

VINICIUS BADIA

**MODELAGEM DO EFEITO DA APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
ALECRIM (*ROSMARINUS OFFICINALIS*) E ORÉGANO (*ORIGANUM VULGARE*)
SOBRE A VIDA ÚTIL DE LINGUIÇA TOSCANA EMBALADA A VÁCUO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do
Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial
para obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia
em Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Weber da Silva Robazza

Coorientadora: Profa. Dra. Mari Silvia R. de Oliveira

**PINHALZINHO, SC
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Badia, Vinicius

Modelagem do efeito da aplicação de óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e orégano (*Origanum vulgare*) sobre a vida útil de linguiça Toscana embalada a vácuo / Vinicius Badia. -- 2018.
96 p.

Orientador: Weber da Silva Robazza

Coorientadora: Mari Silvia Rodrigues de Oliveira

Dissertação (Mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Chapecó, 2018.

1. Linguiça Toscana. 2. Vida útil. 3. Bactérias ácido-lácticas. 4. Óleos essenciais . I. Robazza, Weber

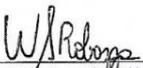
VINICIUS BADIA

**MODELAGEM DO EFEITO DA APLICAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAIS DE
ALECRIM (*ROSMARINUS OFFICINALIS*) ORÉGANO (*ORIGANUM VULGARE*)
SOBRE A VIDA ÚTIL DE LINGUIÇA TOSCANA EMBALADA A VÁCUO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC).

Banca Examinadora

Orientador:

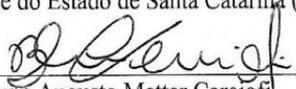


Prof. Dr. Weber da Silva Robazza
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Membros:



Prof. Dr. Alessandro Cazonatto Galvão
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)



Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

PINHALZINHO, 12 DE NOVEMBRO DE 2018

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Weber da Silva Robazza meu especial agradecimento. Obrigado por todos os ensinamentos e incentivos, pela paciência e dedicação e, sobretudo, pelo exemplo de profissionalismo e competência. A sua amizade levarei por toda minha vida!

Aos meus coorientadores Prof. Dr. Alessandro Cazonatto Galvão e Prof.^a Dr.^a. Mari Silvia Rodrigues de Oliveira, pela disponibilidade, companhia, amizade, apoio e paciência durante as análises. Obrigado por todo o esforço investido.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade do Estado de Santa Catarina e aos professores que fazem parte do corpo docente e que de certo modo contribuíram para minha formação profissional.

Ao Laboratório de Termofísica Aplicada – ApTher e a toda equipe que ofereceram totais condições e suporte para realização deste trabalho.

Ao programa de bolsas do Estado de Santa Catarina (UNIEDU).

Aos professores e técnicos do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria, especialmente aos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e de Análises Físico-Químicas pelo suporte no desenvolvimento experimental desta pesquisa.

À empresa Engenutri e Cleantec, em especial nas pessoas de Paulo Pons, Newton N. M. Battastini e Jorge Santin pela colaboração, confiança e total auxílio na execução deste trabalho. Meu muito obrigado a toda a equipe.

A minha mãe Dila e meu pai Sergio, por serem muito especiais, muito obrigado pelo amor, educação, carinho e apoio, ao longo de toda minha vida.

A minha irmã Vitória, minha melhor amiga.

A meu amor, Gabriela. Obrigado por ser essa companheira incrível e maravilhosa, por me fazer muito feliz através de seu apoio, conversas, conselhos e brincadeiras para aliviar a saudade devido à distância.

Aos meus amigos por terem sido fundamentais nestes anos de convívio e amizade sincera.

A todos, novamente, o meu muito obrigado de coração!

RESUMO

Este estudo visou avaliar a influência da adição de óleo essencial de orégano e alecrim sobre a vida útil de linguiça Toscana armazenada a vácuo à 4 °C. Foram utilizados 10 tratamentos: um controle (sem adição de óleo), um com a adição de um *blend* comercial composto por ácidos orgânicos, o qual é comumente utilizado pelas indústrias do setor e quatro diferentes concentrações de cada óleo essencial (0,05%, 0,1%, 0,2% e 0,4%). De acordo com a literatura, foram utilizados dois critérios para a avaliação da vida útil da linguiça Toscana: como o tempo necessário para a população de bactérias ácido-lácticas alcançar o nível de 7 logaritmos de UFC/g e como o tempo necessário para o pH atingir o valor de 5,5. Os valores da vida útil previstos de acordo com o segundo critério foram inferiores aos previstos pelo primeiro. Entretanto, como o primeiro critério é mais utilizado pelos pesquisadores da área, os resultados obtidos com este critério foram considerados como mais fidedignos. Foi observado que para menores concentrações de óleo essencial (0,05% e 0,1%), o alecrim forneceu melhores resultados que o orégano. Por outro lado, para as maiores doses, os melhores resultados foram obtidos com o orégano. No que diz respeito ao pH e a cor das amostras, os resultados indicaram que os tratamentos com óleo essencial e o com o *blend* comercial promoveram uma maior estabilidade das amostras. Concluiu-se que a adição de óleos essenciais pode ser uma boa opção para o aumento da vida útil do produto.

Palavras-chave: Linguiça Toscana. Vida útil. Bactérias ácido-lácticas. Óleos essenciais.

ABSTRACT

The purpose of the current study was to evaluate the influence of the addition of oregano and rosemary essential oils on the shelf life of refrigerated vacuum-packed Tuscan sausage. There were used 10 different treatments to accomplish this task: the control (without oil), one with the addition of a commercial blend composed by organic acids commonly used in the industry, and four different concentrations of essential oil (0.05%, 0.1%, 0.2%, and 0.4%). Two criteria were adopted to evaluate the shelf life: it was estimated as the time to the lactic acid bacterial population attains 7 log CFU/g and it was also evaluated as the time to the pH of the samples reaches the level of 5.5. The shelf life values estimated with the second criterion were lower in relation to the values obtained when the first one was employed. However, as the shelf life is more commonly evaluated through the lactic acid bacterial counting, the conclusions obtained with these results were assumed as closer to the reality. It was obtained that after the addition of lower concentrations of essential oil (0.05% and 0.1%), the increase of the shelf life was higher for the rosemary in relation to the oregano. On the other hand, the oregano furnished better results when higher doses of essential oil were added to the Tuscan sausage. Regarding the pH and color of the samples, results showed that all of the treatments with the essential oils and the treatment with the commercial blend stabilized the samples. It was concluded that the addition of essential oils can be a useful tool to increase the shelf life of the Tuscan sausage.

Keywords: Tuscan sausage. Shelf life. Lactic acid bacteria. Essential oils.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma para elaboração de linguiças frescas.	20
Figura 2 – Fórmulas estruturais de componentes selecionados de diferentes óleos essenciais.	27
Figura 3 – Mecanismo de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais nos micro-organismos Gram-positivos.	28
Figura 4 – Mecanismos de ação reportados para os óleos essenciais e seus componentes e sua localização na célula bacteriana.	29
Figura 5 – Folhas do Orégano (<i>Origanum vulgare</i>).	29
Figura 6 – Folhas de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>).	32
Figura 7 – Curva típica de crescimento microbiano em um ambiente estacionário.	35
Figura 8 – Curvas obtidas após o ajuste dos modelos de Baranyi-Roberts (vermelho), Huang (azul) e Robazza et al. (verde) para a amostra controle (a) e o <i>blend</i> comercial de ácidos orgânicos (b) em linguiça Toscana armazenada a 4 °C e embalada a vácuo.	49
Figura 9 – Curvas obtidas após o ajuste dos modelos de Baranyi-Roberts (vermelho), Huang (azul) e Robazza et al. (verde) para amostras adicionadas com diferentes concentrações 0,05% (a), 0,1% (b), 0,2% (c) e 0,4% (d) de OEA em linguiça Toscana armazenada a 4 °C e embalada a vácuo.	50
Figura 10 – Curvas obtidas após o ajuste dos modelos de Baranyi-Roberts (vermelho), Huang (azul) e Robazza et al. (verde) para amostras adicionadas com diferentes concentrações 0,05% (a), 0,1% (b), 0,2% (c) e 0,4% (d) de OEO em linguiça Toscana armazenada a 4 °C e embalada a vácuo.	51
Figura 11 – Procedimentos de cálculo da vida útil para cada tratamento com OEA para os modelos de BAR (a), HUG (b) e ROB (c). As linhas sólidas verticais (coloridas) correspondem à vida útil prevista para cada tratamento e a linha sólida horizontal (preta) define a contagem de BAL estabelecida como limite.	52
Figura 12 – Procedimentos de cálculo da vida útil para cada tratamento com OEO para os modelos de BAR (a), HUG (b) e ROB (c). As linhas sólidas verticais (coloridas) correspondem à vida útil prevista para cada tratamento e a linha sólida horizontal (preta) define a contagem de BAL estabelecida como limite.	54
Figura 13 – Curvas obtidas após o ajuste da Equação 13 aos dados de vida útil estimados pelo modelo de Baranyi-Roberts para os tratamentos com OEA (a) e OEO (b).	60
Figura 14 – Curvas obtidas após o ajuste da Equação 13 aos dados de vida útil estimados pelo modelo de Huang para os tratamentos com OEA (a) e OEO (b).	60
Figura 15 – Curvas obtidas após o ajuste da Equação 13 aos dados de vida útil estimados pelo modelo de Robazza et al. para os tratamentos com OEA (a) e OEO (b).	61

Figura 16 – Curvas obtidas após ajuste da Equação 7 aos dados de pH em função do tempo. As linhas sólidas verticais correspondem ao prazo de validade previsto para cada tratamento.....	63
Figura 17 – Curvas obtidas para a vida útil das amostras tratadas com OEA (a) e OEO (b) e função da concentração de óleo essencial usando o pH de 5,5 como limite.....	66
Figura 18 – Cinética de diminuição do pH em função da população de BAL para cada tratamento com OEA (a) e OEO (b). O modelo de Weibull foi ajustado aos dados experimentais.	67
Figura 19 – Variação da atividade de água durante armazenamento para os diferentes tratamentos empregados.....	69
Figura 20 – Variação do parâmetro L* das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, <i>blend</i> e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).	71
Figura 21 – Variação do parâmetro L* (iluminante D65) das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, <i>blend</i> e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).	72
Figura 22 – Variação do parâmetro a* das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, <i>blend</i> e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).	73
Figura 23 – Variação do parâmetro a* (iluminante D65) das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, <i>blend</i> e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).	73
Figura 24 – Variação do parâmetro b* das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, <i>blend</i> e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).	74
Figura 25 – Variação do parâmetro b* (iluminante D65) das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, <i>blend</i> e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).	75
Figura 26 – Variação do parâmetro C* das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, <i>blend</i> e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).	75
Figura 27 – Variação do parâmetro C* (iluminante D65) das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, <i>blend</i> e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).	76
Figura 28 – Variação de h° das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, <i>blend</i> e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).	77
Figura 29 – Variação de h° (iluminante D65), das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, <i>blend</i> e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Visão geral de estudos que avaliam a atividade antibacteriana de diferentes concentrações de óleo essencial de orégano em bactérias deteriorantes e patogênicas presentes em carne e produtos cárneos refrigerados.....	31
Tabela 2 – Visão geral de estudos que avaliam a atividade antibacteriana de diferentes concentrações de óleo essencial de alecrim em bactérias deteriorantes e patogênicas presentes em carne e produtos cárneos refrigerados.....	33
Tabela 3 – Ingredientes e aditivos utilizados nas formulações das linguiças Toscanas.	40
Tabela 4 – Composição química observada nos óleos essenciais de alecrim e orégano determinados por CG-MS.....	48
Tabela 5 – Parâmetros cinéticos de crescimento das BAL estimados pelos modelos de Baranyi-Roberts (BAR), Huang (HUG) e Robazza et al. (ROB) (\pm intervalo de confiança de 95%).	56
Tabela 6 – Comparação dos parâmetros de estatísticos obtidos após ajustes dos modelos de Baranyi-Roberts (BAR), Huang (HUG) e Robazza et al. (ROB) aos dados experimentais.....	57
Tabela 7 – Vida útil da linguiça Toscana estimada através das equações de Baranyi-Roberts (ROB), Huang (HUG) e Robazza et al. (ROB) através dos diferentes tratamentos.	59
Tabela 8 – Parâmetros estatísticos obtidos pelos ajustes da Equação 13 aos dados de vida útil da linguiça Toscana estimados pelos modelos primários de Baranyi-Roberts (BAR), Huang (HUG) e Robazza et al. (ROB).	62
Tabela 9 – Parâmetros cinéticos (\pm intervalo de confiança de 95%) e vida útil da linguiça Toscana estimada através do ajuste da Equação 7 aos dados experimentais para cada tratamento.....	64
Tabela 10 – Parâmetros estatísticos estimados pelos ajustes da Equação 7 aos dados experimentais para cada tratamento.....	65
Tabela 11 – Funções empíricas e índices estatísticos obtidos após ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais de pH em função da população de BAL.....	68
Tabela 12 – Valores de k estimados e índices estatísticos obtidos após ajuste da Equação 5 aos dados dos diferentes parâmetros (L^* , a^* , b^* , C^* e h°) de coloração para os iluminantes (A) e iluminante (D65).....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

Elemento	Descrição	Unidade
<i>Letras latinas</i>		
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	-
BAL	Bactérias ácido-láticas	UFC/g
GRAS	Geralmente São Reconhecidos Como Seguros	-
OE	Óleo essencial	% (m/m)
MRS	<i>Man, Rugosa and Sharpe</i>	-
N	Concentração bacteriana	UFC/g
Y	Concentração bacteriana	UFC/g
N_0	População bacteriana inicial	UFC/g
Y_0	População bacteriana inicial	UFC/g
t	Tempo	dias
t^*	Ponto de inflexão	dias
erf	Função erro de Gauss	-
N_{max}	População bacteriana final	UFC/g
Y_{max}	População bacteriana final	UFC/g
T	Temperatura	°C
t_{SL}	Tempo de vida útil	dias
A_w	Atividade de água	-
a	Coefficiente angular	-
b	Coefficiente linear	-
L^*	Luminosidade	-
a^*	Intensidade de vermelho	-
b^*	Intensidade do amarelo	-
C^*	Índice de saturação	-
h°	Ângulo de tonalidade	-
k	Constante da reação	-
A	Amplitude de crescimento bacteriano	UFC/g
\bar{y}	Média aritmética dos valores	-
Lp	Logaritmo do máximo da função de verossimilhança	-
RMSE	Raiz quadrada do erro quadrático médio	-
MAE	Erro médio absoluto	-
AIC	Critérios de informação de Akayke	-
BIC	Critérios de informação de Bayesiano	-
AF	Fator de exatidão	-
BF	Fator de tendência	-
R^2	Coefficiente de determinação	-
T_R	Tempo de retenção	Minutos
UFC	Unidade Formadora de colônia	g
p	Número de parâmetros	-
n	Número de pontos experimentais	-
OEA	Óleo essencial de alecrim	% (m/m)
OEO	Óleo essencial de orégano	% (m/m)
BAR	Modelo de Baranyi-Roberts	-
ROB	Modelo de Robazza et al.	-
HUG	Modelo de Huang	-
Blend	Mistura de ácidos orgânicos	% (m/m)

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

Elemento	Descrição	Unidade
<i>Letras Gregas</i>		
α	Estado fisiológico das células	-
μ	Velocidade máxima de crescimento específico	dias ⁻¹
β	Função de transição	adimensional
γ	Fase de adaptação inicial	dias
δ	Redução de 1 logaritmo	[UFC/g]
<i>Subscritos e sobrescritos</i>		
0	Inicial	-
<i>exp</i>	Valores experimentais	-
<i>pred</i>	Valores preditos	-
<i>max</i>	Máximo	dias
<i>lag</i>	Adaptação	-
<i>n</i>	Enésimo número	-

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 PRODUTOS CÁRNEOS.....	16
2.2 DETERIORAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS	17
2.3 LINGUIÇAS FRESCAIS	18
2.3.1 Definições, padrões físico-químicos e microbiológicos da linguiça Toscana	19
2.3.2 Processamento, matéria-prima e ingredientes da linguiça Toscana	20
2.4 BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS E A DETERIORAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS	23
2.5 A UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTIMICROBIANOS NATURAIS EM PRODUTOS CÁRNEOS	24
2.5.1 A composição dos óleos essenciais	26
2.5.2 Mecanismos de ação dos óleos essenciais	27
2.6 ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (<i>Origanum vulgare</i>).....	29
2.7 ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	31
2.8 MICROBIOLOGIA PREDITIVA	33
2.8.1 Curvas de crescimento microbiano	34
2.8.2 Modelo de Baranyi-Roberts	35
2.8.3 Modelo de Huang	36
2.8.4 Modelo de Robazza et al.	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.1.1 Objetivos específicos	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 OBTENÇÃO, EXTRAÇÃO E RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	39
4.2 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA GASOSA / ESPECTROMETRIA DE MASSA ..	39
4.3 PREPARAÇÃO EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO DA LINGUIÇA TOSCANA	40
4.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	41
4.5 ANÁLISE DE pH.....	42

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA (a_w).....	42
4.7 ANÁLISE DE COR.....	43
4.8 MODELAGEM MATEMÁTICA	44
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	47
5.2 COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	47
5.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E MODELAGEM MATEMÁTICA.....	48
5.3.1 Ajustes primários de crescimento	48
5.3.2 Avaliação da vida útil em função da concentração de óleo essencial.....	58
5.4 ANÁLISES DE pH.....	62
5.4.1 pH em função da população de BAL	66
5.5 MODELAGEM DA ATIVIDADE DE ÁGUA	68
5.6 CINÉTICA DE VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE COR.....	69
6 CONCLUSÕES.....	79
7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS:	80
REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é a segunda potência mundial no mercado global de carnes, desempenhando um papel importante na produção mundial (BRASIL, 2016). Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), a produção brasileira de carne suína no ano de 2017 foi de aproximadamente 3,7 milhões toneladas com exportação de 1,4 milhões toneladas as quais foram divididas entre cortes, carcaças, miúdos, gordura e embutidos. Deste total de produção, o estado de Santa Catarina é o maior produtor e exportador de carne suína do Brasil, tendo sido responsável por 26,55% da produção e 37,90% da exportação de acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). A produção global de carne é projetada para ser 16% maior em 2025 do que no período de (2013-2015) (FAO, 2009).

