluição. Em seguida, 1 mL desta diluição foi transferido para tubo de ensaio contendo 9,3 mL de água peptonada, e assim sucessivamente. Na sequência, 1 mL de cada diluição foi transferido para placas de Petri estéreis e descartáveis, previamente identificadas, sendo colocada dupla camada de Agar MRS para criar ambiente microaerófilo, ideal para o crescimento de BAL. Após a solidificação das camadas de Agar MRS, as placas foram incubadas invertidas a 30 °C por 48 h. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo previamente higienizada com álcool 70% (v/v) e submetida à luz UV por 15 minutos.

A contagem foi realizada nas placas que apresentaram entre 25 a 250 colônias. Para o cálculo da concentração microbiana (N), em unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de presunto, multiplicou-se a contagem das placas pelo inverso da sua respectiva

diluição. Os dados foram tratados e apresentam-se em gráficos (MENEZES, 2016; SILVA, 2015).

3.7 MODELAGEM MATEMÁTICA DAS CURVAS DE INATIVAÇÃO MICROBIANA

3.7.1 Modelo primário

A partir dos dados de crescimento bacteriano de *W. viridescens* nas amostras de presunto cozido fatiado e embalado a vácuo com e sem a adição de filme ativo de acetato de celulose com adição de OEO, armazenado na temperatura de 8 °C o modelo de Baranyi e Roberts (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 ($\mu_{m\acute{a}x}$) e população máxima atingida ($y_{m\acute{a}x}$). O ajuste foi realizado no *software* MATLAB R2013a (The MathWorks Inc®, Natick, USA) utilizando o algoritmo desenvolvido por Longhi (2012).

3.7.2 Análises estatísticas

Em microbiologia preditiva, alguns índices matemáticos são utilizados para avaliar a confiabilidade dos modelos, A avaliação da capacidade preditiva dos modelos primários, em descrever os dados experimentais no presente trabalho 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 o cálculo dos índices estatísticos são apresentadas na Tabela 2.

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

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

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 maior o valor ($0 < R^2 < 1$), melhor é a predição obtida pelo modelo.

O RMSE fornece informações de quão bom será o ajuste para modelos de regressão, linear e não linear. O RMSE equivale ao quadrado do MSE, quanto menor for o valor do MSE (erro médio quadrático) melhor será a predição do modelo comparado aos dados experimentais, ou seja, quanto menor o valor do RMSE melhor é o desempenho do modelo analisado.

Fator bias é conhecido como fator de "tendência", ou seja, proporciona uma medida do desvio estrutural do modelo e 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 é maior que 1, o valor predito é maior que o observado e indica que o modelo falha de forma segura (*fail-safe*), enquanto fator bias menor que 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, os valores do coeficiente de exatidão serão sempre maiores que 1. Quanto menor o valor do fator de exatidão, mais exata é a predição.

3.8 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Para os ensaios de tração os filmes foram cortados em corpos-de-prova com 25 mm de largura e 60 mm de comprimento. Os ensaios de tração foram realizados em texturômetro (TA.HD.plus Texture Analyse) auxiliados pelo programa Stable Micro Systems. A tensão de ruptura (TR), a alongação na ruptura (E) e o módulo de Young (MY) dos corpos-de-prova foram determinados, com distância inicial das garras de 40 mm e velocidade de tração de 0,8 mm/s.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO OEO

O OEO utilizado neste estudo contém uma elevada concentração de compostos fenólicos (Tabela 1), especialmente carvacrol (76,1%) e timol (2,32%), considerados muito ativos contra microrganismos (BURT, 2004).

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do OEO em estudo, foram determinados os valores da Concentração Mínima Inibitória (CIM) na fase líquida e da Dose Mínima Inibitória (DMI) na fase vapor.

As Figuras 7 e 8 apresentam os resultados do efeito antimicrobiano do OEO nas concentrações de 0,92, 1,38 e 1,84 mg/mL de OEO sobre o crescimento de *W. viridescens* e 0,46 mg/mL sobre o crescimento de *P. fluorescens*, respectivamente.

As células bacterianas de *W. viridescens* expostas a 0,92 e 1,38 mg/mL de OEO apresentaram crescimento microbiano após as primeiras 12 h, sofrendo ação antimicrobiana após 24 h de incubação (Figura 7). Concentrações de 1,84 mg/mL e 2,30 mg/mL (dado não apresentado) inibiram completamente o crescimento de *W. viridescens* (Figura 7). No caso de *P. fluorescens*, as concentrações de 0,46 (Figura 8), 0,92 e 2,30 mg/mL (dados não mostrados) provocaram completa inibição do crescimento bacteriano. De acordo com estes resultados, o valor de Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi estabelecido como 1,84 mg/mL para *W. viridescens* e 0,46 mg/mL para *P. fluorescens*. Levando em consideração que para *P. fluorescens* não foi testada uma concentração inferior a 0,46 mg/mL devido ao fato de ser uma quantidade muito pequena, impossibilitando a medição dessa quantidade para posterior transferência para o papel filtro.

Nas Figuras 7 e 8 as concentrações testadas acima de 1,84 mg/mL para *W. viridescens* e 0,92 e 2,30 mg/mL para *P. fluorescens* não aparecem no gráfico pois, acima dessa concentração, todas as amostras testadas apresentaram mesmo efeito antimicrobiano da concentração mais alta apresentada no gráfico.

Figura 7 Efeito do OEO (0,92 (▲), 1,38 (□), 1,84 mg/mL (◇) e controle- sem OEO (●)) sobre o crescimento de *W. viridescens* a 30 °C. N é a concentração bacteriana (UFC/mL) e as linhas são apenas para ligar os dados nas mesmas condições experimentais.

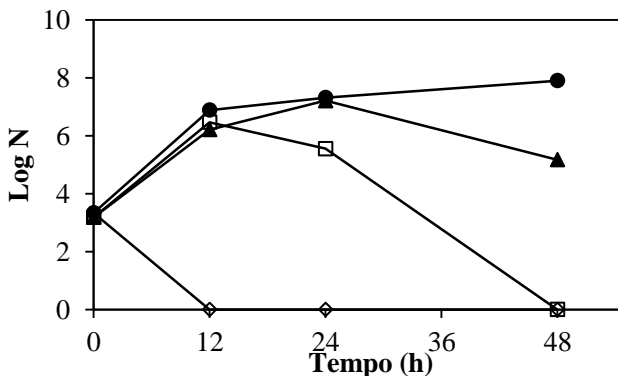
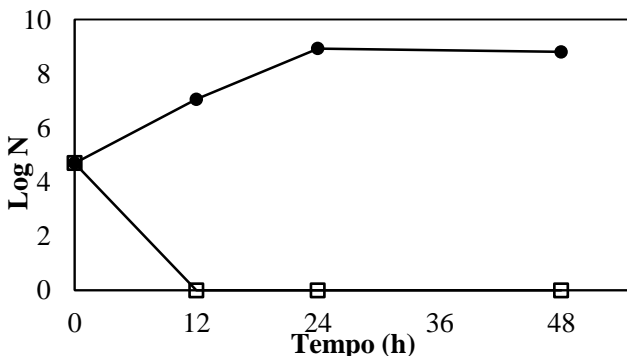


Figura 8 Efeito do OEO (0,46 (□) e controle - sem OEO (●)) no crescimento de *P. fluorescens* a 30 °C. N é o a concentração bacteriana (UFC/mL) e as linhas são apenas para ligar os dados nas mesmas condições experimentais.