Dentre os produtos cárneos, as linguiças frescas estão entre os produtos de carne processada mais comuns, populares e consumidos em todo o mundo (GEORGANTELIS et al., 2007; ŠOJIC et al., 2018). Uma das mais importantes linguiças frescas é a linguiça Toscana, a qual é definida como um produto cru e curado fabricado exclusivamente com carne suína, gordura suína e condimentos (BRASIL, 2000). Estes produtos são altamente perecíveis e têm uma vida útil curta (PRICE; SCHWEIGERT, 1994). O principal grupo bacteriano associado à deterioração de produtos cárneos curados, especialmente em produtos embalados a vácuo, como a linguiça Toscana, são as bactérias ácido-láticas (BAL) (VARNAM; SUTHERLAND, 1995; BORCH et al., 1996). A combinação de condições microaerófilas, presença de nitrito e nitrato de sódio e a alta atividade de água (a_w) favorece o crescimento das BAL (AUDENAERT et al., 2010).

Os produtos cárneos são altamente propensos à contaminação microbiana, uma vez que são ricos em nutrientes essenciais e de natureza perecível. Nas linguiças frescas, como a linguiça Toscana, isto é ainda mais acelerado por fatores intrínsecos do produto, tais como pH, atividade de água (a_w), estrutura triturada de matérias-primas e a falta de tratamento térmico. Assim, a deterioração da qualidade e potenciais problemas de saúde pública são comuns se esses produtos não forem adequadamente manuseados, preservados e armazenados (FRATIANNI et al., 2010; SOLOMAKOS et al., 2008).

Os óleos essenciais (OE) são compostos complexos, naturais e voláteis. Eles estão presentes em plantas aromáticas como metabólitos secundários e são caracterizados por um forte odor. Existem entre 20 e 60 componentes que compõem um OE, sendo que geralmente dois ou três componentes principais em concentrações razoavelmente altas são responsáveis

pela bioatividade (BAKKALI et al., 2008). Óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (OEA) e óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) (OEO) são conhecidos por sua atividade antimicrobiana e são comumente usados para prolongar a vida útil de muitos produtos alimentícios, principalmente produtos cárneos (MCMILLIN, 2017). Vários estudos indicam que a atividade antimicrobiana de um determinado OE pode ser atribuída aos seus principais constituintes devido à interação que ocorre entre eles (HYLDGAARD et al., 2012). Em resumo, os OEs podem degradar a parede celular bacteriana, perturbar a bicamada fosfolipídica da membrana citoplasmática e danificar as proteínas da membrana, levando ao aumento da permeabilidade da membrana celular e levando à perda de constituintes celulares. Muitos OEs são classificados como seguros pela *Food and Drug Administration* (FDA) e a utilização deles como agentes antimicrobianos naturais, conservantes para estender o prazo de validade dos alimentos, aumentou significativamente.

A microbiologia preditiva é uma ferramenta útil para entender e quantificar as respostas microbianas em produtos alimentícios submetidos a diferentes condições ambientais. De acordo com este campo da microbiologia de alimentos, a cinética microbiana pode ser caracterizada por diferentes parâmetros que afetam o crescimento microbiano e a sobrevivência. Usando dados experimentais previamente obtidos, modelos matemáticos são aplicados para prever respostas microbianas em ambientes similares. Os resultados obtidos podem ser aplicados na análise de risco e para prever a vida útil de um dado produto alimentar (ROSS et al., 2000).

Este estudo buscou avaliar a influência de um *blend* comercial de ácidos orgânicos e diferentes concentrações de OEA e OEO para descrever o crescimento de BAL em amostras de linguiça Toscana armazenadas a 4 °C e embaladas a vácuo. Foram avaliados parâmetros físico-químicos e microbiológicos, tais como o pH, a atividade de água, a cor das amostras e a contagem das bactérias ácido-lácticas. Além disso, foi feita uma avaliação cromatográfica dos componentes dos óleos essenciais e a estimativa da vida de prateleira da linguiça foi obtida através do emprego de modelos matemáticos. Como resultado, espera-se que uma melhor compreensão da influência desses compostos possa contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos que prolongam a vida útil da linguiça Toscana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na fundamentação teórica estão apresentados conceitos acerca de produção, parâmetros de qualidade, microbiológicos, físicos e químicos dos efeitos da aplicação de óleos essenciais em produtos cárneos e na linguiça Toscana.

2.1 PRODUTOS CÁRNEOS

A carne suína é uma das fontes de proteínas animais mais importantes do mundo. No Brasil, a carne suína ocupa o terceiro lugar na preferência do consumidor atrás da carne de frango e bovina. A carne de suína preferencialmente consumida através de produtos processados ao invés da carne suína fresca (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA - ABIPECS, 2014).

Entendem-se como produtos cárneos processados ou preparados, aqueles em que as propriedades originais da carne fresca foram modificadas através de tratamento físico, químico ou biológico, ou ainda, através da combinação destes métodos. Tais processos visam o prolongamento da vida útil dos produtos, procurando manter suas propriedades nutritivas e sensoriais (PARDI et al., 1993; BALIN, 2010).

O Brasil é um dos principais exportadores e consumidores de produtos cárneos do mundo. Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), no ano de 2017 o Brasil produziu 3,73 milhões de toneladas de carne suína. Deste total, o Estado de Santa Catarina foi responsável por 26,35% da produção e ainda se consolidou como o maior exportador de carne suína do Brasil. No total, o Brasil se consolidou como o quarto maior produtor de carne suína do mundo, com aproximadamente 3,7 milhões de toneladas produzidas anualmente.

Como outras carnes, a carne suína e seus produtos frescos industrializados são uma fonte rica em proteínas, gorduras, vitaminas e micronutrientes de alto valor. Portanto, ela desempenha um papel importante na dieta humana. Por outro lado, a carne suína apresenta as condições ideais para o crescimento de bactérias patogênicas e deteriorantes. Além disso, trata-se não somente de uma fonte comum de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, mas também é uma das carnes mais suscetíveis à deterioração porque apresenta mais bactérias do que outros tipos de carne (MATARAGAS et al., 2008; RAHMATI et al., 2016).

Um nível significativo de deterioração de carne e produtos cárneos ocorre a cada ano em diferentes níveis da cadeia de produção, incluindo a preparação, armazenamento e distribuição. No entanto novas técnicas para a produção de alimentos seguros e de alta qualidade, juntamente com a demanda recente dos consumidores por produtos naturais e rótulos limpos, são grandes desafios para a indústria (JAYASENA e JO, 2013).

2.2 DETERIORAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS

Carne e produtos à base de carne são muito favoráveis para o desenvolvimento bacteriano, uma vez que são ricos em nutrientes essenciais e de natureza perecível, onde este processo pode ser mais acelerado por alguns fatores intrínsecos, incluindo pH e a_w . Em geral, a maioria das carnes frescas tem um valor de a_w superior a 0,85 e seu valor de pH dentro da faixa favorável para o desenvolvimento de bactérias deteriorantes e patogênicas (GOVARIS et al., 2010).

Dependendo do método de preservação utilizado, o crescimento e o metabolismo de micro-organismos deteriorantes e patogênicos podem causar uma deterioração rápida dos produtos cárneos. Embora os micro-organismos deteriorantes normalmente não causem doenças, eles podem resultar em distúrbios gastrointestinais quando consumidos em altas concentrações (DZUDIE et al., 2004; FRATIANNI et al., 2010; DAVE; GHALY, 2011).

Portanto, a deterioração da qualidade da carne e seus produtos industrializados e processados são potenciais problemas de saúde pública se esses produtos não forem devidamente manipulados e preservados, podendo levar a um impacto econômico e ambiental se medidas cautelosas em seu processamento não forem tomadas (SOLOMAKOS et al., 2008).

O controle da qualidade das carnes e produtos cárneos concentra-se no monitoramento dos pontos críticos de controle (PCC) durante o ciclo de vida da carne desde o momento do abate do animal, processamento e distribuição até a chegada do produto para o consumidor final. No entanto, a carne é um alimento altamente perecível, que necessita de um controle bem detalhado dos fatores intrínsecos e extrínsecos que podem ocasionar sua deterioração. Dentre os fatores intrínsecos se encontram: pH, a_w , composição do alimento e interações entre os micro-organismos presentes no produto e entre os fatores extrínsecos, podem ser mencionados: temperatura, atmosfera da embalagem, umidade e exposição à luz (TERRA; BRUM, 1988; RUSSELL; FLETCHER; COX, 1996; LAMBALLERIE-ANTON et al., 2002;

JUNEJA et al., 2009; ZHOU et al., 2010).

Os micro-organismos encontrados na carne e produtos cárneos são provenientes de várias fontes. A maioria da microbiota da carne é composta de micro-organismos encontrados na superfície e/ou no interior do animal. Contudo, as condições ambientais, as operações de processamento, a manipulação e os procedimentos de limpeza e sanitização das instalações têm uma grande influência sobre os tipos e quantidade de micro-organismos encontrados na carne (KINSMAN et al., 1994).

Os micro-organismos associados à deterioração da carne e dos produtos cárneos processados e industrializados, incluem principalmente bactérias como *Pseudomonas* ssp. e bactérias ácido-lácticas, tais como: *Acinetobacter*, *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus* spp. e Enterobactérias. Estas bactérias são responsáveis por causarem defeitos de qualidade, no sabor, odor e textura do produto podendo proporcionar problemas à saúde se consumidas em grandes quantidades (FRATIANNI et al., 2010; TAUXE et al., 2010).

Garantir a vida útil dos alimentos e a sua segurança microbiológica implica em minimizar níveis de contaminação, limitando ou impedindo a taxa de crescimento microbiano. Muitas estratégias são adotadas pelas indústrias processadoras de alimentos, e estas têm contribuído para tal finalidade com a implantação de programas de qualidade, novas tecnologias, novas embalagens, além de inúmeros métodos de conservação (McMEEKIN et al., 1997).

2.3 LINGUIÇAS FRESCAIS

As linguiças frescas, são produtos fabricados a partir de carnes frescas moídas de diferentes espécies de carne, embutidas em envoltórios naturais de bovinos ou suínos (RAJU et al., 2004; SALLAM; SAMEJIMA, 2004). As linguiças frescas e congeladas são os produtos de carne processada mais consumidos e produzidos no Brasil, além de serem altamente perecíveis e constituírem o meio ideal para o desenvolvimento de bactérias deteriorantes e patogênicas (PRICE; SCHWEIGERT, 1994; TERRA, 1998; GALVAN et al., 2011). A deterioração desses produtos envolve um processo complexo e quantidades excessivas de alimentos podem ser perdidas, o que resulta em altas perdas econômicas (LIU et al., 2006; GEORGANTELIS et al., 2007).

Os fatores intrínsecos que afetam o crescimento bacteriano e, portanto, o potencial de deterioração das linguiças frescas, incluem o pH, que não deve ser inferior a 5,5, a

disponibilidade de nutrientes, a atividade de água, a qual é igual ou superior a 0,95, e potencial de oxidação/redução (KOUTSOUMANIS et al., 2008). Os fatores extrínsecos incluem a temperatura onde as linguiças frescas são geralmente armazenadas (abaixo de 5 °C) antes do consumo, diâmetro de corte da moagem da carne, ambiente e material de embalagem (RUST, 1987; SILVEIRA et al., 2014).

O primeiro indício de alteração na carne fresca e produtos à base de carne é a produção de odores desagradáveis, perceptíveis quando o número de micro-organismos deteriorantes existentes atinge um nível entre 10^6 e 10^7 UFC/g. Neste momento crítico, os micro-organismos passam da utilização de glicose à utilização de aminoácidos como substrato para o seu crescimento. Assim, o metabolismo bacteriano origina misturas complexas de ésteres voláteis, álcoois, cetonas e compostos sulfurados que produzem odores desagradáveis. Nas últimas fases de alteração se observa uma diminuição do pH e limosidade superficial (ADAMS; MOSS, 1997).

A deterioração das linguiças frescas pode resultar em alterações nas características sensoriais (cor, odor, sabor e textura) do produto que podem ser inaceitáveis para os consumidores (ZHOU et al., 2010). No entanto, obter novos métodos e tecnologias que controlem o crescimento bacteriano é o fator mais importante para evitar a deterioração desse produto.

2.3.1 Definições, padrões físico-químicos e microbiológicos da linguiça Toscana

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) através do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) estabelece que linguiça Toscana é o produto bruto cru e curado fabricado e obtido exclusivamente com carne suína, gordura suína e condimentos embutida em envoltório natural ou artificial, não sendo permitida a adição de proteínas não cárneas, porém permitindo-se a adição de 3% de água em sua formulação (USDA-FSIS, 2014; BRASIL, 2017). No entanto, este produto pode ter sua classificação variável de acordo com a composição da matéria-prima e a tecnologia utilizada no processo de fabricação.

Segundo a resolução RDC nº 12 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece os padrões microbiológicos para linguiça crua e similares as mesmas devem conter os seguintes parâmetros microbiológicos em tolerância para amostra indicativa de coliformes a 45 °C/g de até 5×10^3 UFC/g, *Staphylococcus coagulase positiva* de

até 5×10^3 UFC/g, *Clostridium Sulfito Redutor* a 46°C de até 3×10^3 UFC/g e *Salmonella spp.* ausência total em 25 g (BRASIL, 2001).

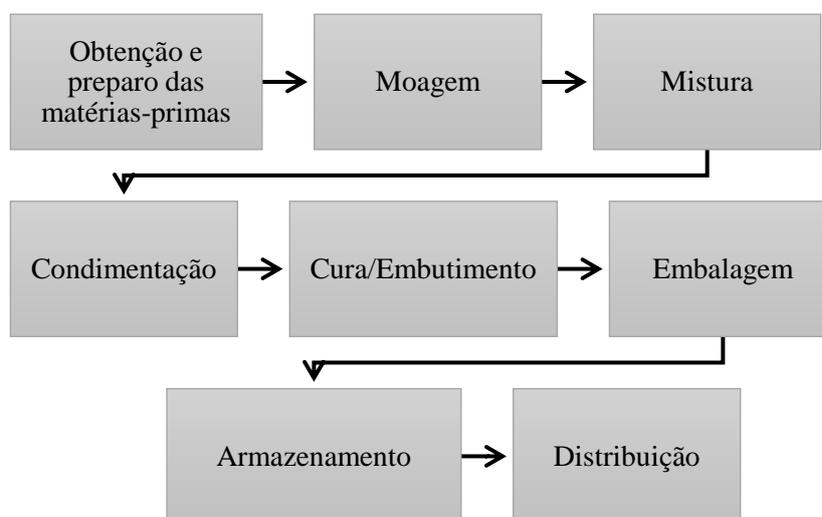
O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) (BRASIL, 2017), define os parâmetros físico-químicos para linguiças frescas entre elas a linguiça Toscana com umidade máxima de 70%, gordura máxima de 30%, teor de proteína mínimo de 12%, e 0,1% de cálcio em (base seca).

A linguiça Toscana é altamente perecível possui uma curta vida útil mesmo quando armazenada sob temperaturas de refrigeração, isto se deve ao fato desse produto conter um alto teor de gordura, processamento das matérias-primas, alto teor de água e, por se tratar de um produto que só terá tratamento térmico antes de seu consumo, esse produto é extremamente propenso a deterioração microbiana e também pela oxidação lipídica (GEORGANTELIS et al., 2007).

2.3.2 Processamento, matéria-prima e ingredientes da linguiça Toscana

A fabricação e processamento das linguiças frescas, requerem uma série de etapas de manipulação conforme a Figura 1, o que eleva as possibilidades de contaminação por diversas espécies de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, podendo comprometer a qualidade microbiológica do produto final. Desta forma, a qualidade do produto elaborado reflete nas condições da matéria-prima e ingredientes empregados em sua produção (OCKERMAN; BASU, 2014).

Figura 1 – Fluxograma para elaboração de linguiças frescas.



Fonte: Adaptado de Ockerman e Basu, 2014.

A conservação e o processamento da carne envolvem a aplicação de medidas para retardar ou prevenir alterações microbiológicas, químicas ou físicas que a tornam imprópria para o consumo ou que reduzem alguns aspectos da sua qualidade. Apesar de os vários tipos de alterações serem significativas, a deterioração microbiológica é a mais importante e geralmente ocasiona outros tipos de deterioração da carne (BORCH et al., 1996).

Em sua fabricação, as carnes e a gordura são moídas, normalmente, em discos de diâmetro de 8 a 18 mm e transportados até a misturadeira onde receberão as demais matérias-primas e ingredientes. Concluída a mistura, a massa é embutida em tripa natural ou artificial, em gomos com o tamanho característico (TERRA, 1998).

A carne a ser utilizada no preparo da linguiça, deve estar livre de nervos, tecidos com hematomas, pequenos pedaços de ossos e objetos estranhos. Durante o processamento, a cor dos tecidos musculares se não controlada influenciará a coloração do produto cárneo processado. O tecido muscular suíno pálido, macio e exsudável (PSE) não só resultará em uma cor mais clara, mas também resultará em um maior encolhimento quando o produto passar por tratamento térmico. Por outro lado, o tecido muscular suíno escuro, firme e seco (DFD) resultará em linguiças mais escuras com um pH mais favorável para o crescimento bacteriano e aumento da capacidade de retenção de água (CRA) (PARDI, 1993; PEARSON; GILLET, 1996).

A gordura é utilizada como matéria prima de grande importância nas linguiças, sendo a fração entre os componentes básicos da carne (umidade, proteínas, cinza) mais variável do ponto de vista quantitativo e qualitativo. Ela se deposita principalmente na cavidade corporal, zona subcutânea, intermuscular e intramuscular do suíno (BORCH, 1996). A gordura utilizada na elaboração de embutidos é principalmente da região dorsal (toucinho), na qual a relação entre ácidos graxos saturados e insaturados permite que permaneça no estado sólido, à temperatura ambiente (TERRA, 1988).

A condimentação varia de acordo com os indivíduos que fabricam os produtos. Na maioria dos casos, a mistura apropriada deve ser selecionada de acordo com o gosto requerido do mercado consumidor, uma vez que existe uma ampla gama de preferências étnicas e regionais por condimentos (TERRA, 1988).

Na formulação das linguiças, são utilizados também como ingredientes nitrito e nitrato, os quais atuam como agentes seletivos no desenvolvimento de micro-organismos. Estes conservantes têm a finalidade de fixação da cor rósea, processo da cura (maturação),

aspecto sensorial, e conferem proteção contra o *Clostridium botulinum* (HUGO; HUGO, 2015). Embora, a presença de *Clostridium botulinum* ser a maior preocupação, o nitrito e nitrato de sódio também são eficientes contra *Staphylococcus aureus*, sendo que esta eficiência aumenta com a diminuição do pH. Porém, é ineficaz contra *Enterobacteriaceae spp.*, *Salmonella spp.* e bactérias ácido-láticas (FRANCO; DE MELLO; LANDGRAF, 1996).

O sal e o açúcar bem como o nitrito e nitrato de sódio, também são utilizados como agentes conservantes nas linguiças, além de possuírem função tecnológica importante. O sal, cloreto de sódio, auxilia na conservação do produto. Além disso, o sal é um agente que reforça o sabor das demais especiarias. Finalmente, o sal extrai as proteínas solúveis da carne, tornando-as disponíveis como emulsificantes (TERRA, 1988; PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

Logo após o abate do animal, a carne tem uma capacidade ótima de retenção de água. Após a morte, com o desenvolvimento do *rigor mortis*, a carne perde esta capacidade, mas para a produção de embutidos ela deve ser recuperada. Este processo é revertido pela adição de sal e fosfatos também conhecidos como emulsificantes. Uma boa retenção de água facilita a formação da emulsão (TERRA, 1998).

Após preparada, a massa da linguiça passa pelo processo de embutimento, no qual a massa cárnea é acondicionada em envoltórios/tripas, naturais ou artificiais, a fim de proteger os produtos de influências externas, além de lhe dar forma e estabilidade. Estes envoltórios podem ser derivados do colágeno, celulose e plástico (TERRA; TERRA; TERRA, 2001).

A embalagem influencia a qualidade e a durabilidade dos produtos cárneos, pois altera o ambiente ao redor do produto, criando condições que retardam as reações de deterioração. A embalagem previne perdas de peso e alterações de aparência, textura e aroma. Contudo, a maior alteração no ambiente que circunda o produto, provocada pela embalagem, é quanto à composição gasosa. Esta atmosfera irá determinar a cor do produto, o tipo e a extensão da deterioração microbológica e a taxa de oxidação dos seus componentes (HOOGENKAMP, 2001). Nas embalagens a vácuo, a taxa de permeabilidade ao oxigênio do material influi diretamente na vida de prateleira do produto, pois a entrada de pequena quantidade de oxigênio na embalagem gera uma baixa pressão parcial deste gás, suficiente para a oxidação do pigmento de carnes frescas e curadas (BALEY, 1970).

2.4 BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS E A DETERIORAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS

As bactérias ácido-lácticas (BAL), são o principal grupo bacteriano associado à deterioração de produtos cárneos embalados a vácuo e mantidos sob condições de refrigeração incluindo, linguiças frescas armazenadas a vácuo (VARNAM; SUTHERLAND, 1995; CASABURI et al., 2015). Essas constituem um grupo que tem sido amplamente associado com a deterioração de carne e produtos à base de carne, estando associadas ao grupo que contribui para a geração de metabólitos ofensivos e a posterior degradação organoléptica da carne (HUIS IN'T VELD, 1996; LABADIE, 1999).

As BAL possuem características morfológicas, fisiológicas, metabólicas e bioquímicas comuns podendo ser classificadas como Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase e oxidase negativas, que se apresentam na forma de cocos ou bacilos, microaerófilas e anaeróbicas facultativas. São geralmente mesófilas, pois a temperatura ótima de crescimento se situa na faixa entre 30 °C e 35 °C. No entanto, elas conseguem se desenvolver numa ampla faixa de temperatura entre 3 °C e 45 °C (MASSAGUER, 2006).

Na maioria dos produtos cárneos embalados a vácuo, as BAL predominam devido à capacidade de tolerarem baixos valores de pH e possuem metabolismo estritamente fermentativo, sendo assim classificadas como homofermentativas e heterofermentativas, de acordo com o produto da fermentação. Como característica geral, as bactérias homofermentativas produzem ácido láctico através da fermentação e nesta classificação estão incluídos os gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Pediococcus*. Por outro lado, as heterofermentativas produzem ácido láctico ($C_3H_6O_3$), dióxido de carbono (CO_2), ácido acético ($C_2H_4O_2$) e etanol (C_2H_6O). Por esta razão, elas são responsáveis pelo desenvolvimento da acidez dos produtos e pelo aparecimento de aromas e sabores específicos. As principais bactérias heterofermentativas são as dos gêneros: *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium* e *Lactosphaera* (GUERRERO; CHABELA, 2000; LYHS, 2002; JAY, 2005; MASSAGUER, 2006; JANSSEN et al., 2006). A coloração esverdeada da carne é ocasionada pelo sulfeto de hidrogênio produzido a partir de cisteína, onde as bactérias transformam os pigmentos vermelhos da carne (mioglobina) para verde (sulfomioglobina) (BORCH et al., 1996).

O crescimento das BAL é favorecido por uma combinação de condições microaerófilas no produto cárneo, a presença de cloreto de sódio e nitrito e nitrato de sódio e um valor alto da atividade de água (0,95 a 0,98), além de pH em torno de 6,0 (AUDENAERT

et al., 2010). No entanto, ainda não é totalmente claro em que medida as BAL presentes nos produtos cárneos provêm da carne ou do meio ambiente, com a contaminação subsequente durante o manuseio (HOLZAPFEL et al., 2001; VASILOPOULOS et al., 2010).

A legislação brasileira não estabelece um limite para a concentração da flora deteriorante das BAL, mas muitos autores (SLONGO et al., 2009; KREYENSCHMIDT et al., 2010; KARABAGIAS et al., 2011; MENEZES et al., 2018) utilizam o critério definido pelo *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF, 1986) que estipula a concentração de 10^7 UFC/g para a contagem total das BAL como critério para determinação da vida útil de alimentos.

Como as BAL estão naturalmente adaptadas a produtos cárneos, a fase de adaptação (*lag*) da curva de crescimento microbiológico é curta, e em alguns casos não é observada. Em consequência, a fase exponencial e a fase estacionária são alcançadas rapidamente (HU et al., 2009). Quando o objetivo é evitar o desenvolvimento de micro-organismos indesejados, a extensão da fase de adaptação é a principal preocupação, especialmente para às bactérias ácido-lácticas que causam sabores indesejados, diminuição do pH, produção de gás, inchaço da embalagem, descoloração, coloração esverdeada e produção de limo superficial nos produtos (AUDENAERT et al., 2010). Neste sentido, a deterioração microbiana desempenha um papel significativo, levando a um impacto econômico e ambiental substancial.

2.5 A UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTIMICROBIANOS NATURAIS EM PRODUTOS CÁRNEOS

Nos últimos anos, a indústria de alimentos tem buscado técnicas alternativas para substituir os métodos tradicionais de controle de micro-organismos nos alimentos. Neste contexto, a crescente demanda de compostos naturais para desenvolver novos conservantes de alimentos contra micro-organismos deteriorantes e patogênicos está em expansão (EL ASBAHANI et al., 2015).

A segurança dos alimentos é uma das principais questões da indústria de alimentos e, além da deterioração dos produtos alimentares, sempre há preocupação com o surto de doenças transmitidas por alimentos (DTA) entre fabricantes de alimentos, agências reguladoras, pesquisadores e consumidores (KHORSHIDIAN et al., 2018).

Segundo Tisserand e Young (2012), a utilização de agentes químicos para a conservação de alimentos não é compatível com a imagem de produtos “frescos”. Além disso,

a adição de alguns produtos químicos, visando o aumento da segurança e da vida útil, pode levar à formação de compostos carcinogênicos ao organismo humano caso estes produtos químicos sejam ingeridos em alta quantidade durante longos períodos.

O uso de óleos essenciais (OE) como antimicrobianos naturais é uma técnica de preservação na indústria de alimentos, que está ganhando atenção nos últimos anos, principalmente impulsionado pela preocupação com a percepção negativa dos consumidores sobre conservantes químicos (SEOW et al., 2014).

Segundo Devlieghere et al. (2004), uma das vantagens do uso de OE em alimentos é a imagem de produto natural. No entanto, a eficiência de seu uso depende de diversos fatores, como difusão nas matrizes sólidas, solubilidade no meio aquoso, interação dos componentes do alimento (proteínas, carboidratos e lipídeos) e eficácia como agente antimicrobiano. Portanto, a produção de alimentos mais seguros é uma das prioridades mais importantes na indústria de alimentos e da presente pesquisa.

Os OEs são compostos aromáticos de origem natural, com atividades biológicas de amplo espectro (EL ASBAHANI et al., 2015). Até o momento, os OEs foram explorados como aditivos, aromatizantes, medicamentos e cosméticos (DIMA; DIMA, 2015). Além disso, eles foram utilizados como agentes inseticidas, antioxidantes, anti-inflamatórios, antialérgicos e anticancerígenos (SEOW et al., 2014). No entanto, muitos OEs exercem fortes atividades antibacterianas, antivirais e antifúngicas, estimulando sua aplicação também como antimicrobianos naturais em alimentos e bebidas (BURT, 2004).

Além de sua capacidade antimicrobiana, aproximadamente 60% da produção de óleos essenciais são utilizados nas indústrias de alimentos principalmente para aromatizar e temperar produtos alimentares, como carnes curadas, bebidas alcoólicas e refrigerantes, sorvetes e produtos de confeitaria, dentre outros (BORDAS; BERMEJO, 2012).

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

Estes compostos possuem grande poder antimicrobiano atuando como conservantes naturais contra a deterioração e inibição microbiológica de micro-organismos patogênicos e deteriorantes em produtos à base de carne. Porém, a aplicação de óleos essenciais é parcialmente limitada devido ao seu aroma intenso, o que pode alterar as propriedades sensoriais do produto. Entretanto, seu uso em combinação com tecnologias avançadas, como

certos tipos de embalagem, é uma das alternativas para melhorar a estabilidade microbiana e principalmente a qualidade sensorial do produto final (DONSÍ; FERRARI, 2016).

2.5.1 A composição dos óleos essenciais

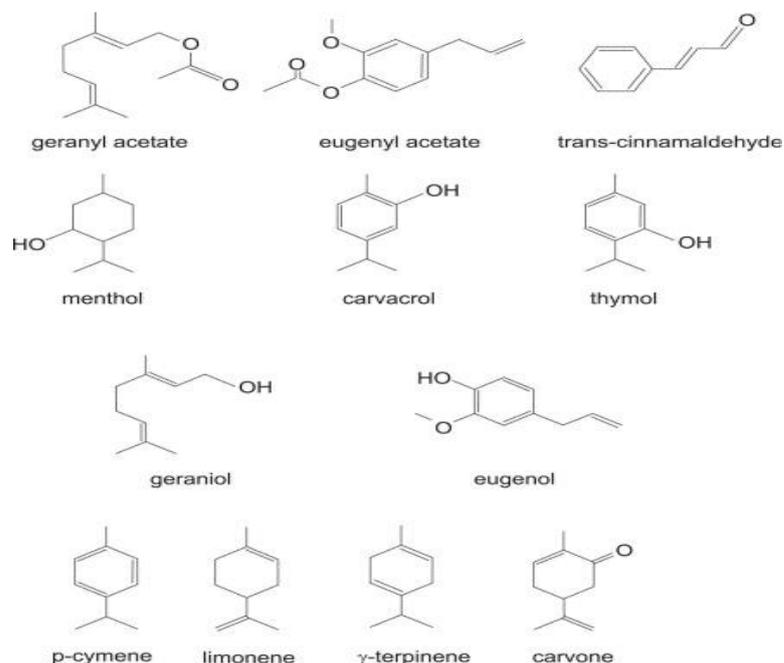
A Organização Internacional de Normalização (ISO DIS9235, 2013) definiu OE como o produto obtido a partir de uma matéria-prima natural de origem vegetal, por destilação a vapor. Este produto é gerado através de processos mecânicos do epicarpo de citrinos ou por destilação seca, após separação da fase aquosa. A destilação a vapor é o método mais utilizado para produzir OE.

Os OEs são considerados antimicrobianos naturais constituídos de misturas complexas de compostos não voláteis e voláteis. Estes compostos são usados desde tempos antigos para alterar o sabor, para a preservação de alimentos e como medicamentos e perfumaria obtidos a partir de materiais de plantas aromáticas e medicinais, incluindo flores, brotos, raízes, cascas, frutas e folhas (HYLDGAARD et al., 2012).

Além disso, os OEs são sintetizados pelas plantas, como metabólitos secundários, e são compostos bioativos com propriedades biológicas. Eles desempenham um papel na proteção de plantas contra herbívoros tornando-os desagradáveis na atração de polinizadores, infecções fúngicas, virais e bacterianas. O teor de OE do material vegetal pode variar de acordo com a estação do ano, zona climática, condições de crescimento e estresse (JAYASENA; JO, 2013; COOK; LANARAS, 2015).

Em geral, os OEs são lipofílicos e pouco solúveis em água. São compostos por diferentes componentes, tais como alcaloides, flavonoides, isoflavonas, monoterpenos, ácidos fenólicos, carotenoides e aldeídos. Além disso, são encontradas em cada OE misturas complexas de terpenos e terpenoides, as quais compõem o aroma característico de cada planta. O efeito conjunto de todos os constituintes presentes nele proporciona as características peculiares de cada OE (BAKKALI et al., 2008; SEOW et al., 2014). A Figura 2 apresenta as fórmulas estruturais de alguns compostos encontrados em óleos essenciais.

Figura 2 – Fórmulas estruturais de componentes selecionados de diferentes óleos essenciais.



Fonte: Burt, 2004.

Em relação à carne e aos produtos cárneos, os OEs de orégano, alecrim, tomilho, cravo, bálsamo, gengibre, basílica, coentro, manjerona e manjeriço possuem maior potencial para uso como agentes antimicrobianos (BARBOSA et al., 2015). Por possuírem grande atividade biológica, os óleos essenciais podem ser aplicados tanto no controle de bactérias deteriorantes quanto no controle de bactérias patogênicas (EL ASBAHANI et al., 2015).

2.5.2 Mecanismos de ação dos óleos essenciais

A atividade antimicrobiana dos OEs depende das características hidrofílicas e lipofílicas dos seus componentes, do tipo de micro-organismo e da estrutura da parede celular. Observa-se que os OEs são mais eficazes contra bactérias Gram-positivas em comparação com as Gram-negativas (HYLDGAARD et al., 2012). Isto ocorre porque a parede celular da bactéria Gram-positiva consiste em peptidoglicano (90-95%), juntamente com ácido teicoico e proteínas ligadas a ele. Como os componentes principais dos OEs são hidrofóbicos, os mesmos interagem com a membrana celular e assim passam facilmente através do citoplasma. A Figura 3 apresenta o mecanismo de atividade antimicrobiana dos OEs em bactérias Gram-positivas.

No que diz respeito à parede celular das bactérias Gram-negativas, trata-se de uma estrutura mais complexa, composta por uma monocamada de peptidoglicano, a qual é rodeada por uma membrana externa constituída por proteínas e lipopolissacarídeos. Este limite de célula externa é carregado e, portanto, tem uma natureza hidrofílica. No entanto, compostos hidrofóbicos podem passar por esta barreira (VAARA, 1992). Entretanto nem todos os estudos com OEs, mostram que as Gram-positivas são mais susceptíveis aos OEs, conforme Burt (2004). Deans e Ritchie (1987) testaram 50 OEs em 25 espécies de bactérias e não encontraram evidências de diferença significativa de sensibilidade entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Figura 3 – Mecanismo de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais nos micro-organismos Gram-positivos.