Ben arfa et al. (2006), testaram o carvacrol, componente majoritário do OEO, no controle do crescimento de *P. fluorescens* e *Lactobacillus plantarum* e obtiveram valores de CMI de 1 mg/mL para *P. fluorescens* e acima de 3 mg/mL para *L. plantarum*, valores maiores que os obtidos no presente estudo. Iturriaga et al. (2012) observaram que a CMI de OEO foi de 4,60 mg/mL contra *L. monocytogenes* e *P. fluorescens*, 5 vezes maior do que a CMI obtida para *P. fluorescens* no

presente estudo. As diferenças observadas entre os valores de CMI podem ser, entre outras coisas, devido às diferenças na composição de OEO, o que pode levar a efeitos sinérgicos.

Foi estudado o efeito da fase vapor sobre o crescimento de *W. viridescens* e *P. fluorescens*. A Tabela 3 apresenta, de forma qualitativa, os resultados obtidos. Observa-se que, dentre as concentrações testadas, a dose mínima inibitória (DMI) estabelecida foi de 13,8 mg por placa de Petri para *W. viridescens* e 18,4 mg por placa de Petri para *P. fluorescens*. Estas foram menores massas em que, após 48 h de incubação a 30 °C, não foi observado crescimento microbiano. Ben arfa et al. (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana do vapor de carvacrol e obtiveram uma DMI igual a 10 mg por placa de Petri contra *P. fluorescens* e 20 mg por placa de Petri para *L. plantarum*, que podem ser considerados próximos aos obtidos no presente trabalho.

Tabela 3 Dose mínima inibitória (DMI) (mg por placa de Petri) de OEO avaliada pelo método na fase de vapor.

Cepa	9,2	13,8	18,4	23	46	Controle
<i>W. viridescens</i>	*	-	-	-	-	**
<i>P. fluorescens</i>	*	*	-	-	-	**

(**) Crescimento forte, (*) Crescimento moderado e (-) Sem crescimento

Após a determinação da DMI, foram removidos os papéis filtro das amostras que não apresentaram crescimento microbiano. As amostras utilizadas para a retirada do papel filtro contendo o OEO foram nas concentrações de 13,8 e 18,4 mg de OEO por placa de Petri para *W. viridescens* e *P. fluorescens*, respectivamente. As mesmas foram reincubadas a 30 °C por 48 h, para a avaliação do efeito bacteriostático e bactericida. Se houvesse retomada do crescimento o efeito do OEO seria bacteriostático e se não houvesse crescimento, seria bactericida.

Após a remoção do papel de filtro contendo OEO das placas de Petri, observou-se crescimento de *P. fluorescens* no meio, indicando que o OEO apresentou efeito bacteriostático contra esta bactéria. No caso de *W. viridescens* não se observou retomada de crescimento, mostrando um efeito bactericida de OEO sobre esta BAL.

Numerosos estudos em sistemas de modelos de caldos, bem como em alimentos reais, revelaram atividade bacteriostática e bactericida de OEs sobre diferentes microrganismos (KOUTSOUMANIS; LAMBROPOULOU; NYCHAS, 1999; LAMBERT et al., 2001; TSIGARIDA; SKANDAMIS; NYCHAS, 2000).

Um valor único de CMI de um agente antimicrobiano não pode ser estabelecido, uma vez que este valor pode ser influenciado pelo microrganismo, cepa, estado fisiológico das células, quantidade de inóculo, tempo de incubação, composição do meio de cultura e condições ambientais tais como temperatura e pH (DE AZEREDO et al., 2011).

Alguns autores afirmam que o efeito de inibição do OEO também está relacionado com alterações da morfologia das cepas devido à penetração dos compostos ativos na membrana plasmática (SOYLU; KURT; SOYLU, 2010).

A atividade dos OEs depende da sua composição molecular, da configuração estrutural dos componentes moleculares, dos seus grupos funcionais e das possíveis interações sinérgicas (DORMAN; DEANS, 2000). Existem evidências de que alguns componentes, presentes em menor quantidade do que os compostos fenólicos, tais como o p-cimeno, podem interferir na atividade antimicrobiana produzindo sinergismo com outros componentes do óleo (PASTER et al., 1995).

4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO FILME NO MEIO

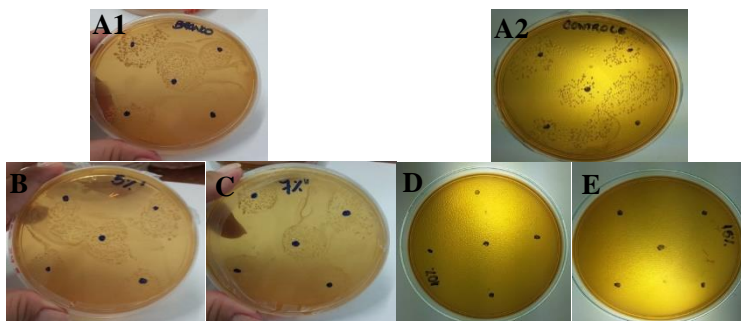
As Figuras 9 e 10 apresentam o efeito do filme ativo incorporado com OEO sobre o crescimento de *W. viridescens* e *P. fluorescens*, respectivamente. A análise da atividade antimicrobiana do filme foi realizada em fase vapor.

Como pode ser visto (Figura 9), para a bactéria Gram-positiva *W. viridescens*, o filme com menor concentração de OEO que se mostrou mais eficaz foi o com 10% de composto ativo, onde pode-se observar completa inibição. O filme com 15% de OEO também apresentou completa inibição.

A Figura 10 mostra o efeito inibitório dos vapores de OEO sobre o crescimento de *P. fluorescens*. Não foram observados efeitos inibitórios do filme com 10% de OEO, entretanto observou-se redução do crescimento quando 15% de OEO estava incorporado ao filme. Não foi observado inibição total do crescimento nas concentrações testadas, como ocorreu com a BAL em estudo.

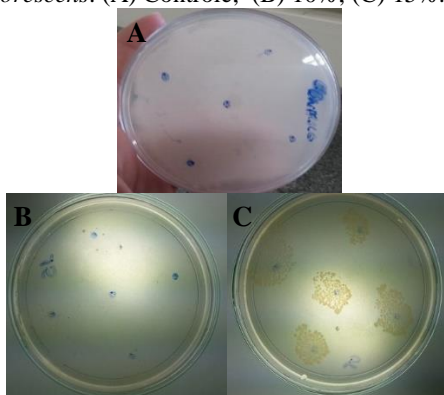
Diferentes quantidades de OEO incorporadas aos filmes resultaram na diminuição do crescimento microbiano contra ambas as bactérias, sendo que, quanto maior a quantidade de OEO, maior foi a atividade antimicrobiana.

Figura 9 Efeito do filme ativo incorporado com OEO sobre o crescimento de *W. viridescens*. (A1) Controle; (A2) Controle; (B) 5%; (C) 7%; (D) 10%; (E) 15 %.



OBS: Controle A1 (referente a amostra B e C) e A2 (referente a amostra D e E) foram realizados em dias diferentes.

Figura 10 Efeito do filme ativo incorporado com OEO no crescimento de *P. fluorescens*. (A) Controle; (B) 10%; (C) 15%.