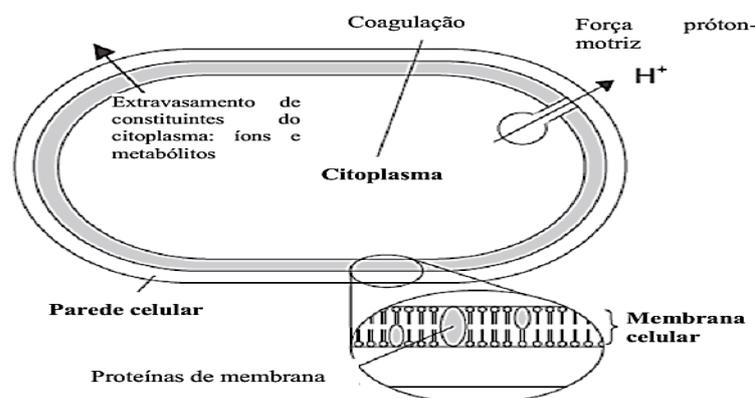
Fonte: Adaptado de Khorshidian et al., 2018.

A natureza lipofílica de hidrocarbonetos e a natureza hidrofílica dos grupos funcionais dos OEs desempenham papéis substanciais nos efeitos antimicrobianos desses compostos. A maior atividade antimicrobiana em um dado OE é encontrada com compostos fenólicos, seguindo em ordem por aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres e hidrocarbonetos (KALEMBA; KUNICKA, 2003). A atividade dos fenóis é atribuída à característica ácida do grupo hidroxila. Esses compostos alteram a permeabilidade celular, interferem nas enzimas envolvidas na produção de energia e interrompem a força motora da proteína que eventualmente ocasiona à morte celular. A forma das bactérias também pode ser determinante da atividade dos OE, tendo em vista que as células em forma de haste são mais suscetíveis

(NAZZARO et al., 2013).

Pouco se conhece sobre o mecanismo de resistência de micro-organismos contra estes compostos antimicrobianos naturais. Acredita-se que as células se protegem liberando compostos neutros, cátions anfipáticos ou ânions (BRUL; COOTE, 1999). No entanto, vários pesquisadores propuseram e reportaram que a ação antimicrobiana dos OE é atribuída à sua capacidade de penetrar através das membranas bacterianas no interior da célula e exibir atividade inibitória sobre as propriedades funcionais da célula e suas propriedades lipofílicas conforme mostra a Figura 4 (FISHER; PHILLIPS, 2009; GUINOISEAU et al., 2010; BAJPAI et al., 2012).

Figura 4 – Mecanismos de ação reportados para os óleos essenciais e seus componentes e sua localização na célula bacteriana.



Fonte: Adaptado de Burt, 2004.

2.6 ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*)

O orégano (*Origanum*) (Figura 5) é uma erva pertencente à família *Lamiaceae*, a qual possui uma grande diversidade de espécies. O gênero *Origanum* possui mais de 38 espécies destacando-se *Origanum majorana* e *Origanum vulgare* entre as mais importantes (DORMAN et al., 2003).

Figura 5 – Folhas do Orégano (*Origanum vulgare*).



Fonte: Adaptado de Dorman et al., 2003.

O óleo essencial de orégano (OEO), assim como outros OEs, é conhecido por possuir atividade antimicrobiana e está sendo utilizado como conservante natural para aumentar o prazo de validade de produtos alimentícios, principalmente quando aplicado em produtos cárneos (MCMILLIN, 2017). Por sua vez, o OEO é considerado um dos mais eficazes entre os OEs devido à sua ação antimicrobiana (AGUIRRE et al., 2013; EMIROĞLU et al., 2010).

Além da atividade antimicrobiana, os terpenos presentes no OEO possuem também importante atividade antioxidante (MILOS et al., 2000; ZHENG; WANG, 2001), pois são capazes de doar elétrons aos radicais livres reativos, tornando as mesmas moléculas mais estáveis ou não reativas (DORMAN et al., 2003).

A análise química do OEO revelou a presença de vários compostos, sendo que a maioria possui importantes propriedades antioxidantes e antimicrobianas (EXARCHOU et al., 2002; BOTSOGLOU et al., 2003; OZKAN et al., 2003). Dentre os diferentes compostos, carvacrol, γ -terpineno, p-cimeno e timol, são os principais constituindo entre 78 e 85% da composição do OEO. Além disso, outros constituintes menores, também contribuem para a atividade antibacteriana do OEO como representado na Figura 2 (KOKKINI et al., 1997).

A presença predominante de carvacrol no OEO na matriz alimentar faz diminuir a presença de íons de fosfato no interior da célula bacteriana, de forma que o carvacrol forma poros através da membrana celular permitindo assim que os íons deixem o citoplasma com a diminuição do potencial de membrana e conseqüentemente diminuição do gradiente de pH (BURT, 2004). Estudos demonstram que os OEs contendo carvacrol, timol e eugenol possuem maior atividade antimicrobiana que outros OEs que não possuem estes compostos (OUATTARA et al., 1997).

Segundo Viuda-Martos et al. (2010), o OEO tem aplicação promissora na indústria de alimentos, a fim de aumentar a vida útil de produtos cárneos. Muitos estudos utilizaram o OEO, como agente antimicrobiano contra a deterioração e os micro-organismos patogênicos

na carne e nos produtos à base de carne, conforme indica a Tabela 1.

Tabela 1 – Visão geral de estudos que avaliam a atividade antibacteriana de diferentes concentrações de óleo essencial de orégano em bactérias deteriorantes e patogênicas presentes em carne e produtos cárneos refrigerados.

Produto cárneo	Grupo bacteriano	Óleo essencial (%)	Redução log (UFC/g)	Referência	
Peito de frango	BAL	0,2	0,74	(PAVELKOVÁ et al., 2014)	
Carne bovina moída	BAL	1,5	0,79	(AMARIEI et al., 2016)	
Carne bovina moída	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,5	1,14	(BARBOSA et al., 2015)	
			<i>Salmonella spp.</i>		1,25
Presunto fatiado embalado a vácuo	BAL	0,4	3	(MENEZES et al., 2018)	
Linguiça frescal suína	<i>Escherichia coli</i>	0,015	0,87	(BUSATTA et al., 2008)	
		0,023	1,08		
		0,057	1,08		
Presunto embalado a vácuo	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,05	0,78	(DUSSAULT et al., 2014)	
Carne de ovelha moída	<i>Salmonella Enteritidis</i>	0,6	1,36	(GOVARIS et al., 2010)	
		0,9	3,45		
		2	0,27		
Carne Suína	<i>Listeria monocytogenes</i>	4	0,86	(PAPARELLA et al., 2016)	
		<i>Pseudomonas spp.</i>	2		0,51
		BAL	2		1,35
		4	0,93		

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

2.7 ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*)

A espécie *Rosmarinus officinalis*, comumente conhecida como alecrim, é uma planta culinária popular cultivada e utilizada em todo o mundo, incluindo o Brasil (HERRERA, 2005). O alecrim (Figura 6) é um arbusto denso, ramificado, de folha persistente e flor azul-esbranquiçada que pode atingir cerca de 1 metro de altura (AL-SEREITIA et al., 1999). Os principais produtores são a Itália, Dalmácia, Espanha, Grécia, Turquia, Egito, França, Portugal e África do Norte (ATTI-SANTOS et al., 2005). Suas principais atividades biológicas são o seu caráter antibacteriano (BOZIN et al., 2007; BAJALAN et al., 2017), anti-carcinogênico (CHEUNG; TAI, 2007; YESIL-CELIK TAS et al., 2010), anti-inflamatório e antioxidante (ESTÉVEZ et al., 2007). Normalmente, as partes do alecrim usadas para a

preparação de extratos e óleos essenciais são as principais partes aéreas de floração, incluindo folhas, galhos e inflorescências.

Figura 6 – Folhas de alecrim (*Rosmarinus officinalis*).



Fonte: Adaptado de Burt, 2004.

O óleo essencial de alecrim (OEA) é rico em α -pineno, 1,8-cineol e cânfora, associados a quantidades variáveis de outros compostos como o borneol e verbenona (OJEDA-SANA et al., 2013). Segundo Wang et al. (2012), os principais constituintes do óleo são 1,8-cineol (27,23%), α -pineno (19,43%), cânfora (14,26%), canfeno (11,52%) e β -pineno (6,71%) no OEA. Componentes menores podem ter uma influência potencial sobre a atividade biológica devido à possibilidade de efeito sinérgico entre seus componentes (HUSSAIN et al., 2010).

Muitos estudos utilizaram o OEA como agente antimicrobiano contra a deterioração e micro-organismos patogênicos na carne e nos produtos à base de carne, conforme apresenta a Tabela 2.

Tabela 2 – Visão geral de estudos que avaliam a atividade antibacteriana de diferentes concentrações de óleo essencial de alecrim em bactérias deteriorantes e patogênicas presentes em carne e produtos cárneos refrigerados.

Produto Cárneo	Grupo Bacteriano	Óleo essencial (%)	Redução log (UFC/g)	Referência
Carne de peru embalada a vácuo	<i>Pseudomonas spp.</i> Enterobactérias	0,25 0,25	1,87 0,78	(VASILATOS et al., 2013)
Carne bovina moída	BAL	0,5 1,5	0,58 0,25	(AMARIEI et al., 2016)
Carne picada	Enterobactérias	1	0,8	(VILELA et al., 2016)
Carne de frango pré-cozida embalada a vácuo	BAL	0,2	0,30	(NTZIMANI et al., 2010)
Peito de frango	BAL	2	1,7	(PETROVÁ et al., 2013)
Carne bovina moída	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	1	Inativação	(SELIM, 2011)
Linguiça frescal de carne suína	BAL	1	1,5	(GEORGANTELI et al., 2007)
Salsicha de fígado suíno	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	1,5	(PANDIT; SHELEF, 1999)
Carne de frango	<i>Salmonella Typhimurium</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Escherichia coli</i> O157:H7	2 2 2	Inativação Inativação 4,73	(MORSY et al., 2014)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

2.8 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A microbiologia preditiva é uma área de pesquisa da microbiologia de alimentos que tem recebido uma importância crescente como uma ferramenta para análise de risco e previsão da vida útil de alimentos. Na microbiologia preditiva, modelos matemáticos são desenvolvidos para estimar o crescimento ou a inativação de micro-organismos em alimentos. Seu uso aumentou significativamente devido à sua capacidade de prever com boa acurácia o crescimento microbiano em condições específicas (MAFART, 2005; MCMEEKIN et al., 2007; HUANG, 2014; LONGHI et al., 2013; TELEKEN et al., 2018). Os modelos matemáticos podem ser usados para descrever o comportamento de micro-organismos no processo de fabricação e distribuição de produtos alimentícios (ALAVI et al., 1999).

Após seu alto crescimento no início da década de 1990, um esforço considerável foi investido no desenvolvimento de modelos matemáticos para prever o crescimento microbiano

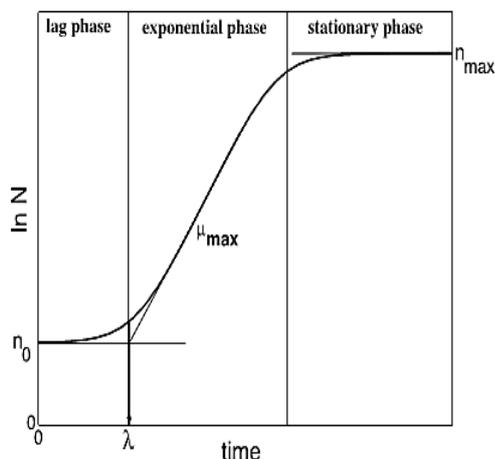
em condições ambientais não isotérmicas (PELEG; CORRADINI, 2011). Neste sentido, vários modelos têm sido empregados, como por exemplo, o modelo desenvolvido por Baranyi-Roberts (BAR) (BARANYI et al., 1995; BOVILL et al., 2000; XANTHIAKOS et al., 2006; LEE et al., 2007; JUNEJA et al., 2011; VELUGOTI et al., 2011), o modelo de Gompertz modificado (GOM) (VAN IMPE et al., 1992; ZWIETERING et al., 1994; HUANG, 2003), o modelo logístico modificado (KREYENSCHMIDT et al., 2010), o modelo de Huang (HUG) (HUANG, 2011) e o modelo de Robazza et al. (ROB) (ROBAZZA et al., 2017).

Modelos matemáticos para avaliar o crescimento microbiano podem ser classificados em modelos primários, que representam o crescimento dos micro-organismos ao longo do tempo para um conjunto de condições ambientais que permanecem constantes ao longo do tempo. Por sua vez, os modelos secundários descrevem a dependência de um ou mais parâmetros cinéticos do modelo primário com uma ou mais condições ambientais de cultura (tipicamente temperatura, pH ou atividade de água). Finalmente, os modelos terciários são obtidos combinando os modelos primários e secundários para prever a influência das condições ambientais no crescimento microbiano (WHITING; BUCHANAN, 1993; HUANG, 2014).

2.8.1 Curvas de crescimento microbiano

As curvas de crescimento microbiano em um ambiente estacionário (não varia com o tempo) apresentam um formato sigmoideal, conforme apresentado na Figura 7. Nesta situação, elas são divididas em fase de adaptação ou *lag*, na qual as células microbianas não se multiplicam e estão adaptando-se ao novo ambiente. Nesta fase, o parâmetro de interesse é a duração da fase *lag* (λ). Na fase exponencial, as células direcionam todo o seu metabolismo para a reprodução e o parâmetro mais relevante é a taxa máxima de crescimento específico (μ_{\max}). Finalmente, a fase estacionária é aquela na qual a população bacteriana máxima, $\log(N_{\max})$, é atingida (SWINNEN et al., 2004). Do ponto de vista da segurança alimentar, somente a fase de adaptação e a fase exponencial são relevantes, pois na fase estacionária, o alimento já não está propício para o consumo.

Figura 7 – Curva típica de crescimento microbiano em um ambiente estacionário.



Fonte: Swinnen et al., 2004.

No presente estudo, serão empregados três modelos primários da literatura: o modelo de Baranyi-Roberts (BARANYI e ROBERTS, 1994), o modelo de Huang (HUANG, 2013) e o modelo de Robazza et al. (ROBAZZA et al., 2017). Os três modelos têm uma fundamentação teórica biológica e são oriundos de três equações diferenciais e de hipóteses diferentes na sua fundamentação teórica.

2.8.2 Modelo de Baranyi-Roberts

De uma perspectiva histórica, os principais modelos utilizados na microbiologia preditiva são os modelos de Gompertz modificado e Baranyi-Roberts (BARANYI; ROBERTS, 1994; JUNEJA et al., 2007). Acredita-se que o modelo de Baranyi-Roberts ofereça melhor qualidade de ajuste do que a equação de Gompertz modificada (VAN IMPE et al., 2005). Também deve ser mencionado que o modelo de Gompertz modificado carece de uma base mecanicista e que o modelo de Baranyi-Roberts fornece uma interpretação biológica para a duração da fase *lag* e introduz um conceito de estado fisiológico das células definido pelo parâmetro h_0 que é definido como o produto da fase *lag* com a velocidade específica máxima de crescimento (BARANYI; ROBERTS, 1994).

Para Van Impe et al. (2005), o modelo de Baranyi-Roberts é muito utilizado na microbiologia preditiva pelas seguintes razões: é fácil de usar, aplicável a condições com variações dinâmicas no ambiente, tem uma boa capacidade de ajuste, a maioria dos parâmetros do modelo são biologicamente interpretáveis e o modelo se encontra já implementado em *softwares* de uso livre como o *ComBase Predictor e R*.

A Equação 1 descreve uma versão parametrizada do modelo de Baranyi-Roberts

(BAR) (BARANYI; ROBERTS, 1994).

$$\log N(t) = \log(N_{\max}) + \log \left[\left(\frac{-1 + e^{\mu_{\max}\lambda} + e^{\mu_{\max}t}}{-1 + e^{\mu_{\max}t} + e^{\mu_{\max}\lambda \cdot \frac{\log(N_{\max})}{\log(N_0)}}} \right) \right] \quad (1)$$

onde $N(t)$ é a concentração celular (UFC/g) no instante t (h), N_{\max} é a população bacteriana (UFC/g) final, N_0 corresponde à população bacteriana inicial (UFC/g), μ_{\max} corresponde à taxa máxima de crescimento específico (dias⁻¹) e λ é igual à duração da fase *lag* (dias).

2.8.3 Modelo de Huang

O modelo matemático de Huang (HUG), dado pelas Equações (2) e (3), foi elaborado com o intuito de fornecer uma descrição mais simples do crescimento bacteriano. Isto porque o modelo de Baranyi-Roberts inclui parâmetros de difícil mensuração como, por exemplo, o valor do estado fisiológico das células bacterianas (h_0). Neste caso, se torna difícil validar os resultados obtidos para h_0 e, na prática, trata-se de um parâmetro empírico (HUANG, 2013).

$$y(t) = y_0 + y_{\max} - \ln[e^{y_0} + (e^{y_{\max}} - e^{y_0})e^{-\mu_{\max}\beta(t)}] \quad (2)$$

$$\beta(t) = t + \frac{1}{4} \ln \frac{1 + e^{-4(t-\lambda)}}{1 + e^{4\lambda}} \quad (3)$$

onde $y(t)$ corresponde ao logaritmo natural da concentração celular (log UFC/g) no instante t (dias), y_{\max} é o logaritmo natural da população bacteriana (log UFC/g) final, y_0 corresponde ao logaritmo natural da população bacteriana inicial (log UFC/g) e $\beta(t)$ é a função de transição.