Com os resultados obtidos, pode-se dizer que a bactéria Gram-negativa se mostrou mais resistente ao efeito do filme incorporado com OEO. Há contradições na literatura relacionada ao efeito dos OE no crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Ouattara et al. (1997) observaram que vários OE, incluindo OEO, produziram efeitos semelhantes em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas após um tratamento de 24 h, enquanto que, após 48h de tratamento, o efeito de inibição pareceu ser maior contra bactérias Gram-negativas. No entanto, Boskovic et al. (2015), Marino et al. (2001) relataram que os

EO foram mais eficazes contra as bactérias Gram-positivas, como no presente estudo. Deans e Ritchie (1987) não encontraram diferença na eficácia de 50 óleos essenciais comerciais contra os dois tipos de bactérias.

Pela experiência obtida na incorporação do OEO nos filmes, pode-se afirmar que para atingir a total inibição do crescimento de *P. fluorescens*, provavelmente seja necessário aumentar a concentração de OEO incorporado nos filmes, levando em consideração que com o aumento da concentração de OEO o odor fica mais pronunciado.

Em geral, os filmes de acetato de celulose incorporados com OEO apresentaram bom efeito inibitório sobre o crescimento de ambas as bactérias. O bom resultado pode ser devido à incorporação do OEO na matriz polimérica e à alta pressão de vapor dos EO que permite que seus compostos voláteis sejam liberados e desempenhem seu papel ativo contra o crescimento de microrganismos (POLA et al., 2016).

Espitia et al. (2013) relataram que filmes de acetato de celulose incorporados com 20% de OEO eram parcialmente eficazes apenas contra *Fusarium semitectum* e não foram capazes de inibir o crescimento de *Aternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer* e *Lasiodiplodia theobromaea* após 7 dias de incubação. Paster et al. (1990) afirmaram que *P. Aeruginosa* não foi afetada pela ação do OEO em concentrações até 500 mg/mL. De acordo com Avila-Sosa et al. (2012), a quantidade de estudos com foco na difusão em fase vapor de EO incorporados em filmes poliméricos é ainda limitada.

Diferentes resultados do efeito antimicrobiano do OEO incorporado no papel filtro e no filme ativo, foram obtidos. O OEO se mostrou mais eficaz quando aplicado no papel filtro. Segundo Ugalde (2014), o polímero de acetato de celulose possui alta capacidade de incorporar os OEs que a ele são adicionados, porém este polímero pode dificultar a liberação dos princípios ativos para o ágar, não ocorrendo consequentemente a inibição microbiana, ou diminuindo a eficácia do OE. De acordo com Cagri (2001) uma interação entre grupamentos do polímero e os compostos ativos do agente incorporado pode reduzir ou até impedir a migração de compostos ativos para o sistema.

Lopez et al. (2005) avaliaram o efeito antimicrobiano de alguns OEs sobre microrganismos de origem alimentar, por meio de dois tipos de contato, sólido e vapor, e mostraram que os OE na fase vapor apresentaram maior efeito antimicrobiano, tornando esse método uma alternativa promissora no controle do crescimento de microrganismos em alimentos embalados.

Almeida (2017) produziu uma embalagem ativa para extensão da vida útil de pães de forma, pela incorporação de óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) em matrizes poliméricas. Os filmes ativos apresentaram atividade antimicrobiana comprovada e promoveram a extensão da vida útil de pães de forma em até 10 dias, nas condições da análise.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO PRESUNTO

Os resultados das médias das análises de pH, atividade de água e concentração de cloreto de sódio realizadas para a caracterização de cada peça de presunto utilizada nos experimentos, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Valores de média e desvio padrão das análises realizadas em presunto.

Amostra	Ph	Atividade de água	NaCl (% de massa)
1	6,27 ($\pm 0,06$)	0,97 ($\pm 0,002$)	2,15 ($\pm 0,04$)
2	6,34 ($\pm 0,01$)	0,98 ($\pm 0,005$)	2,11 ($\pm 0,04$)

OBS: Os valores representam a média de três repetições para o pH e atividade de água e quatro repetições para NaCl.

Kalschne et al. (2014), Stekelenburg e Kant-Muermans (2001) encontraram 0,97 como valor para a atividade de água do presunto. De acordo com Hoffmann, (2001), a atividade de água característica de produtos cárneos fica em torno de 0,98. Garrido et al. (2010) analisaram presunto fatiado em diferentes temperaturas de armazenamento e encontraram valores em torno de 0,95 e 0,96. O valor de atividade de água para o presunto obtido no presente trabalho foi, em média, de 0,975, próximo aos valores encontrados na literatura, como era esperado.

Alguns estudos demonstram que a faixa de pH apropriada ao presunto, varia de 6,0 a 6,73 (GARRIDO; GARCÍA-JALÓN; VITAS, 2010). Segundo Bressan et al. (2007), o pH médio inicial encontrado nas amostras de presunto foi de 6,4. Holley (1997) afirma que, para a garantia da qualidade sensorial, o pH do presunto deve apresentar-se maior que 6,0. O valor de pH obtido (6,3) demonstra que o produto está apropriado, mantendo-se dentro da faixa de valores citados pela literatura.

A concentração de cloreto de sódio (NaCl) no presunto avaliado no presente estudo foi em torno de 2,13 %. De acordo com 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. Com base nos resultados obtidos nas análises, pode-se afirmar que as amostras de presunto utilizadas apresentam características esperadas para este produto.

A partir dos resultados obtidos, é possível afirmar que as amostras de presunto utilizadas apresentam características esperadas para este produto, sendo um meio de crescimento propício para o desenvolvimento das bactérias utilizadas neste estudo.

4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO FILME NO PRESUNTO

Considerando-se os resultados positivos quanto à ação antimicrobiana do filme adicionado de OEO, estudou-se o efeito da utilização do filme + OEO na vida útil do presunto. Considerou-se nessa análise que a vida útil do presunto é determinada apenas pelo crescimento de *W. viridescens*.

As curvas de crescimento de *W. viridescens* em presunto fatiado embalado a vácuo, armazenadas a 8 °C, com e sem filme ativo incorporado com OEO, nas concentrações de 10 e 15 %, ajustadas pelo modelo de Baranyi e Roberts (1994) (equações 2.1 e 2.2), são representadas nas Figuras 11 e 12. As linhas pretas (contínuas - s/OEO; tracejadas - c/OEO) representam o ajuste do modelo primário aos dados experimentais. 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 (KARABAGIAS; BADEKA; KONTOMINAS, 2011; KREYENSCHMIDT et al., 2010; SLONGO et al., 2009).

Figura 11 Curvas de crescimento de *W. viridescens* em presunto fatiado embalado a vácuo, armazenado a 8 °C, com e sem filme ativo incorporado com 10 % de OEO e ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto. As linhas pretas (contínuas - s/filme de 10 % de OEO; tracejadas – c/filme de 10% de OEO) representam o ajuste do modelo primário.

Os símbolos representam os dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* com e sem filme ativo ((□) com filme ativo, (◆) sem filme ativo). A linha vermelha indica a contagem final que define a vida útil do presunto (10^7 UFC/g).