2.8.4 Modelo de Robazza et al.

O modelo de Robazza et al. (ROB), apresentado na Equação (4), possui duas características principais que são diferentes dos demais modelos primários utilizados no presente estudo. A primeira consiste no uso de um parâmetro diferente dos demais (é empregado um parâmetro para a abscissa do ponto de inflexão da curva de crescimento

bacteriano (t^*), e não é utilizado nenhum parâmetro para descrever o logaritmo da população máxima). A justificativa para este procedimento é que a população máxima depende da duração da fase de adaptação (*lag*), da população inicial e da taxa máxima de crescimento específico. Portanto, ela não deveria ser descrita por um parâmetro independente dos demais (ROBAZZA et al., 2017).

A segunda característica que diferencia o modelo de Robazza et al. é a definição da duração da fase de adaptação (*lag*). Segundo a definição clássica, que é utilizada nos modelos de Baranyi-Roberts e Huang, o valor de λ consiste no ponto de intersecção da reta horizontal que passa pelo logaritmo da população inicial e a reta correspondente à fase de crescimento exponencial. De acordo com o modelo de Robazza et al., a fase *lag* se encerra, quando a taxa de crescimento específico atinge uma fração pré-estabelecida (α) do seu valor máximo (ROBAZZA et al., 2017).

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} \sqrt{\frac{\pi}{8}} (\lambda - t^*) \left\{ \operatorname{erf} \left[\sqrt{2} \left(\frac{t^* - t}{t^* - \lambda} \right) \right] - \operatorname{erf} \left[\sqrt{2} \frac{t^*}{t^* - \lambda} \right] \right\} \quad (4)$$

É importante mencionar que a população máxima não é explicitamente incluída como parâmetro no modelo. Entretanto, ela pode ser estimada diretamente dos parâmetros como um valor assintótico conforme a Equação (5).

$$y_{\max} = y_0 + \mu_{\max} (\lambda - t^*) \sqrt{\frac{\pi}{2}} \quad (5)$$

onde $\operatorname{erf}(x)$ corresponde à função erro de Gauss definida pela expressão $\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x \exp(-w^2) dw$ (CHRISTOV, 1992).

3 OBJETIVOS

A seguir estão descritos os objetivos do presente estudo.

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da aplicação de diferentes concentrações de óleos essenciais de alecrim (OEA) e orégano (OEO) sobre parâmetros físico-químicos, microbiológicos e a vida útil de linguiça Toscana embalada a vácuo mantida sob condições de refrigeração a 4 °C, com base no crescimento da flora natural de bactérias ácido-láticas (BAL).

3.1.1 Objetivos específicos

- a) Verificar o efeito da adição de OEA sobre o crescimento das BAL no produto.
- b) Verificar o efeito da adição do OEO sobre o crescimento das BAL no produto.
- c) Avaliar o efeito da aplicação de OEA e OEO sobre os seguintes parâmetros físico-químicos da linguiça Toscana: pH, atividade de água, coloração (L^* , a^* , b^* , C^* e h°) durante o armazenamento á vácuo refrigerado.
- d) Comparar o desempenho de três diferentes modelos primários através de índices estatísticos para descrever o crescimento das BAL em linguiça Toscana.
- e) Estimar valores da vida útil em função de parâmetros cinéticos obtidos pelos modelos primários de crescimento para a linguiça Toscana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nessa seção estão descritos os materiais e métodos empregados para alcance dos objetivos.

4.1 OBTENÇÃO, EXTRAÇÃO E RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

No presente estudo, foram selecionados o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e o orégano (*Origanum vulgare*). A escolha destes componentes se deve tanto à ação conservante quanto ao menor impacto na aceitação da carne pelos consumidores porque estas ervas são comumente utilizadas como especiarias nesse tipo de produto. O alecrim e o orégano desidratados foram obtidos no comércio de Chapecó – SC. Os OEs foram obtidos através do método de destilação de arraste de vapor (CHEMAT; BOUTEKEDJIRET, 2015). O equipamento é constituído por uma fonte de calor, um balão de extração de 2 litros para criar vapor por água fervente, um recipiente de vidro esférico de 2 litros com entradas superior e inferior, um condensador de vidro reto e um coletor de vidro para separar e recuperar o OE. A amostra seca é colocada no balão esférico com entradas superior e inferior e a água no balão de extração. A água é então aquecida e o vapor produzido é forçado através do material vegetal, proporcionado pelo calor que provoca a evaporação dos componentes voláteis e o fluxo de calor arrasta o material para o condensador. Finalmente, o OE é condensado e recuperado no coletor. As destilações foram mantidas por um período de 2 horas. As amostras dos OEs foram então transferidas para um frasco âmbar com tampa de rosca e armazenada a 5 °C. Através da razão entre a massa final de OE extraído e a massa inicial de material utilizado obtém-se o rendimento dos OEs, que foram calculados através da Equação (6):

$$ROE (\%) = \left[\frac{OE (g)}{MS (g)} \right] \times 100 \quad (6)$$

onde *ROE* é o rendimento do óleo essencial, *OE* é a quantidade de óleo essencial extraída (g) e *MS* refere-se a massa da amostra vegetal seca (g).

4.2 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA GASOSA / ESPECTROMETRIA DE MASSA

As análises de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-MS) foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo a gás (CG) Agilent Technologies 7820A (Califórnia,

EUA), acoplado a um detector de massa seletiva (MSD) Agilent Technologies 5977E MSD (Califórnia, EUA), com sistema de ionização por impacto de elétrons modo (70 eV) na faixa m/z 35–400. A aquisição e o processamento de dados foram realizados pelo software Mass Hunter Agilent Technologies (Califórnia, EUA). A coluna utilizada foi a coluna capilar Agilent Technologies HP-5MS (5% fenil-metilpolissiloxano, J&W Scientific Inc) com vazão de 1 mL/min (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m) e volume de injeção de 1 μ L (8 mg/mL). A temperatura do forno era de 60 °C (1 min), com aquecimento a 3 °C/min até atingir 240 °C, em um tempo total de 60 min com a temperatura máxima da linha de transferência de 280 °C. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com uma vazão de injeção de 1 mL/min com a razão de divisão de 1:20 em modo *scan*. A identificação dos constituintes foi baseada nos seus índices de retenção e comparação dos fragmentos obtidos fornecidos pela biblioteca NIST14 (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, Gaithersburg, EUA). As análises foram executadas em triplicata para cada OE.

4.3 PREPARAÇÃO, EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO DA LINGUIÇA TOSCANA

Na Tabela 3, estão apresentadas as formulações de linguiças Toscanas que foram produzidas na planta piloto de carnes do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Tabela 3 – Ingredientes e aditivos utilizados nas formulações das linguiças Toscanas.

Ingredientes	Formulações									
	Controle %	Blend %	OEA				OEO			
			0,05%	0,1%	0,2%	0,4%	0,05%	0,1%	0,2%	0,4%
Pernil Suíno	72,00	71,50	71,45	71,40	71,30	71,10	71,45	71,40	71,30	71,10
Gordura Suína	21,00	21,00	21,00	21,00	21,00	21,00	21,00	21,00	21,00	21,00
Mix Toscana ¹	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Água	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Blend ²	-	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
OEA ³	-	-	0,05	0,10	0,20	0,40	-	-	-	-
OEO ⁴	-	-	-	-	-	-	0,05	0,10	0,20	0,40

Mix Toscana¹ (Conditec Aditivos e Condimentos©), cloreto de sódio (73,25%), açúcar (10%), especiarias naturais (10%) (alho, coentro e pimenta vermelha), tripolifosfato de sódio (2,5%), glutamato monossódico (1,8%), eritorbato de sódio (1,5%), nitrito de sódio (0,8%), e nitrato de sódio (0,15%).

Blend comercial de ácidos orgânicos² (Engenutri ©), lactato de sódio (57%), ácido láctico (37%), ácido cítrico (3%), ácido ascórbico (1%), ascorbato de sódio (1%), especiarias naturais (anis e cardamomo).

OEA³ óleo essencial de alecrim, OEO⁴ óleo essencial de orégano.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Óleos essenciais de especiaria, quando adicionados em concentrações adequadas (inferior a 0,2%), não trazem alterações significativas as propriedades sensoriais (cor, textura e sabor) da matriz alimentar em que são adicionados (REGLERO et al., 2008). Devido ao odor muito forte dos óleos essenciais de alecrim e orégano concentração acima de 0,4% não foram avaliadas sensorialmente, pois tornam seu consumo inviável.

O pernil suíno e a gordura suína refrigerados (2 °C) e desossados foram adquiridos no comercio local de Santa Maria/RS. O pernil e a gordura foram moídos utilizando-se um moedor de carne elétrico com placa de moagem de diâmetro (\emptyset), igual à aproximadamente 8 mm. A linguiça Toscana foi obtida misturando carne suína, gordura suína moída e os aditivos adicionados em um misturador de carne (IBRASMAK). Os ingredientes e aditivos foram misturados durante 5 minutos, até que a massa homogênea fosse obtida, a uma temperatura máxima de aproximadamente 7 °C. A massa resultante foi dividida em 10 lotes. Foram adicionadas separadamente, as concentrações de (0,05%, 0,1%, 0,2% e 0,4%) de OEA e OEO, mistura de ácidos orgânicos (*blend* comercial) e um lote foi utilizado como controle. Com o intuito de avaliar os efeitos separadamente, foi elaborada uma amostra controle sem o *blend* comercial e outra com o *blend* comercial. Todos os lotes foram embutidos em tripas naturais (intestino delgado de suíno, $\emptyset \approx 38$ a 42 mm). As linguiças foram embaladas (Nylon Poli) à vácuo, em equipamento (SELOVAC 200B) e armazenadas a 4 ± 1 °C, durante 60 dias.

4.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas das BAL foram realizadas após 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 20, 26, 32, 38, 44, 50 e 56 dias de armazenamento. Para as determinações das contagens microbiológicas das BAL, foram retiradas alíquotas de 25 g da amostra dos gomos de linguiça Toscana. Estas foram transferidas para embalagem plástica estéril de *Stomacher* e adicionadas de 225 mL de água peptonada 0,1% estéril e homogeneizadas em *Stomacher* (MARCONI MA 440/CF) por 2 minutos obtendo-se a diluição 10^{-1} . Diluições seriadas subsequentes foram preparadas com água peptonada 0,1% estéril, retirando-se 1 mL da diluição 10^{-1} e transferindo-se para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada até a diluição 10^{-6} . Para a contagem das BAL, utilizou-se o método de semeadura em placa (*pour plate*), com a adição de sobre camada com Ágar De Mann, Rogosa e Sharpe (MRS) (LIOFILCHEM, KASVI, Itália) para assim garantir a microaerófila adequada das BAL. As placas invertidas

foram incubadas a 37 °C durante 48 horas. Todo o procedimento foi realizado em bancada de fluxo laminar (PACHANE PCR-T4). A concentração de BAL foi expressa em (log UFC/g). As análises foram realizadas em duplicata.

4.5 ANÁLISE DE pH

As determinações do pH das linguiças Toscanas foram realizadas utilizando pHmetro (MPA-210 TECNOPON) com resolução de 0,01. Para as análises de pH, foram utilizados 10 g de amostra de linguiça Toscana homogeneizada em 100 mL de água destilada. O pHmetro foi calibrado antes das leituras usando soluções padrões (pH=4 e pH=7 a 20 °C). As medidas foram realizadas em triplicata. Os valores experimentais de pH foram ajustados através de uma adaptação do modelo de Robazza et al., Equação (7) (ROBAZZA et al., 2017).

$$pH(t) = pH_0 + pH_{max} \sqrt{\frac{\pi}{8}} (\lambda - t^*) \left\{ \operatorname{erf} \left[\sqrt{2} \left(\frac{t^* - t}{t^* - \lambda} \right) \right] - \operatorname{erf} \left[\sqrt{2} \frac{t^*}{t^* - \lambda} \right] \right\} \quad (7)$$

em que $pH(t)$ é o pH no instante t (dias) e pH_0 corresponde ao pH inicial da amostra, pH_{max} corresponde à taxa máxima de crescimento específico do pH, λ é igual à duração da fase *lag* e t^* corresponde à abscissa do ponto de inflexão.

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA (a_w)

A atividade de água foi determinada utilizando-se o aparelho Aqualab® Series 4TEV (Decagon Decive Inc. 2003) com resolução de 0,001 e realização da medida diretamente nas amostras. A a_w foi obtida através do equilíbrio entre a superfície da amostra e o ar. O sistema foi calibrado usando água destilada a 25 °C. A verificação da a_w foi realizada nos primeiros 14 dias a cada 48 horas. Em seguida, foram realizadas uma vez a cada 6 dias até completar os 56 dias. As análises foram determinadas em triplicata. Os valores de a_w foram ajustados através de uma relação linear conforme indica a Equação (8).

$$a_w(t) = at + b \quad (8)$$

em que $a_w(t)$ é a atividade de água no instante t em (dias), a e b são parâmetros empíricos.

4.7 ANÁLISE DE COR

Para a avaliação instrumental da cor das linguças Toscanas, as determinações foram realizadas através de espectrofotômetro (KONICA MINOLTA CM-700D, Osaka, Japão), com iluminante A, área de medição de 8 mm com SCI (ângulo difuso de iluminação/ângulo do sensor de 8°) e SCE (componente especular excluído) selecionável com comutação automática. As amostras de linguça Toscana foram preparadas com cortes cilíndricos 20 mm e a cor foi medida 2 vezes em três locais em cada amostra. Os atributos avaliados foram (iluminante A) e (iluminante D65) com ângulo de observação padrão de 2°, L^* (luminosidade), a^* (intensidade de vermelho) e b^* (intensidade do amarelo) (CIE, 1976). Obteve-se ainda o espectro visível entre os comprimentos de onda 360 e 740 nm, com intervalos de 10 nm entre eles. A partir desses dados, foram calculados os valores de ângulo de tonalidade (h°) Equação (9), índice de saturação chroma (C^*) Equação (10). As análises foram realizadas à temperatura ambiente. A calibração para branco e preto antes das medições foram realizadas. As análises de coloração foram realizadas a cada 7 dias, durante 49 dias.

$$h^\circ = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \quad (9)$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (10)$$

onde ângulo de tonalidade é o (h°), intensidade do amarelo b^* , intensidade de vermelho (a^*), índice de saturação (C^*).

Para modelar a cinética da mudança dos parâmetros de L^* , a^* , b^* , C^* e h° , foi utilizado um modelo cinético de primeira ordem Equação (11).

$$y(t) = y_0 e^{-kt} \quad (11)$$

onde $y(t)$ corresponde ao valor dos parâmetros de coloração (L^* , a^* , b^* , C^* e h°) após t dias de armazenamento, y_0 representa o valor inicial dos parâmetros de coloração e k é a constante de velocidade da reação.