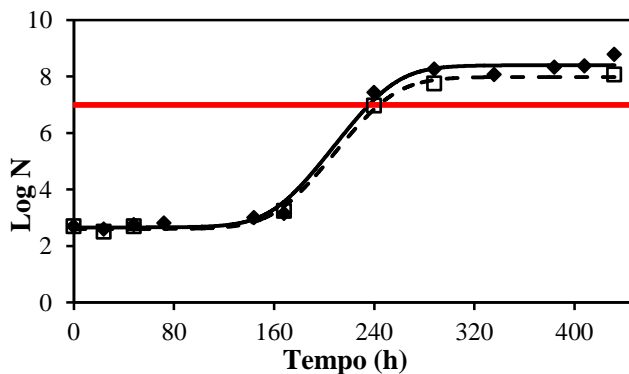


Figura 12 Curvas de crescimento de *W. viridescens* em presunto fatiado embalado a vácuo, armazenado a 8 °C, com e sem filme ativo incorporado com 10 % de OEO e ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto. As linhas pretas (contínuas - s/filme de 15 % de OEO; tracejadas – c/filme de 15% de OEO) representam o ajuste do modelo primário. A linha vermelha indica a contagem final que define a vida útil do presunto (10^7 UFC/g).

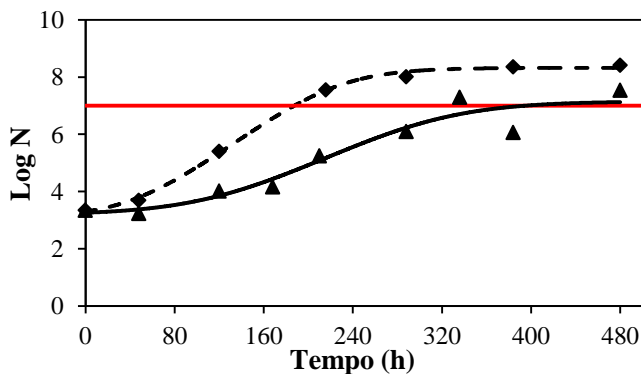


Tabela 5 Índices estatísticos obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto embalados a vácuo, com e sem filme incorporado com OEO armazenados a 8 °C.

Índices Estatísticos				
Amostra	R²	RMSE	Fator Biais	Fator de Exatidão
Controle 10%	0,99	0,26	1	1,44
Filme 10%	0,99	0,15	1	1,29
Controle 15%	0,99	0,15	1	1,20
Filme 15%	0,92	0,55	1	2,08

Através dos valores indicados na Tabela 3, observa-se que o modelo avaliado fornece predições seguras do crescimento de *W. viridescens* em presunto embalado a vácuo com e sem adição de filme ativo incorporado com OEO, com um valor do fator bias, para ambos os perfis de temperatura, igual a 1.

Comparando as quatro curvas de crescimento obtidas, pode-se afirmar que a que apresentou menor erro quadrático e consequentemente melhor predição do modelo aos dados experimentais foram as amostras com adição de filme na concentração de 10% e a amostra controle 15%. O R² foi próximo de 1 para ambas as amostras, sendo ligeiramente menor em relação às demais para a amostra contendo filme na concentração de 15%. Ao comparar as curvas de crescimento, pode-se afirmar que a curva dos dados da amostra controle 15% apresentou melhor valor de exatidão, obtendo assim, melhor predição. Com base nessas informações pode-se afirmar que o modelo de de Baranyi e Roberts forneceu um bom ajuste aos dados experimentais.

A Tabela 6 apresenta os valores dos parâmetros primários de crescimento e o tempo em dias para atingir o final da vida útil de presunto embalado a vácuo a 8 °C, com e sem filme ativo incorporado com OEO nas concentrações de 10 e 15 %, obtidos mediante ajuste demonstrado nas Figuras 4 e 5.

Tabela 6 Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos no crescimento de *W. viridescens* em presunto a 8 °C, com e sem filme ativo incorporado com OEO.

Amostra	μ (h ⁻¹)	λ (h)	$Y_{m\acute{a}x}$	Vida útil (dias)
Controle 10 %	0,06	161,5	8,4	9
Filme 10 %	0,06	164,2	8,0	10
Controle 15 %	0,03	52,2	8,3	9
Filme 15 %	0,02	124,4	7,2	16

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 é essencial em muitas áreas da microbiologia, podendo ser utilizados por exemplo, para caracterizar os efeitos antimicrobianos, avaliação da vida útil, para desenvolver modelos cinéticos e usar em fermentação e tecnologia de alimentos (KOUTSOUMANIS; LAMBROPOULOU; NYCHAS, 1999; MENEZES, 2016). Os parâmetros considerados mais importantes quando se analisa a vida útil dos produtos cárneos são a duração da fase lag e a velocidade específica máxima de crescimento (GEITENES et al., 2013). No entanto, o controle da população máxima pode ocasionar o aumento da vida útil dos produtos contaminados.

Como pode ser observado pela Tabela 6, a utilização do filme ativo incorporado com 10% de OEO levou a um pequeno aumento do λ , uma mesma $\mu_{m\acute{a}x}$, pouca diminuição do $y_{m\acute{a}x}$ e ao aumento de apenas um dia na vida útil do presunto em relação às amostras sem o filme ativo, demonstrando pouco efeito de inibição do filme ativo sobre o crescimento bacteriano, quando comparado ao controle. O filme ativo começou a demonstrar efeito antimicrobiano somente a partir do final da fase exponencial.

No entanto, para os filmes ativos incorporados com 15% de OEO, houve um aumento da λ , diminuição da $\mu_{m\acute{a}x}$ e do $y_{m\acute{a}x}$ e consequente aumento da vida útil em 7 dias. O filme incorporado com 15% de OEO desempenhou melhor papel, apresentando efeito inibitório logo no início

da fase exponencial, nas primeiras 48h de armazenamento, apresentando um bom efeito inibitório quando comparado ao controle.

De acordo com Kreyenschmidt et al. (2010), Slongo et al. (2009) a concentração de BAL definida como ponto para deterioração dos produtos é de 10^7 (UFC/g). É importante ressaltar que, o filme com 15% de OEO mateve-se abaixo desta concentração até os 16 dias de armazenamento, ao contrario do controle que atingiu essa concentração após 9 dias de armazenamento (Tabela 5), estendendo a vida útil do presunto em 7 dias, isso demonstra o forte efeito inibitório do filme ativo e sua capacidade de prolongar a vida útil deste tipo de alimento. Chouliara 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 e a utilização de OEO (0,1%) resultou na redução de $1[\text{Log (UFC/g)}]$ 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.

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. Menezes (2016) durante a avaliação da vida útil de presunto embalado a vácuo, com adição de OEO na condição de armazenamento de 6 °C, obteve uma redução no crescimento da população microbiana com valor de $y_{\text{máx}}$ de 9×10^5 (UFC/g). Nas amostras sem OEO, a média dos valores máximos de crescimento microbiano foi de $8,0 \times 10^8$ (UFC/g). No presente trabalho, foram encontrados valores semelhantes aos encontrados na literatura para as amostras sem OEO, os valores obtidos para as amostras com adição do filme ativo foram, $9,7 \times 10^7$ (UFC/g) para a concentração de 10% e $1,4 \times 10^7$ (UFC/g) para a concentração de 15% de OEO.