4.8 MODELAGEM MATEMÁTICA

Os dados experimentais do crescimento de BAL foram expressos em log (UFC/g) para o procedimento de ajuste. Para cada tratamento, os modelos de Baranyi & Roberts (1994) (BAR) Equação (1), Huang (HUG) (HUANG, 2013) Equações (2 e 3) e Robazza et al. (ROB) (ROBAZZA et al., 2017) Equação (4), foram ajustados aos dados experimentais. Além dos parâmetros cinéticos que estão inseridos nas funções de crescimento, calculou-se a amplitude de crescimento logarítmico (A) Equação (12). A regressão não-linear foi realizada através do algoritmo de *Levenberg-Marquardt* com o uso dos pacotes *nlsMicrobio*, *minpack.lm*, *pracma*, *investr* e *modelr* disponíveis no *software R* v. 3.5.0.

$$\log N(t) = \log(N_{\max}) + \log \left[\left(\frac{-1 + e^{\mu_{\max}\lambda} + e^{\mu_{\max}t}}{-1 + e^{\mu_{\max}t} + e^{\mu_{\max}\lambda \cdot \frac{\log(N_{\max})}{\log(N_0)}}} \right) \right] \quad (1)$$

$$y(t) = y_0 + y_{\max} - \ln \{ e^{y_0} + [e^{y_{\max}} - e^{y_0}] e^{-\mu_{\max}\beta(t)} \} \quad (2)$$

$$\beta(t) = t + \frac{1}{4} \ln \frac{1 + e^{-4(t-\lambda)}}{1 + e^{4\lambda}} \quad (3)$$

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} \sqrt{\frac{\pi}{8}} (\lambda - t^*) \left\{ \operatorname{erf} \left[\sqrt{2} \left(\frac{t^* - t}{t^* - \lambda} \right) \right] - \operatorname{erf} \left[\sqrt{2} \frac{t^*}{t^* - \lambda} \right] \right\} \quad (4)$$

$$A = y_{\max} - y_0 \quad (12)$$

Os valores da vida útil das amostras de linguiça Toscana foram estimados utilizando-se dois critérios: como o tempo para a população de bactérias ácido-lácticas alcançar o nível de 7 log (UFC/g) e como o tempo para o pH alcançar o valor de 5,5, conforme será detalhado adiante. Para se modelar a influência da concentração de óleo essencial sobre a vida útil das amostras, uma versão modificada do modelo de Weibull (MAFART et al., 2002; VAN BOEKEL, 2002) foi ajustada aos dados da vida útil em função da concentração de óleo essencial como mostra a Equação (13):

$$t_{SL} = t_{SL0} + \left(\frac{[OE]}{\delta} \right)^{\beta} \quad (13)$$

onde t_{SL} é a vida útil da amostra em dias, t_{SL0} é o tempo de vida útil em dias da amostra de linguixa Toscana sem a adição de óleo essencial, $[OE]$ representa a concentração de óleo essencial empregada em cada tratamento, δ corresponde à concentração de óleo essencial necessária para aumentar a vida útil da amostra em um dia e β é um parâmetro de forma adimensional.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A capacidade dos modelos primários para ajustar os dados experimentais foi avaliada através dos seguintes índices estatísticos: coeficiente de determinação (R^2), raiz do erro quadrático médio ($RMSE$), erro médio absoluto (MAE), critério de informação de Akaike (AIC) (AKAIKE, 1974), critério de informação Bayesiano (BIC) (SCHWARZ, 1988), fator de tendência (*Bias factor*) (BF) e fator exatidão (*Accuracy fator*) (AF). Estes índices estão expressos nas Equações de (14 a 20). As análises estatísticas foram realizadas no *software R* v. 3.5.0.

$$R^2 = \sum_i \frac{(y_{\text{pred}} - \bar{y})^2}{(y_{\text{exp}} - \bar{y})^2} \quad (14)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (y_{\text{exp}} - y_{\text{pred}})^2}{n - p}} \quad (15)$$

$$MAE = \frac{1}{n} \sum |y_{\text{pred}} - y_{\text{exp}}| \quad (16)$$

$$AIC = -2 \log(Lp) + 2[(p + 1) + 1] \quad (17)$$

$$BIC = -2 \log(Lp) + [(p + 1) + 1] \log(n) \quad (18)$$

$$BF = 10^{\left(\frac{\sum \log(y_{\text{pred}}/y_{\text{exp}})}{n}\right)} \quad (19)$$

$$AF = 10^{\left(\frac{\sum |\log(y_{\text{pred}}/y_{\text{exp}})|}{n}\right)} \quad (20)$$

onde n é o número de pontos experimentais, p é o número de parâmetros do modelo, y são os valores da variável de resposta, \bar{y} representa a média aritmética de todos os valores de y , y_{exp} são os valores obtidos nos experimentos, y_{pred} são os valores preditos pelo modelo, Lp é o logaritmo do máximo da função de verossimilhança do modelo.

O fator Bias (BF) ou fator tendência é uma estimativa para avaliar a diferença média entre os valores observados e preditos pelo modelo. O fator Bias igual a 1 significa que o valor observado é exatamente igual ao predito, já quando o fator Bias é maior que 1 o valor predito, na média, é maior que o observado, porém quando o fator de bias é menor que 1, significa que o valor predito é menor que o observado na média (ROSS, 1996).

O fator exatidão (AF), é a medida da diferença média absoluta entre os valores preditos e observados do modelo, por se tratar de valores absolutos é sempre maior ou igual a 1, sendo que quanto maior o seu valor, menos precisa a estimativa (ROSS, 1996).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na sequência estão apresentados e discutidos os resultados obtidos na presente pesquisa.

5.1 RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O rendimento final dos OEs obtidos pelo método de extração por arraste de vapor, foram iguais a $1,669 \pm 0,024\%$ (m/m) para o OEA e $1,210 \pm 0,054\%$ (m/m) para o OEO. Os resultados encontrados estão de acordos com Chemat e Boutekedjiret et al. (2015) e Ribeiro-Santos et al. (2015) que relataram um rendimento igual à 1,20% (m/m) para o OEA e Khan et al. (2018) que obtiveram um rendimento para o OEO de 1,70%, em ambos os métodos de extração por arraste de vapor. Estudos sobre rendimento de OEs de variedades de orégano e alecrim demonstraram que o rendimento de OEs pode variar ao longo de diferentes safras (MECHERGUI et al., 2016; REZA et al., 2018).

5.2 COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A composição dos OEs de alecrim e orégano foi determinada por GC-MS e os resultados estão apresentados na Tabela 4. Os principais componentes encontrados no OEA foram 1,8-cineol (33,9%), cânfora (17,6%), α -pineno (15,4%), borneol (6,9%) e canfeno (5,4%). Estes resultados estão de acordo com os componentes obtidos por Sirocchi et al. (2013) e Jiang et al. (2011) que relataram a seguinte composição para o OEA: 1,8-cineol (36,2-26,5%), α -pineno (16,4-20,14%), cânfora (11,7-12,88%), canfeno (4,7-11,38%) e β -pineno (2,2-6,95%), respectivamente.

Os principais componentes observados para o OEO foram γ -terpineno (46,33%), terpinoleno (21,15%), p-cimeno (15,72%), β -cariofileno (7,74%). Esses resultados são coerentes com os obtidos por Kulisic et al. (2004) em óleo essencial de orégano, os quais foram: γ -terpineno (35,0%), carvacrol (32,0%), p-cimeno (9,1%) e α -terpineno (3,6%) e por Bendahou et al. (2008), os quais relataram as concentrações de γ -terpineno (27,0%) e p-cimeno (17,15%). Além disso, Burt (2004) relatou que as concentrações de γ -terpineno em orégano (*Origanum vulgare*) podem variar significativamente, podendo ser encontrados desde 1% até 52%.

No total, foram identificados 40 componentes no OEA e 52 componentes no OEO referentes à fração volátil dos óleos. Estudos fitoquímicos sobre a composição do OE de

Origanum vulgare e *Rosmarinus officinalis* apontam uma ampla diversidade química e uma considerável variação qualitativa e quantitativa intraespecífica em constituintes. Essa variabilidade pode estar relacionada ao efeito de variáveis como fatores genéticos, distribuição geográfica, parte da planta estudada, tempo de coleta, métodos de extração e condições ambientais (JIANG et al., 2011; LUKAS et al., 2015; MECHERGUI et al., 2016; SIRROCCHI et al., 2017; REZA et al., 2018).

Tabela 4 – Composição química observada nos óleos essenciais de alecrim e orégano determinados por CG-MS.

Composto	T_R^1 (min)	Porcentagem (%)	
		OEA	OEO
hex-(2E)-enal	3,75	-	0,26
α -pineno	5,38	15,37	3,81
canfeno	5,75	5,36	0,44
β -pineno	6,48	4,95	1,96
p-cimeno	7,90	1,66	15,72
limoneno	8,03	1,69	-
1,8-cineol	8,18	33,89	0,29
γ -terpineno	9,04	0,61	46,33
terpinoleno	10,10	1,99	21,15
linalol	10,52	1,09	-
cânfora	12,27	17,59	-
borneol	13,1	6,94	2,32
α -terpinol	14,14	4,03	-
β -cariofileno	23,57	4,83	7,74

Tempo de retenção (T_R)¹.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018

5.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E MODELAGEM MATEMÁTICA

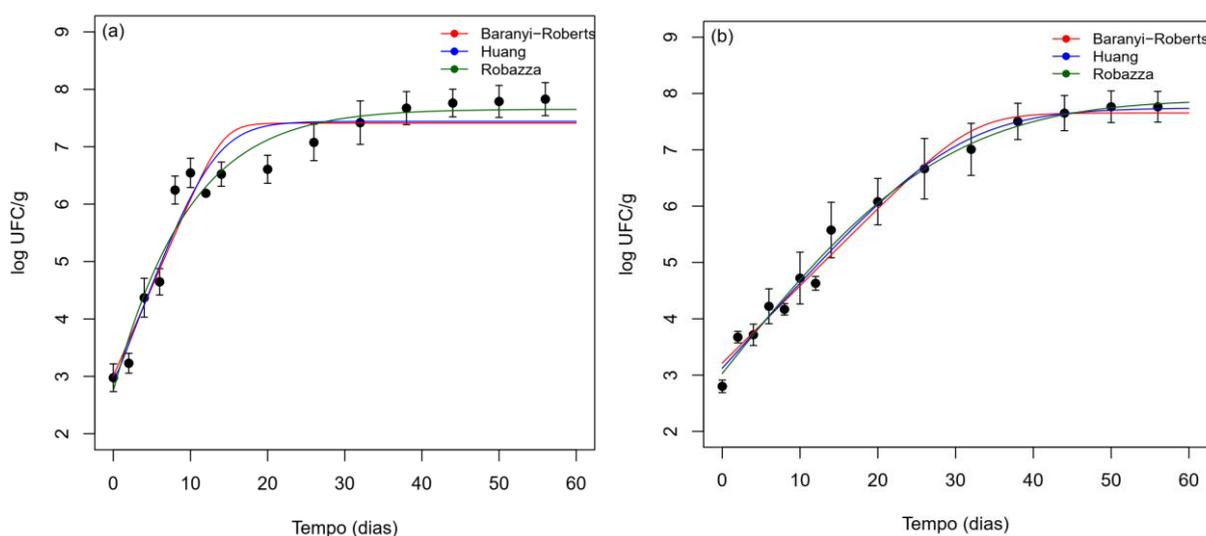
5.3.1 Ajustes primários de crescimento

As curvas de crescimento das BAL obtidas para cada ajuste com os modelos de BAR, HUG e ROB estão apresentadas nas Figuras 8, para a amostra controle (a) e adicionada do *blend* comercial de ácidos orgânicos (b). Por sua vez, a Figura 9 apresenta as curvas para os tratamentos adicionados de diferentes concentrações de 0,05% (a), 0,1% (b), 0,2% (c) e 0,4% (d) de OEA e a Figura 10 para linguças adicionadas das concentrações de 0,05% (a), 0,1% (b), 0,2% (c) e 0,4% de OEO.

As BAL consistem em uma parte substancial da microbiota natural de produtos cárneos. No entanto, quando presentes em concentrações superiores a 7 log (UFC/g), essas

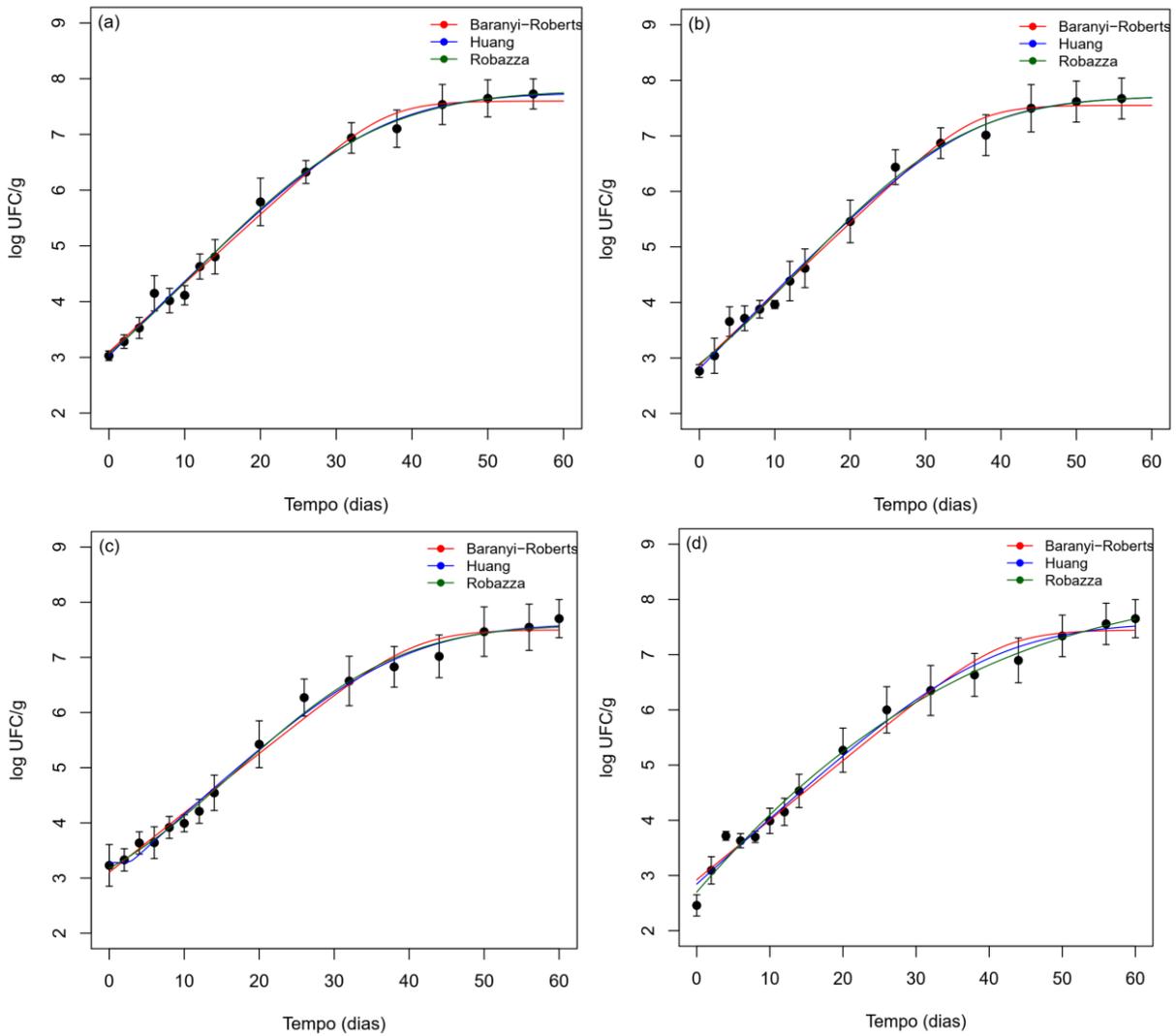
bactérias causam alterações sensoriais, como a formação de limo e sabores desagradáveis, que tornam o consumo do produto inadequado (LABADIE, 1999). Portanto, uma concentração de BAL de 7 log (UFC/g) foi estabelecida como um limite microbiológico superior para a qualidade sensorial e microbiológica dos alimentos, de acordo com a Comissão Internacional sobre Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 1986). Assim, conforme previamente mencionado, o tempo (em dias) para a concentração de BAL atingir este limite foi adotado no presente estudo como a vida útil da linguiça Toscana. Após o ajuste dos modelos de crescimento BAR, HUG e ROB aos dados BAL, o prazo de validade da linguiça Toscana foi estimado a partir dos parâmetros obtidos para cada modelo.

Figura 8 – Curvas obtidas após o ajuste dos modelos de Baranyi-Roberts (vermelho), Huang (azul) e Robazza et al. (verde) para a amostra controle (a) e o *blend* comercial de ácidos orgânicos (b) em linguiça Toscana armazenada a 4 °C e embalada a vácuo.



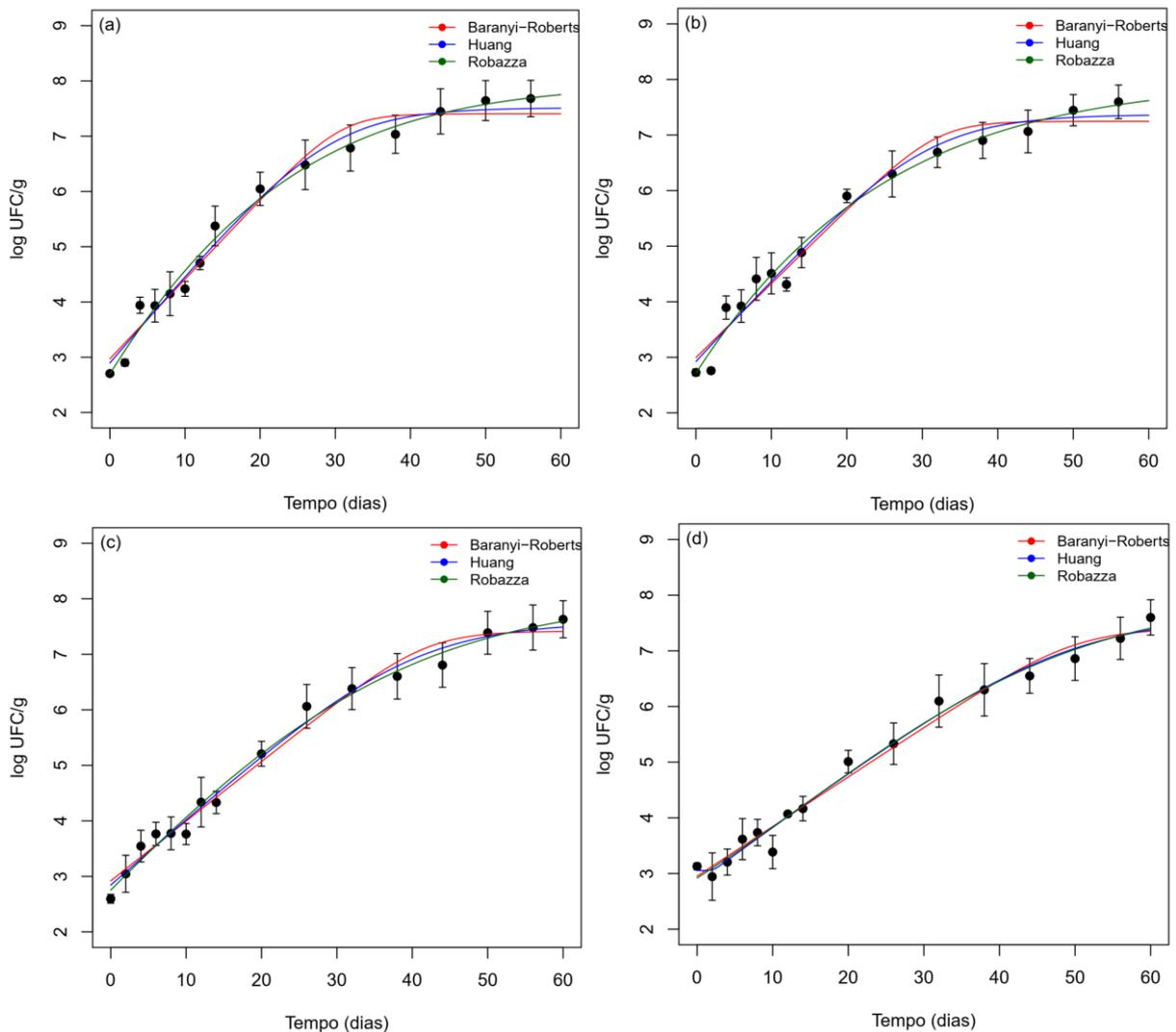
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Figura 9 – Curvas obtidas após o ajuste dos modelos de Baranyi-Roberts (vermelho), Huang (azul) e Robazza et al. (verde) para amostras adicionadas com diferentes concentrações 0,05% (a), 0,1% (b), 0,2% (c) e 0,4% (d) de OEA em linguiça Toscana armazenada a 4 °C e embalada a vácuo.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Figura 10 – Curvas obtidas após o ajuste dos modelos de Baranyi-Roberts (vermelho), Huang (azul) e Robazza et al. (verde) para amostras adicionadas com diferentes concentrações 0,05% (a), 0,1% (b), 0,2% (c) e 0,4% (d) de OEO em linguiça Toscana armazenada a 4 °C e embalada a vácuo.



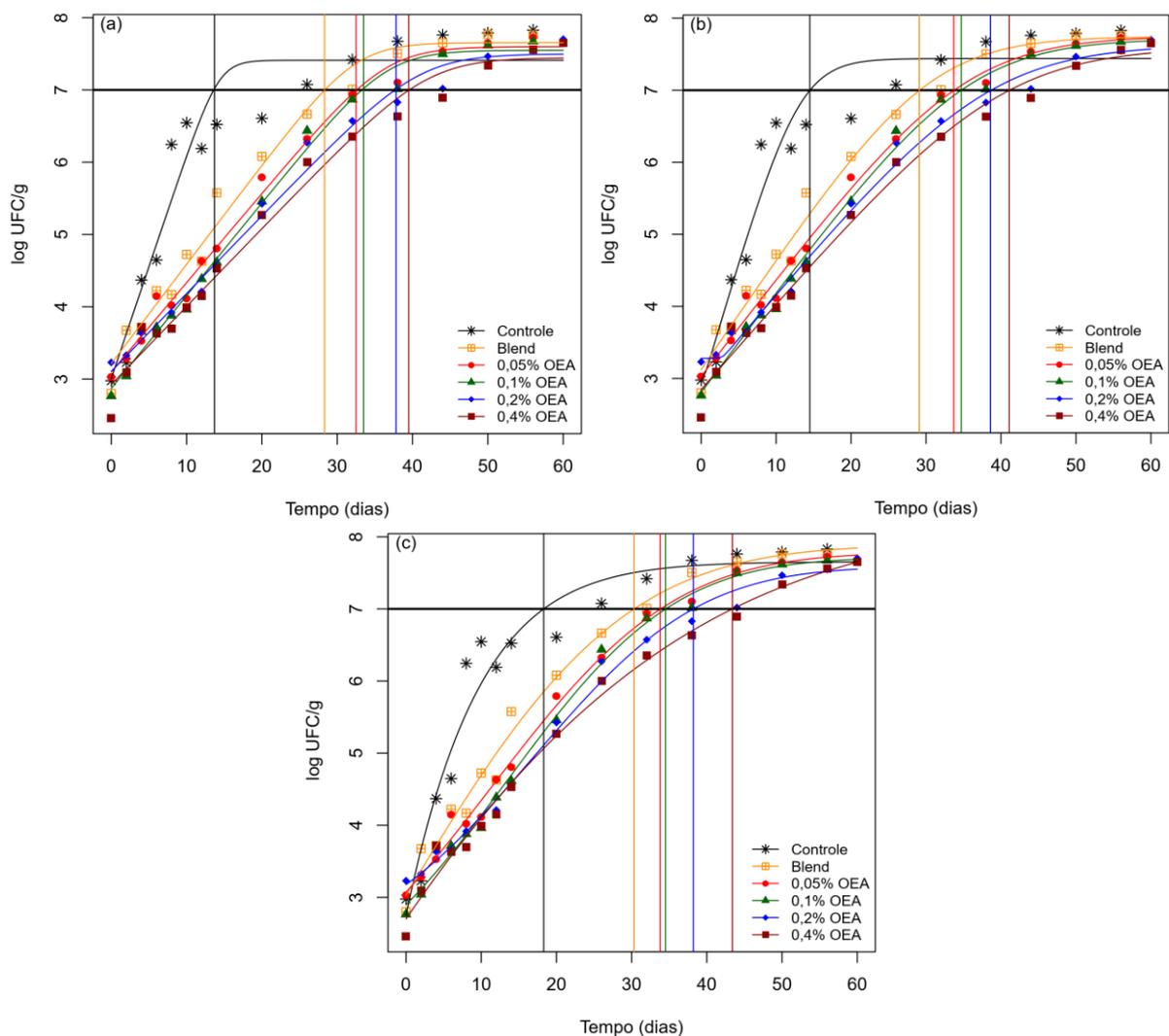
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

As Figuras 11 e 12, mostram os cálculos usados para a estimativa da vida útil das amostras de linguiça Toscana após adição de OEA e OEO, respectivamente. As duas figuras apresentam os cálculos para os modelos de BAR (a), HUG (b) e ROB (c). A densidade populacional inicial das BAL para os diferentes tratamentos variou entre 2,46 e 3,23 log UFC/g. Essas diferenças na flora bacteriana nativa são frequentes em produtos cárneos (PAPARELLA et al., 2016).

Como pode ser visto nas Figuras 11 e 12, todos os tratamentos prolongaram a vida útil

da linguiça Toscana significativamente ($p < 0,05$), em relação ao controle. Pode-se observar também que quanto maior a concentração de OEA e OEO adicionada ao produto, maior a extensão do prazo de validade. Os resultados indicaram que quando comparados o OEA entre o OEO, o prazo de validade estimado com a adição de OEA foi maior em relação ao OEO quando menores concentrações de OE (0,05% e 0,1%) foram adicionadas à linguiça Toscana. Por outro lado, quando maiores concentrações de (0,2% e 0,4%) de OE foram adicionadas à linguiça a vida de prateleira obtida para o OEO foi maior em relação ao OEA.

Figura 11 – Procedimentos de cálculo da vida útil para cada tratamento com OEA para os modelos de BAR (a), HUG (b) e ROB (c). As linhas sólidas verticais (coloridas) correspondem à vida útil prevista para cada tratamento e a linha sólida horizontal (preta) define a contagem de BAL estabelecida como limite.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

É possível observar a partir das Figuras (11 e 12), que a vida útil estimada para a

amostra controle foi igual a 13,59, 14,52 e 18,31 dias para os modelos de BAR, HUG e ROB, respectivamente. Após este período, a adição de 0,4 % de OEA e 0,4 % de OEO resultaram em uma diferença de aproximadamente 3 log UFC/g em relação a controle. Observou-se que a adição de OE não afeta a população bacteriana final, mas diminui a sua velocidade de crescimento.

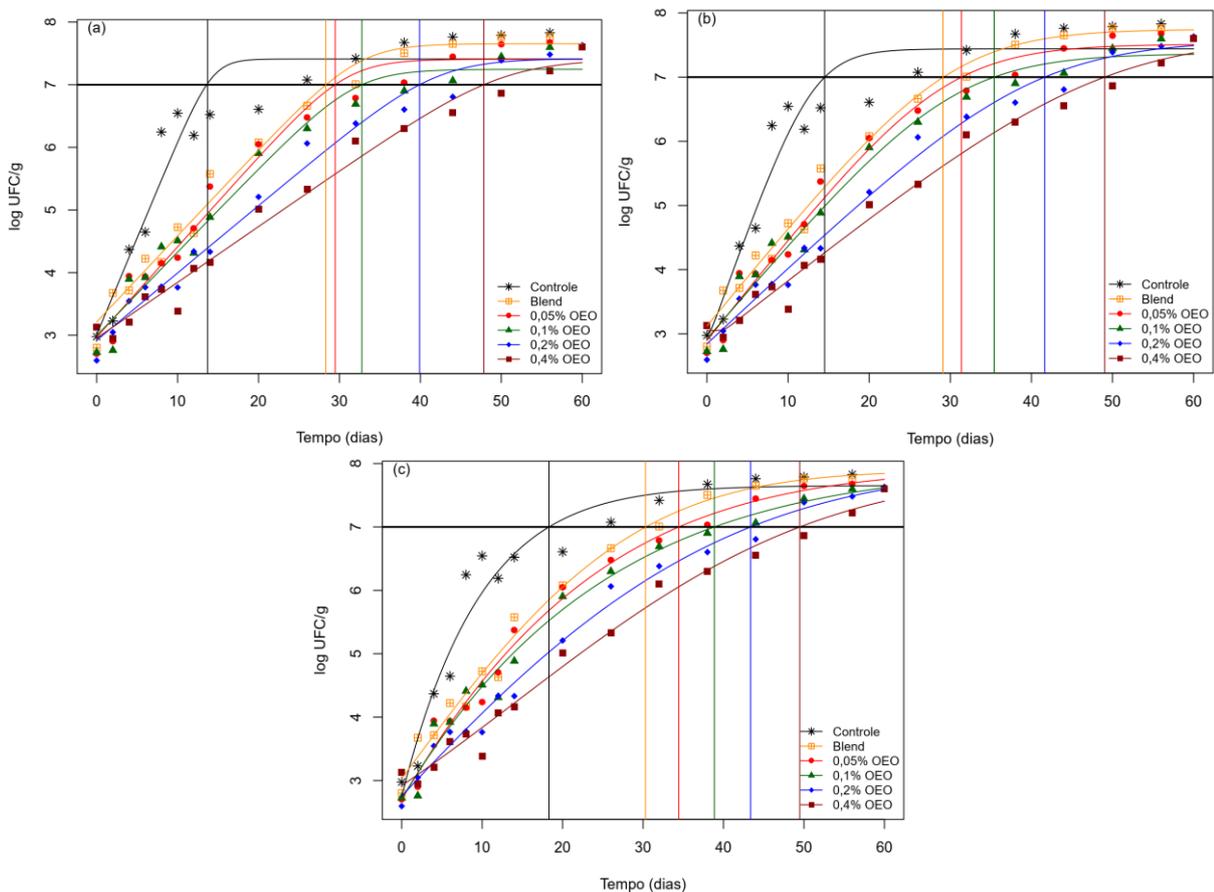
De acordo como Burt (2004), a atividade antimicrobiana do OEO está relacionada aos hidrocarbonetos monoterpênicos (γ -terpineno e p-cimeno). Portanto, os resultados obtidos no presente estudo comprovam a atividade antimicrobiana das diferentes concentrações de OEO adicionadas na linguiça Toscana na extensão de sua vida útil (TSIGARIDA et al., 2000; SKANDAMIS; NYCHAS, 2001). Por outro lado, a atividade antimicrobiana do OEA está relacionada aos derivados terpênicos (p-cimeno, terpineno, limoneno, sabineno e pineno) (REALINI; MARCOS, 2014), também presentes no óleo essencial estudado.

De fato, o caráter lipofílico desses compostos presentes no OEA e OEO (Tabela 2) provoca o rompimento da membrana celular atingindo assim o citoplasma bacteriano e comprometendo as funções vitais da célula resultando assim em reduções significativas das BAL. Além disso, a presença de grupos hidroxila como na estrutura do borneol dos OE (Tabela 4), pode produzir uma toxicidade para as bactérias levando assim a reduções significativas nas contagens como foi observado para os diferentes tratamentos, em relação à amostra controle (ULTEE et al., 2002; SIROCCHI et al., 2017).

Considera-se que os ácidos orgânicos afetam a atividade bacteriana por mecanismos primários de acidificação citoplasmática com subsequente desacoplamento da produção e regulação de energia e pela acumulação dos ânions dissociados (GOULD, 1989). A análise frente à adição do *blend* comercial de ácidos orgânicos mostra que a vida útil para este tratamento foi superior em relação à amostra controle. No entanto, a vida útil para este tratamento foi inferior em relação a todos os tratamentos que apresentaram também diferentes concentrações de OEA e OEO adicionados a linguiça Toscana conforme pode ser visto nas Figuras 11 e 12. Em seus estudos, Diez et al. (2009) e Neill et al. (2018) estudaram os efeitos de combinações de sais e ácidos orgânicos sobre a vida de prateleira de salsichas espanholas e presunto cozido, respectivamente. Os resultados mostraram que a combinação de ácidos orgânicos reduziu a população de bactérias deteriorantes aumentando consideravelmente a vida de prateleira dos produtos. De forma similar, no presente estudo que a adição do *blend* comercial aumentou a vida útil de aproximadamente 14,76 dias em relação à amostra controle.

Uma análise dos gráficos das Figuras 11 e 12, mostra a ausência da fase de adaptação ou *lag* bem definida para todos os tratamentos. Como as BAL faziam parte da microflora natural das linguiças Toscanas, é provável que as bactérias já estivessem previamente adaptadas ao ambiente quando o estudo foi realizado. Além disso, o aumento logarítmico bacteriano dado pela diferença entre a carga bacteriana final e inicial (parâmetro *A*) não foi afetado significativamente ($p < 0,05$), pelos diferentes tratamentos em relação à amostra controle. Resultados semelhantes foram encontrados por Cayré, Garro e Vignolo (2005) e Geitenes et al. (2013), que avaliaram o efeito de diferentes temperaturas de armazenamento no crescimento das BAL em embutidos cárneos embalados em diferentes permeabilidades ao oxigênio. Os autores verificaram a ausência da fase *lag* nas curvas de crescimento ajustadas pelo modelo de Gompertz modificado.

Figura 12 – Procedimentos de cálculo da vida útil para cada tratamento com OEO para os modelos de BAR (a), HUG (b) e ROB (c). As linhas sólidas verticais (coloridas) correspondem à vida útil prevista para cada tratamento e a linha sólida horizontal (preta) define a contagem de BAL estabelecida como limite.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Os estudos de Viuda-Martos et al. (2010) mostraram que a adição de OEA e OEO em linguiça frescal tipo Bolonha embalada a vácuo e mantida sob condições de refrigeração a 4 °C resultou em menores contagens de BAL durante um período de armazenamento de 24 dias. Além disso, como no presente estudo, constatou-se que a aplicação de OEO e OEA em carne e produtos cárneos é eficaz para retardar o crescimento da microflora deteriorante das BAL (NTZIMANI et al., 2010; GOVARIS et al., 2010; VASILATOS; SAVVAIDIS, 2013; AMARIEI et al., 2016; BARBOSA et al., 2015; PAPARELLA et al., 2016; MENEZES et al., 2018).

A Tabela 5 apresenta os parâmetros cinéticos de crescimento das BAL estimados pelos modelos de Baranyi-Roberts, Huang e Robazza et al. para todos os tratamentos.

Em geral, um melhor ajuste foi obtido quando o OEA foi adicionado à linguiça em relação aos demais tratamentos. A adição de diferentes concentrações de OEA, OEO e *blend* comercial afetaram significativamente ($p < 0,05$) os parâmetros μ_{\max} e y_{\max} . A taxa de crescimento específico máxima, μ_{\max} estimada para a amostra não tratada foi de 0,713, 0,356 e 203,7 dias⁻¹ para os modelos de BAR, HUG e ROB, respectivamente. Para a amostra adicionada de *blend* comercial de ácidos orgânicos, os valores de μ_{\max} obtidos para os modelos de BAR, HUG e ROB foram de 0,316, 0,155 e 0,400 dias⁻¹, respectivamente. Os resultados de μ_{\max} obtidos para as amostras tratadas com 0,05%, 0,1%, 0,2% e 0,4% de OEA para o modelo de BAR foram de 0,285, 0,296, 0,248 e 0,248 dias⁻¹, para o modelo de HUG iguais a 0,136, 0,140, 0,125, 0,120 dias⁻¹ e para o modelo de ROB de 0,312, 0,324, 0,279 e 0,496 dias⁻¹, respectivamente. Por outro lado, os valores de μ_{\max} obtidos para as amostras tratadas com 0,05%, 0,1%, 0,2% e 0,4% de OEO para o modelo de BAR foram de 0,332, 0,307, 0,248 e 0,205 dias⁻¹, para o modelo de HUG foram de 0,159, 0,148, 0,119 e 0,099 dias⁻¹ e para o modelo de ROB forma de 1,111, 13,980, 0,320 e 0,220 dias⁻¹, respectivamente. Resultados semelhantes ao do presente estudo, foram encontrados por Menezes et al. (2018), que adicionaram OEO em presunto embalado a vácuo e armazenado à 6 °C e obtiveram valores de μ_{\max} para a amostra controle e adicionada de 0,4% OEO de 0,79 e 0,65 dias⁻¹ pelo modelo de BAR para o crescimento de BAL, respectivamente.