Apesar da ação comprovada do OEO na inibição antimicrobiana obtida nas análises realizadas neste estudo, são necessários valores maiores para alcançar a mesma eficiência quando aplicados em alimentos, tanto para o OEO aplicado diretamente ao alimento, ou incorporado em uma matriz polimérica. A grande disponibilidade de nutrientes em alimentos comparada com os meios de cultura permite às bactérias repararem o dano celular rapidamente. Além dos fatores intrínsecos do alimento (gordura, proteína, água, antioxidantes, pH, conservadores), os fatores extrínsecos (temperatura, embalagem a

vácuo, características do microrganismo) também influenciam a sensibilidade das bactérias (BOTRE et al., 2010; GILL et al., 2002; SHELEF, 1984; TASSOU; DROSINOS; NYCHAS, 1995).

O fato da ação antimicrobiana do filme com concentração de 10% de OEO ter ocorrido somente após 12 dias de estocagem (final da fase exponencial) a 8° C pode estar relacionado à diminuição da volatilidade do OEO, quando submetido a baixas temperaturas, o que leva à conseqüente diminuição na saturação do espaço livre da embalagem, comprometendo, portanto, a sua ação. A base celulósica pode, também, ter contribuído para aumentar a retenção do óleo na resina, diminuindo a saturação do ambiente da embalagem (BOTRE et al., 2010).

Segundo Emiroğlu et al. (2010), *L. plantarum* integrante do gupo das BAL foi a bactéria mais resistente entre os microrganismos testados pra avaliar o efeito dos filmes comestíveis de soja incorporados com OE de orégano e tomilho. Botre et al. (2010), realizando teste do halo com filmes ativos incorporados com OEO, 25% e 50% (v/p), observaram ação inibitória, *in vitro*, sobre *Penicillium* spp. e *S. aureus*, do filme com maior concentração de óleo, apresentando maior halo. Nas amostras de massa de pizza onde foram aplicados os filmes ativos incorporados com OEO, não foi observado o crescimento de fungos filamentosos, apenas leveduras, até os 15 dias de estocagem do produto.

Observou-se diferença no crescimento de *W. viridescens* a 8 °C entre o controle de 10 e 15% (sem filme). Os parâmetros $\mu_{\text{máx}}$, λ , $y_{\text{máx}}$ foram maiores para o controle de 10%. A diferença entre os dois controles pode ter ocorrido por variações na composição do presunto utilizada nas duas análises, por este motivo cada amostra (10 e 15%) foi analisado em relação ao respectivo controle.

Com base nos resultados obtidos, é possível afirmar que os filmes incorporados com OEO se mostraram eficazes, quando aplicados no presunto, podendo ser uma boa alternativa para prolongar a vida útil do alimento. Ouattara et al. (2000) relatam, que o emprego de filmes antimicrobianos pode ser mais eficiente do que o uso direto de antimicrobianos no alimento, pois o antimicrobiano migra lenta e gradualmente da embalagem para a superfície do alimento, onde mantém em concentração necessária para inibir o desenvolvimento de microrganismos. Na maioria dos alimentos frescos ou processados, a contaminação microbiana ocorre, em maior intensidade, na superfície dos mesmos, requerendo assim um controle efetivo do crescimento microbiano neste local (PADGETT; HAN; DAWSON, 1998).

4.5 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Foram estudadas as propriedades mecânicas dos filmes com 0, 10 e 15% de OEO. A Tensão de Ruptura (TR), Elongação (E) e o Módulo de Young (MY) são parâmetros que representam as propriedades mecânicas dos filmes (AGUIRRE; BORNEO; LEON, 2013). A Tabela 7 apresenta os valores de espessura e os resultados obtidos nos ensaios de tração para os filmes de acetato de celulose com e sem incorporação de OEO.

Tabela 7 Espessura e ensaios de tração dos filmes de acetato de celulose com e sem OEO.

Amostra	Espessura (mm)	Tensão de Ruptura (MPa)	Elongação (%)	Módulo de Young (MPa%)
Acetato de Celulose	0,04 (±0,008)	37,34 ^a (±5,17)	2,84 ^b (±1,02)	33,64 ^a (±1,96)
OEO 10%	0,04 (±0,008)	42,39 ^a (±5,12)	7,50 ^a (±0,89)	30,24 ^a (±7,72)
OEO 15%	0,05 (±0,005)	38,36 ^a (±1,05)	5,58 ^a (±0,81)	30,12 ^a (±4,43)

Os valores representam a média de três repetições. Médias com letras iguais não apresentam diferenças significativas pelo teste de Turkey a 5% de probabilidade.

Ambos os filmes, formados a partir das soluções filmogênicas, ficaram transparentes, contínuos, sem presença de rupturas e uniformes, considerando-se análise visual.

Nos filmes incorporados com 10% de OEO, foi possível perceber um aroma agradável de orégano, mas os filmes incorporados com 15% apresentaram um aroma bem mais pronunciado.

A incorporação de OEO nos filmes não promoveu variações significativas ($p \leq 0,05$), em relação ao filme sem óleo, na TR, isto é a resistência máxima oferecida pelos filmes quando submetidos a tração. O MY, que mostra a rigidez dos filmes, também não apresentou variação significativa ($p \leq 0,05$) com a incorporação do OEO, enquanto a E, que mostra a capacidade do filme de esticar antes de romper, variou significativamente com a incorporação do OEO. Entretanto, não houve variação significativa entre as duas concentrações de óleo testadas.

Inicialmente, mesmo não tendo demonstrado variação significativa pela análise estatística aplicada, pode-se observar que, com a incorporação de 10 % de OEO, houve um aumento da TR de 34,93

MPa para 42,39 MPa. Porém, à medida que a concentração aumentou para 15 %, observou-se a redução da TR, que atingiu o valor de 38,36 MPa. O aumento na TR suportada pelos filmes pode estar relacionado a uma possível interação das cadeias do polímero e os componentes dos OEs, formando uma estrutura mais resistente à tração. Resultados semelhantes foram apresentados na literatura (MELO, 2010; MORAES et al., 2007). Os parâmetros mecânicos, TR e E dos filmes incorporados com agente antimicrobiano aumentaram em relação ao filme controle. Os valores apresentados foram 7,50 e 5,83% para os filmes com 10 e 15% de OEO respectivamente e 2,84% para o controle. Portanto, pôde-se observar que a adição do OEO mudou a estrutura polimérica do filme dando-lhe maior resistência e alongamento.

Estudos mostraram que o OEO apresenta efeito plastificante em filmes de quitosana (ZIVANOVIC, S., CHI, S., DRAUGHON, 2005) e em filmes de metilcelulose (OTONI; PONTES; MEDEIROS; SOARES, 2014) um derivado da celulose assim como o acetato de celulose. Devido à sua massa molar mais baixa quando comparado com as macromoléculas (acetato de celulose), acredita-se que os OEs se encontram entre cadeias poliméricas, enfraquecendo as interações intermoleculares que proporcionam ao material resistência. Como resultado, a mobilidade da cadeia e a flexibilidade são melhoradas (POLA et al., 2016).

Lima et al. (2007) citaram que a incorporação de 30% de sorbitol em filmes à base de alginato de sódio diminuiu as interações polímero-polímero, resultando em uma diminuição significativa no MY. Neste estudo, os autores afirmam que, rigidez e resistência apresentam comportamentos semelhantes, e quando houve redução em um destes parâmetros o mesmo foi observado no outro.

Atarés et al. (2010) mostraram que com o aumento da concentração de óleo essencial de canela em filmes a base de proteína de soja a tensão era reduzida, mas, a E não sofria variações, possivelmente porque os lipídeos não são capazes de formar uma matriz coesa e contínua, de modo que pode haver interações, mas o tipo de interação que ocorre não favorece a E.

Apesar de todos os filmes terem sido produzidos da mesma forma, sendo adicionados 10 mL de solução filmogênica à cada placa, é possível observar que ocorreu certa variação nas espessuras. No entanto, essas variações podem ser consideradas aceitáveis devido à dificuldade de espalhamento uniforme nas placas, inerente do método de *casting*. Isso pode ter resultado na variação dos resultados obtidos para as propriedades mecânicas dos filmes. Além disso, a variação das

propriedades entre os filmes com OEO pode ser devido à falta de homogeneidade do espalhamento do óleo nos filmes. Esta hipótese poderia ser comprovada pela análise da estrutura microscópica do filme, que não foi realizada no presente trabalho.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar a ação antimicrobiana de filmes ativos de acetato de celulose incorporados com diferentes concentrações de OEO no crescimento de *W. viridescens* e *P. fluorescens*, para posterior aplicação em presunto nas concentrações mais efetivas. A partir dos resultados obtidos conclui-se que:

- O OEO apresenta efeito antimicrobiano para ambas as bactérias estudadas, sendo mais efetivo na fase líquida para *P. fluorescens* e na fase vapor para *W. viridescens*. O OEO apresentou efeito bacteriostático para *P. fluorescens* e efeito bactericida para *W. Viridescens*.
- O filme ativo incorporado com diferentes concentrações de OEO apresenta efeito antimicrobiano contra ambas as bactérias estudadas. Filmes com concentração de 10 % de OEO inibem completamente o crescimento de *W. viridescens*. *P. fluorescens* demonstra maior resistência ao OEO, apresentando crescimento microbiano mesmo na concentração de 15 % de OEO na fase vapor.
- As análises físico-químicas realizadas no presunto caracterizam o produto como um meio ótimo para o crescimento de bactérias ácido lácticas. Os valores de pH, a_w e concentração de cloreto de sódio estão de acordo com os encontrados na literatura e dentro da faixa ótima de crescimento das principais bactérias deteriorantes de produtos cárneos.
- O modelo de Baranyi e Roberts pode ser usado para obtenção dos parâmetros primários de crescimento de *W. viridescens* em presunto (com e sem filme). Comparando-se a ação antibacteriana dos filmes com 10 e 15% de OEO, conclui-se que o filme incorporado com 15% de OEO diminui o valor de μ , aumenta o valor de λ , o que leva a um aumento da vida útil do produto de 9 para 16 dias, podendo ser utilizado como uma boa alternativa para prolongar a vida útil do alimento
- Os filmes produzidos com a incorporação do OEO apresentam propriedades mecânicas próximas em relação ao filme controle, mostrando diferença significativa apenas para a enlagação.

6. REFERÊNCIAS

- ABDUL KHALIL, H. P. S. et al. A review on nanocellulosic fibres as new material for sustainable packaging: Process and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 64, p. 823–836, 2016.
- ADAMBERG, K. et al. 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.; LEON, A. E. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. **Food Bioscience**, v. 1, n. August, p. 2–9, 2013.
- ALMEIDA, P.P. **Desenvolvimento de sistema de embalagem ativo antimicrobiano para pães de forma**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2017).
- ANDREANI, N. A. et al. A genomic and transcriptomic approach to investigate the blue pigment phenotype in *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 213, p. 88–98, 2015a.
- ANDREANI, N. A. et al. Reprint of “Tracking the blue: A MLST approach to characterise the *Pseudomonas fluorescens* group”. **Food Microbiology**, v. 45, n. PA, p. 148–158, 2015b.
- APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, n. 2, p. 113–126, 2002.
- ARNAUT-ROLLIER, I. et al. A numerical taxonomic study of the *Pseudomonas* flora isolated from poultry meat. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 1, p. 15–28, 1999.
- ATARÉS, L.; BONILLA, J.; CHIRALT, A. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 4, p. 678–687, 2010.

ATREA, I. et al. Combined effect of vacuum-packaging and oregano essential oil on the shelf-life of Mediterranean octopus (*Octopus vulgaris*) from the Aegean Sea stored at 4 °C. **Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 166–172, 2009.

AUDENAERT, 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.

AVILA-SOSA, R. et al. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 66–72, 2012.

BAGAMBOULA, C. F.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiology**, v. 21, 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, 2012.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BALAGUER, M. P. et al. Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 3, p. 369–377, 2013.

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

BERNAERTS, K. et al. Modeling Microbial Dynamics under Time-Varying Conditions. In: (Ed.). **Modelling microbial responses in food**. Washington D.C., CRC Press, p.255-273, 2004.

BEUCHAT, L. R. SENSITIVITY OF *Vibrio parahaemolyticus* TO SPICES AND ORGANIC ACIDS. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 4, p. 899–902, 1976.

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. 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.

BOTRE, D. A. et al. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Revista Ceres**, p. 283–291, 2010.

BRESSAN, M. C. et al. Influência da embalagem na vida útil de presuntos fatiados. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 433–438, 2007.

BUDDE, B. B. et al. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: Culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 171–184, 2003.

BUNCIC, S. et al. Microbial pathogen control in the beef chain: Recent research advances. **Meat Science**, v. 97, n. 3, p. 288–297, 2014.

BURGAIN, J. 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.

CAGRI A., USTUNOL Z., RIZER E.T. Antimicrobial , Mechanical , and Moisture Barrier Properties of Low pH Whey Protein-based Edible Films Containing p-Aminobenzoic or Sorbic Acids. **Food Microbiology and Safety**, v. 66, n. 6, p. 865–870, 2001.

CALDERA, L.; FRANZETTI, L. Effect of storage temperature on the microbial composition of ready-to-use vegetables. **Current Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 133–139, 2014.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015.

CARRASCO, E. et al. A review on growth/no growth Salmonella models. **Food Research International**, v. 47, n. 1, p. 90–99, 2012.

CERQUEIRA, D. A. et al. Caracterização de acetato de celulose obtido a partir do bagaço de cana-de-açúcar por ¹H- RMN. **Polímeros**, v. 20, n. 2, p. 85–91, 2010.

CERRUTTI, P.; ALZAMORA, S. M. Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purées. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, n. 2–3, p. 379–386, 1996.

CHELO, I. M.; ZÉ-ZÉ, L.; TENREIRO, R. Genome diversity in the genera *Fructobacillus*, *Leuconostoc* and *Weissella* determined by physical and genetic mapping. **Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 420–430, 2010.

CHOUILIARA, 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.

COATES, K. J. et al. The contribution of carcass contamination and the boning process to microbial spoilage of aerobically stored pork. **Food Microbiology**, v. 12, n. C, p. 49–54, 1995.

COLLINS, M. D. et al. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc* paramesenteroides group of species. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n. 6, p. 595–603, 1993.

COMI, G.; IACUMIN, L. Identification and process origin of bacteria responsible for cavities and volatile off-flavour compounds in artisan

cooked ham. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 114–121, 2012.

COOKSEY, K. Effectiveness of antimicrobial food packaging materials. **Food additives and contaminants**, v. 22, n. 10, p. 980–987, 2005.

CORBO, M. et al. Non-Conventional Tools to Preserve and Prolong the Quality of Minimally-Processed Fruits and Vegetables. **Coatings**, v. 5, n. 4, p. 931–961, 2015.

CUTTER, C. N. Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 131–142, 2006.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age Gelation of UHT Milk—A Review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 79, n. December, p. 197–210, 2001.

DE AZEREDO, G. A. et al. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1541–1548, 2011.

DEANS, S.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 5, p. 165–180, 1987.

DE SOUSA, J. P. et al. Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, n. 3, p. 145–151, 2012.

DECIMO, M. et al. Characterization of Gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 10, p. M2081–M2090, 2014.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: Possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 4, p. 273–285, 2004.

DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308–316, 2000.

PIRES, A. C. S. et al. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. **Packaging Technology and Science**, v. 21, n. 7, p. 375–383, 2008.

EDGAR, K. J. et al. Advances in cellulose ester performance and application. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 26, n. 9, p. 1605–1688, 2001.

EMIROĞLU, Z. K. et al. 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.

ESPITIA, P. J. P. et al. Physical-mechanical and antimicrobial properties of nanocomposite films with pediocin and ZnO nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 199–208, 2013.

FARAG, R. S.; DAW, Z. Y.; ABO-RAYA, S. H. Influence of Some Spice Essential Oils on *Aspergillus Parasiticus* Growth and Production of Aflatoxins in a Synthetic Medium. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 1, p. 74–76, 1989.

FARBOOD, M. I.; MACNEIL, J. H.; OSTOVAR, K. Effect of rosemary spice extractive on growth of microorganisms in meats. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 39, n. 10, p. 675–679, 1976.

FRANZ, C. M. A. P.; VON HOLY, A. Bacterial populations associated with pasteurized vacuum-packed Vienna sausages. **Food Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 165–174, 1996.

FRANZETTI, L.; SCARPELUNI, M. Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. **Annals of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 39–47, 2007.

FRAPOLLI, M.; DÉFAGO, G.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Multilocus sequence analysis of biocontrol fluorescent *Pseudomonas* spp. producing the antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucinol. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 1939–1955, 2007.

FRIEDLY, E. C. et al. In vitro antilisterial effects of citrus oil fractions in combination with organic acids. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 2, 2009.

GÓMEZ-ROJO, E. M. et al. A novel real-time PCR assay for the specific identification and quantification of *Weissella viridescens* in blood sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 215, p. 16–24, 2015.

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.

GEITENES, S. et al. Modelagem do Crescimento de Bactérias Lácticas e Análise Microbiológica em Apresuntado e Presunto Cozido Fatiados e Embalados a Vácuo Growth Modeling of Lactic Acid Bacteria and Microbiological Analysis in Two Types of Sliced Vacuum Package Cooked Ham Intr. **Revista Ciências Exatas e Naturais -RECEN**, v. 15, n. 1, p. 113–133, 2013.

GEMILI, S.; YEMENICIOĞLU, A.; ALTINKAYA, S. A. Development of cellulose acetate based antimicrobial food packaging materials for controlled release of lysozyme. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 4, p. 453–462, 2009.

GHANBARI, M. et al. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria - **A review. LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 315–324, 2013.

GILL, A. O. et al. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 83–92, 2002.

GONÇALVES, L. D. DOS A. et al. Predictive modeling of *Pseudomonas fluorescens* growth under different temperature and pH values. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 2016, p. 1–7, 2017.

GRAM, L. et al. Food spoilage–interactions between food spoilage bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 78, n. 1–2, p. 79–97, 2002.

GRAM, L.; DALGAARD, P. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. **Current Opinion in Biotechnology** . v.13, n.3 , p. 262–266, 2002.

HABERBECK, L. U. **Modelagem de inativação isotérmica e não isotérmica de Bacillus coagulans, por tratamento termoquímico utilizado óleo essencial de oregano**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2011.

HAN, J.; CASTELL-PEREZ, M. E.; MOREIRA, R. G. The influence of electron beam irradiation of antimicrobial-coated LDPE/polyamide films on antimicrobial activity and film properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 9, p. 1545–1554, 2007.

HAUSER, C.; WUNDERLICH, J. Antimicrobial packaging films with a sorbic acid based coating. **Procedia Food Science**, v. 1, n. Icef 11, p. 197–202, 2011.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de microrganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, v. 9, n. 1, p. 23–30, 2001.

HU, P. et al. 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.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v. 49, n. 98, p. S139–S150, 1998.

Hui, Y. H. Hazard analysis and critical control point system. In Y. H. Hui (Ed.), Handbook of meat and meat processing. **Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group**. pp. 741–767, 2012.

ITURRIAGA, L.; OLABARRIETA, I.; DE MARAÑÓN, I. M. Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect

against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 58–64, 2012.

JACOB, C.; MATHIASSEN, L.; POWELL, D. Designing effective messages for microbial food safety hazards. **Food Control**, v. 21, n. 1, p. 1–6, 2010.

JACOBSEN, T.; BUDDE, B. B.; KOCH, A. G. Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 242–249, 2003.

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

JAYASENA, D. D.; JO, C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 34, n. 2, p. 96–108, 2013.

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

KALSCHNE, D. L. et al. Growth inhibition of lactic acid bacteria in ham by nisin: A model approach. **Meat Science**, v. 98, n. 4, p. 744–752, 2014.

KAMENÍK, J. et al. Lactic acid bacteria in hot smoked dry sausage (non-fermented salami): Thermal resistance of *Weissella viridescens* strains isolated from hot smoked dry sausages. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 492–495, 2015.

KAPETANAKOU, A. E.; SKANDAMIS, P. N. Applications of active packaging for increasing microbial stability in foods: Natural volatile antimicrobial compounds. **Current Opinion in Food Science**, v. 12, p. 1–12, 2016.

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.

KIM, J. M. et al. Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella Typhimurium* in culture medium and on Fish Gubers. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1364–1674, 1995.

KOUTSOUMANIS, K.; LAMBROPOULOU, K.; NYCHAS, G. J. E. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. **International Journal of Food Microbiology**, v. 49, n. 1–2, p. 63–74, 1999.

KREYENSCHMIDT, J. 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.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453–462, 2001.

LEBERT, I.; BEGOT, C.; LEBERT, A. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a 1.00) and temperature (7 – 25°C), water activity (0.97 - 1.00) and temperature (7 - 25 °C). **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 53–60, 1998.

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

LEE, J. H. et al. Physical properties and application of a red pepper seed meal protein composite film containing oregano oil. **Food Hydrocolloids**, v. 55, p. 136–143, 2016.

LEITE, M. T. **Otimização da produção do ácido láctico através da fermentação do soro de queijo**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2006.

LIMA, A. M. F. et al. Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades

mecânicas de filmes de alginato de sódio. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 832–837, 2007.

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. et al. 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.

LÓPEZ, P.; SANCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERIN, C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 6939–6946, 2005.

MARIA, J.; RAMOS, F. **Determinação de Parâmetros Cinéticos de Biofilmes formados por *Pseudomonas fluorescens***. Dissertação (Mestrado em Engenharia química), Universidade do Porto, 2008.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International journal of food microbiology**, v. 67, n. 3, p. 187–95, 2001.

MARTUCCI, J. F. et al. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 205–213, 2015.

MATARAGAS, M. et al. 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, 2006.

MAZZARRINO, G. et al. *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. **Food Control**, v. 50, p. 794–803, 2015.

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. et al. Predictive microbiology: Towards the interface and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, n. 2–3, p. 395–407, 2002.

MEIRELES, C. D. S. **Síntese e caracterização de membranas de acetato de celulose, obtido do bagaço de cana-de-açúcar, e blendas de acetato de celulose com poliestireno de copos plásticos descartados.** Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2007.

MELO, A. A. M. **Efeito de filme ativo incorporado com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus Officinalis L.*) na conservação de carne de frango resfriada.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2010.

MENEZES, N. M. C. **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 (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2016.

MILBOURNE, K. Thermal tolerance of *Lactobacillus viridescens* in Ham. **Meat Science**, v. 9, p. 113–119, 1983.

MOLEYAR, V.; NARASIMHAM, P. Antibacterial activity of essential oil components. **International Journal of Food Microbiology**, v. 16, p. 337–342, 1992.

MOLIN, G.; TERNSTRÖM, A. Numerical Taxonomy of Psychrotrophic *Pseudomonads*. **Journal of General Microbiology**, v. 128, n. 6, p. 1249–1264, 1982.

MORAES, A. R. F. E et al. Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano na conservação de manteiga Development and evaluation of antimicrobial film on butter conservation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 33–36, 2007.

MORISHITA, Y.; SHIROMIZU, K. Characterization of lactobacilli isolated from meats and meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 19–29, 1986.

MURIEL-GALET, V. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of oregano essential oil and green tea extract components. **Journal of Food Engineering**, v. 149, p. 9–16, 2015.

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.

NIVEN JR., C.F., EVANS, J.B. *Lactobacillus viridescens* nov. spec., a heterofermentative species that produces a green discoloration of cured meat pigments. **J. Bacteriol.** 73, 758–759, 1957.

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. et al. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, v. 78, n. 1–2, p. 77–89, 2008.

OTONI, C. G. et al. Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. **Food Research International**, v. 83, p. 60–73, 2016.

OUATTARA, B. et al. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, n. 2–3, p. 155–162, 1997.

OUATTARA, B. et al. Diffusion of Acetic and Propionic Acids from Chitosan-based Antimicrobial Packaging Films. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 5, p. 768–773, 2000.

PADGETT, T.; HAN, I. Y.; DAWSON, P. L. Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. **Journal of food protection**, v. 61, n. 10, p. 1330–1335, 1998.

PANDIT, V. A.; SHELEF, L. A. **Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)** **Food Microbiology**, n. 11, p. 57-63, 1994.

PASTER, N. et al. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 33–37, 1990.

PASTER, N., MENASHEROV, M., RAVID, U., JUVEN, B.. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. **Journal of Food Protection**. n. 58, 1995.

PATTERSON, M. F. et al. Effect of high pressure on the microbiological quality of cooked chicken during storage at normal and abuse refrigeration temperatures. **Food Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 266–273, 2010.

PEIRSON, M. D.; GUAN, T. Y.; HOLLEY, R. A. Thermal resistances and lactate and diacetate sensitivities of bacteria causing bologna discolouration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 223–230, 2003.

PESAVENTO, G. et al. Antibacterial activity of Oregano, *Rosmarinus* and *Thymus* essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, v. 54, p. 188–199, 2015.

PETROU, S. et al. 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.

POL, I. E.; SMID, E. J. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 166–170, 1999.

POLA, C. C. et al. Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 9, p. 69–78, 2016.

POTHAKOS, V. et al. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. **Meat Science**, v. 109, p. 66–74, 2015.

RADAELLI, M. et al. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 424–430, 2016.

Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), 2010. Annual Report.

RIBEIRO, A. C. P. **Comportamento proteolítico de *Pseudomonas spp.* isolada de leite cru refrigerado**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados), Universidade Norte do Paraná. Londrina, PR, 2015.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **The Journal of applied bacteriology**, v. 81, n. 5, p. 501–508, 1996.

ROSS, A. I. V et al. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, n. 2–3, p. 125–138, 2003.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. The spoilage microflora of cured, cooked turkey breasts prepared commercially with or without smoking. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 2–3, p. 133–143, 2000.

SANTOS, E. M. 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.

SANTURIO, D. F. et al. Antimicrobial activity of spice essential oils against *Escherichia coli* strains isolated from poultry and cattle. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1051–1056, 2011.

SCANNELL, A. G. et al. Development of bioactive food packaging materials using. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 241–249, 2000.

SCHAFFNER, D. W. e LABUZA, T. P. Predictive microbiology: where are we and where are we going? **Food Technology**, v. 51, p. 95-99, 1997.

SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, v. 39, n. 5, p. 639–644, 2006.

SHELEF, L. Antimicrobial Effects of Spices1. **Journal of Food Safety**, v. 6, n. 1984, p. 29–44, 1984.

SILBY, M. W. et al. *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 4, p. 652–680, 2011.

SILVA, N. B. DA. **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.

SILVA, N. B. DA et al. Modeling the growth of *Lactobacillus viridescens* under non-isothermal conditions in vacuum-packed sliced ham. **International Journal of Food Microbiology**, v. 240, p. 97–101, 2017.

SIVROPOULOU, A. et al. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1202–1205, 1996.

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. 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.
- SOARES, N. DE F. F. et al. Desenvolvimento e avaliação de filme ativo na conservação de batata minimamente processada. **Revista Ceres**, v. 53, n. 307, p. 387-393, 2006.
- SOARES, N. DE F. F.; SANTIAGO-SILVA, P.; SILVA, W. A. DA. Desenvolvimento e avaliação de filme ativo incorporado com óleo essencial de orégano orégano (*Origanum vulgare* L.) no crescimento de *Listeria innocua* em queijo Minas frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, n. 365, p. 36–40, 2008.
- SOYLU, E. M.; KURT, S.; SOYLU, S. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 183–189, 2010.
- STEKELNBURG, 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. et al. Predictive modelling of the microbial lag phase: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 137–159, 2004.
- TAHIRI, I. et al. Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked wild salmon. **Food Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 783–793, 2009.
- TASSOU, C. C.; DROSINOS, E. H.; NYCHAS, G. J. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 degrees and 10 degrees C. **The Journal of applied bacteriology**, v. 78, n. December 2015, p. 593–600, 1995.

TRIAS, R. et al. Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, n. 1–2, p. 50–60, 2008.

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.

TÜMMLER, B. et al. Advances in understanding *Pseudomonas*. **F1000prime reports**, v. 6, n. February, p. 9, 2014.

UGALDE, M. L. **Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões. Erechim, RS, 2014.

ULTEE, A et al. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal of food protection**, v. 63, n. 5, p. 620–624, 2000.

VAN IMPE, J. F. et al. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1–3, p. 97–105, 2005.

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.

WAN DAUD, W. R.; DJUNED, F. M. Cellulose acetate from oil palm empty fruit bunch via a one step heterogeneous acetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 252–260, 2015.

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

WHITING, R. C. Microbial modelling in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, p. 467-494, 1995.

WIDDERS, P. R. et al. Controlling Microbial-Contamination on Beef and Lamb Meat During Processing. **Australian veterinary journal**, v. 72, n. 6, p. 208–211, 1995.

WURLITZER, N. J. Desenvolvimento e avaliação de propriedades físicas e antimicrobianas de filmes de poli (cloreto de vinilideno) incorporados com triclosan. **Revista Ceres**, p. 91, 2007.

ZIVANOVIC, S., CHI, S., DRAUGHON, A. Antimicrobial Activity of Chitosan. **Science**, v. 70, n. 1, p. 45–51, 2005.