Tabela 5 – Parâmetros cinéticos de crescimento das BAL estimados pelos modelos de Baranyi-Roberts (BAR), Huang (HUG) e Robazza et al. (ROB) (\pm intervalo de confiança de 95%).

Tratamentos	Modelo	μ_{\max} (dias ⁻¹)	Y_0 (log UFC/g)	Y_{\max} (log UFC/g)	A (UFC/g)
Controle	BAR	0,713 (\pm 0,224)	3,006 (\pm 0,707)	7,411 (\pm 0,394)	4,404
	HUG	0,356 (\pm 0,143)	2,980 (\pm 1,010)	7,440 (\pm 0,389)	4,464
	ROB	203,7 (\pm 18570,2)	2,749 (\pm 0,767)	-	-
<i>Blend</i> ¹	BAR	0,316 (\pm 0,047)	3,212 (\pm 0,267)	7,654 (\pm 0,271)	4,442
	HUA	0,155 (\pm 0,025)	3,122 (\pm 0,289)	7,746 (\pm 0,284)	4,624
	ROB	0,400 (\pm 0,222)	3,028 (\pm 0,343)	-	-
0,05% OEA ²	BAR	0,285 (\pm 0,027)	3,097 (\pm 0,174)	7,599 (\pm 0,206)	4,503
	HUG	0,136 (\pm 0,015)	3,029 (\pm 0,322)	7,752 (\pm 0,238)	4,723
	ROB	0,312 (\pm 0,031)	3,072 (\pm 0,229)	-	-
0,1% OEA ²	BAR	0,296 (\pm 0,027)	2,869 (\pm 0,176)	7,550 (\pm 0,209)	4,681
	HUG	0,140 (\pm 0,014)	2,805 (\pm 0,176)	7,715 (\pm 0,250)	4,910
	ROB	0,324 (\pm 0,034)	2,897 (\pm 0,240)	-	-
0,2% OEA ²	BAR	0,248 (\pm 0,027)	3,105 (\pm 0,236)	7,550 (\pm 0,236)	4,395
	HUG	0,125 (\pm 0,016)	3,278 (\pm 0,254)	7,629 (\pm 0,253)	4,351
	ROB	0,279 (\pm 0,032)	3,176 (\pm 0,224)	-	-
0,4% OEA ²	BAR	0,248 (\pm 0,032)	2,924 (\pm 0,240)	7,447 (\pm 0,303)	4,523
	HUG	0,120 (\pm 0,017)	2,844 (\pm 0,247)	7,598 (\pm 0,339)	4,754
	ROB	0,496 (\pm 1,789)	2,700 (\pm 0,290)	-	-
0,05% OEO ³	BAR	0,332 (\pm 0,061)	2,971 (\pm 0,333)	7,405 (\pm 0,317)	4,434
	HUG	0,159 (\pm 0,029)	2,896 (\pm 0,328)	7,513 (\pm 0,320)	4,617
	ROB	1,111 (\pm 7,612)	2,697 (\pm 0,360)	-	-
0,1% OEO ³	BAR	0,307 (\pm 0,062)	2,995 (\pm 0,345)	7,246 (\pm 0,345)	4,251
	HUG	0,148 (\pm 0,031)	2,924 (\pm 0,359)	7,366 (\pm 0,384)	4,442
	ROB	13,980 (\pm 899,096)	2,713 (\pm 0,416)	-	-
0,2% OEO ³	BAR	0,248 (\pm 0,032)	2,919 (\pm 0,235)	7,415 (\pm 0,297)	4,496
	HUG	0,119 (\pm 0,016)	2,843 (\pm 0,220)	7,574 (\pm 0,342)	4,731
	ROB	0,320 (\pm 0,260)	2,753 (\pm 0,298)	-	-
0,4% OEO ³	BAR	0,205 (\pm 0,025)	2,952 (\pm 0,215)	7,405 (\pm 0,416)	4,445
	HUG	0,099 (\pm 0,016)	3,053 (\pm 0,373)	7,641 (\pm 0,554)	4,588
	ROB	0,220 (\pm 0,032)	2,920 (\pm 0,308)	-	-

Blend comercial de ácidos orgânicos¹, Óleo essencial de alecrim², Óleo essencial de orégano³.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

A análise global dos valores de μ_{\max} indica que as BAL cresceram mais lentamente quando menores concentrações de OEA foram adicionadas à linguiça Toscana em relação ao OEO. A mesma análise mostra que seu crescimento foi mais lento quando doses mais altas de OEO foram adicionadas à linguiça Toscana em relação ao OEA, levando a uma maior extensão da vida de prateleira com as adições das maiores concentrações.

Os valores dos índices estatísticos obtidos após ajuste dos modelos de Baranyi-Roberts, Huang e Robazza et al. aos dados experimentais para cada tratamento estão

apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Comparação dos parâmetros de estatísticos obtidos após ajustes dos modelos de Baranyi-Roberts (BAR), Huang (HUG) e Robazza et al. (ROB) aos dados experimentais.

Tratamentos	Índices estatísticos							
	Modelo	AIC	BIC	AF	BF	RMSE	MAE	R ²
Controle	BAR	25,317	28,149	1,376	1,022	0,431	0,370	0,913
	HUG	24,542	28,083	1,337	1,019	0,393	0,338	0,922
	ROB	19,795	23,335	1,299	1,008	0,335	0,269	0,953
<i>Blend</i> ¹	BAR	4,261	7,093	1,218	1,014	0,214	0,174	0,978
	HUG	1,671	5,212	1,183	1,009	0,183	0,140	0,984
	ROB	0,202	3,742	1,116	1,005	0,175	0,128	0,989
0,05% OEA ²	BAR	-7,334	-4,502	1,124	1,005	0,145	0,107	0,989
	HUG	-9,778	-6,238	1,097	1,002	0,125	0,084	0,994
	ROB	-10,398	-6,858	1,098	1,002	0,123	0,082	0,994
0,1% OEA ²	BAR	-6,844	-4,012	1,131	1,005	0,148	0,109	0,989
	HUG	-7,961	-4,421	1,123	1,002	0,133	0,100	0,995
	ROB	-8,733	-5,193	1,130	1,003	0,130	0,100	0,994
0,2% OEA ²	BAR	-2,852	0,239	1,153	1,003	0,172	0,140	0,984
	HUG	-7,466	-3,603	1,123	1,002	0,140	0,111	0,991
	ROB	-10,184	-6,321	1,105	1,001	0,129	0,100	0,994
0,4% OEA ²	BAR	4,136	7,226	1,218	1,018	0,214	0,166	0,977
	HUG	0,147	4,010	1,180	1,012	0,178	0,132	0,984
	ROB	-3,918	-0,055	1,169	1,006	0,157	0,117	0,991
0,05% OEO ³	BAR	10,195	13,028	1,281	1,019	0,260	0,224	0,968
	HUG	6,601	10,141	1,233	1,015	0,216	0,183	0,975
	ROB	1,152	4,693	1,175	1,005	0,137	0,1800	0,988
0,1% OEO ³	BAR	11,729	14,562	1,337	1,022	0,274	0,248	0,985
	HUG	9,905	13,445	1,290	1,018	0,241	0,210	0,970
	ROB	5,528	9,068	1,210	1,008	0,208	0,155	0,983
0,2% OEO ³	BAR	3,569	6,660	1,223	1,014	0,211	0,176	0,977
	HUG	-0,196	3,667	1,118	1,009	0,176	0,147	0,985
	ROB	-2,618	1,245	1,167	1,004	0,163	0,129	0,990
0,4% OEO ³	BAR	2,287	5,337	1,214	1,009	0,202	0,164	0,979
	HUG	-0,422	3,440	1,173	1,006	0,175	0,137	0,985
	ROB	0,083	3,946	1,191	1,005	0,177	0,142	0,987

Blend comercial de ácidos orgânicos¹, Óleo essencial de alecrim², Óleo essencial de orégano³.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Todos os modelos matemáticos se ajustaram bem aos dados experimentais, no entanto, o modelo de Robazza et al., apresentou melhores resultados de AIC, BIC, AF, BF, RMSE, MAE para a maioria dos tratamentos. Isso é justificado devido ao fato de que o modelo de Robazza et al., previu de forma mais uniforme valores acima e abaixo dos dados

experimentais enquanto que no caso do modelo de Baranyi-Roberts e Huang, a maior parte dos valores preditos foram superiores aos valores observados.

Os resultados dos índices estatísticos obtidos na avaliação da capacidade preditiva do modelo para os valores do fator *Bias* (BF) variaram de 1,001 a 1,022 para os diferentes modelos e tratamentos. Isso significa que o valor observado e o valor previsto eram praticamente idênticos. Para o fator de *Accuracy* (AF) os valores variaram de 1,097 a 1,376 para os modelos de BAR, HUG e ROB nos diferentes tratamentos apresentados na Tabela 6.

Os maiores valores de RMSE foram observados para a amostra controle para os modelos de BAR, HUG e ROB de 0,431, 0,393 e 0,335, respectivamente. Para os demais tratamentos os valores foram inferiores aos citados. Esses valores estão de acordo com valores relatados por Kreyenschmidt et al. (2010) e Silva et al. (2017) que obtiveram valores de RMSE variando de 0,409 a 1,330 para ajuste de modelos descrevendo o crescimento da flora bacteriana nativa em produtos cárneos. Vale ressaltar, que os coeficientes de determinação dos tratamentos foram superiores a 0,913 resultando em baixos valores de RMSE e MAE.

Embora para a maior parte dos conjuntos de dados avaliadas pelo modelo de Robazza et al. tenha fornecido um melhor ajuste (ver Tabela 6), optou-se pela escolha do modelo de Baranyi-Roberts como mais eficiente para descrever o crescimento das BAL em linguiça Toscana. Esta escolha se baseia no fato que este modelo apresenta um parâmetro a menos em sua equação, já que este modelo pode ser representado com ou sem a duração da fase *lag*, o que é mais condizente com os dados experimentais obtidos e também como pode ser visualizado na Tabela 5, o modelo de Robazza et al. superestimou alguns valores de μ_{max} . Porém, os resultados dos índices AIC, BIC e RMSE obtidos com esse modelo não são muito diferentes em relação aos obtidos com os modelos de Robazza et al. e Huang.

5.3.2 Avaliação da vida útil em função da concentração de óleo essencial

A Tabela 7 apresenta os valores da vida útil das linguiças Toscanas estimados através dos modelos de Baranyi-Roberts, Huang e Robazza et al.

A partir dos dados da Tabela 7, observou-se que a adição de doses baixas (0,05 e 0,1 %) de OEA e OEO provocou um prolongamento da vida de prateleira da linguiça Toscana em 2,40 e 2,44 vezes em relação ao controle segundo o modelo de Baranyi-Roberts. Para os demais modelos, o aumento foi de 2,32 e 2,39 vezes (0,05 e 0,1% de OEA) segundo o modelo de Huang e 1,85 vezes (0,05 e 0,1% de OEA) de acordo com o modelo de Robazza et al. Já no

que concerne aos tratamentos com OEO, a vida de prateleira foi estendida em 2,18 e 2,41 vezes (0,05 e 0,1% de OEO) para o modelo de Baranyi-Roberts, 2,16 e 2,44 vezes (0,05 e 0,1% de OEO) para o modelo de Huang e 1,88 e 2,12 vezes (0,05 e 0,1% de OEO) para o modelo de Robazza et al. em relação ao controle.

Tabela 7 – Vida útil da linguiça Toscana estimada através das equações de Baranyi-Roberts (ROB), Huang (HUG) e Robazza et al. (ROB) através dos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Vida útil (dias)		
	Baranyi-Roberts	Huang	Robazza et al.
Controle	13,59	14,52	18,31
<i>Blend</i> ¹	28,35	29,16	30,34
0,05% OEA ²	32,58	33,76	33,87
0,1% OEA ²	33,28	34,71	33,86
0,2% OEA ²	37,69	38,69	38,22
0,4% OEA ²	39,55	41,15	43,42
0,05% OEO ³	29,57	31,39	34,44
0,1% OEO ³	32,78	35,40	38,85
0,2% OEO ³	39,90	41,65	43,38
0,4% OEO ³	47,84	49,03	49,48

Blend comercial de ácidos orgânicos¹, Óleo essencial de alecrim², Óleo essencial de orégano³.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Ao se considerar a adição de 0,4% de óleo essencial de OEA e OEO, respectivamente, obteve-se um aumento da vida útil da linguiça Toscana de 39,55 e 47,84 dias de acordo com o modelo de Baranyi-Roberts, 41,15 e 49,03 dias segundo o modelo de Huang e 43,42 e 49,48 dias conforme o modelo de Robazza et al., respectivamente.

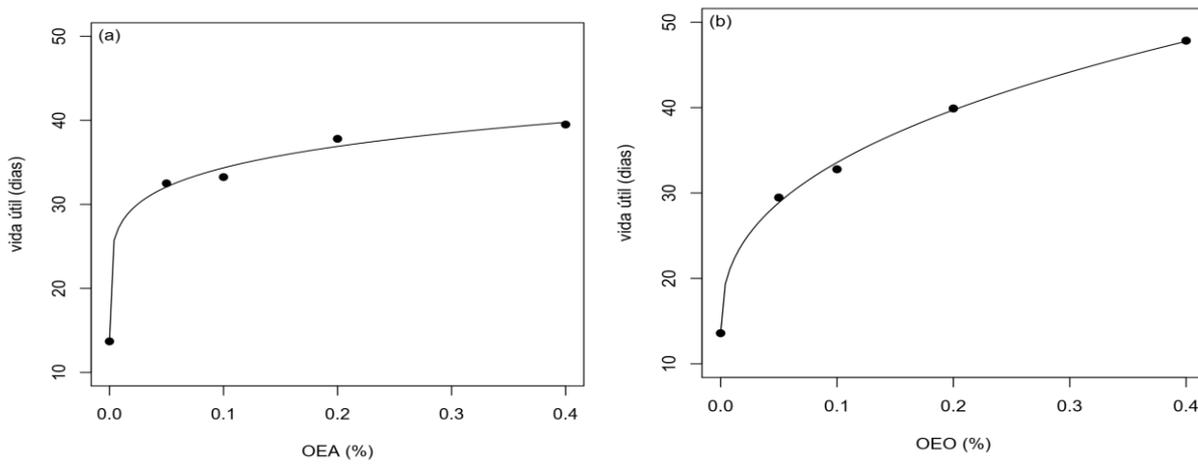
As Figuras de (13 a 15) apresentam os ajustes obtidos através da Equação (13) para a vida útil das amostras segundo os modelos de Baranyi-Roberts, Huang e Robazza et al., em função da concentração de OEA e OEO aplicados nas linguiças Toscanas. As seguintes equações empíricas foram obtidas:

- Modelo de Baranyi-Roberts:

$$t_{\text{SLOEA}} = 13,59 + (8,63 \times 10^8 [\text{OEA}])^{0,17} \quad (21)$$

$$t_{\text{SLOEO}} = 13,63 + (2,35 \times 10^4 [\text{OEO}])^{0,39} \quad (22)$$

Figura 13 – Curvas obtidas após o ajuste da Equação 13 aos dados de vida útil estimados pelo modelo de Baranyi-Roberts para os tratamentos com OEA (a) e OEO (b).



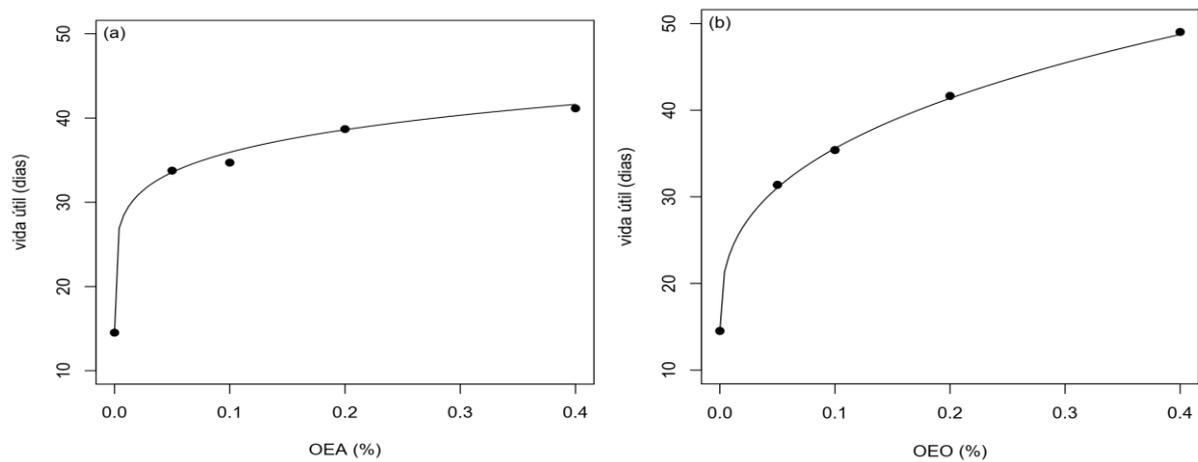
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

- Modelo de Huang:

$$t_{\text{SLOEA}} = 14,53 + (6,70 \times 10^8 [\text{OEA}])^{0,17} \quad (23)$$

$$t_{\text{SLOEO}} = 14,53 + (6,04 \times 10^4 [\text{OEO}])^{0,35} \quad (24)$$

Figura 14 – Curvas obtidas após o ajuste da Equação 13 aos dados de vida útil estimados pelo modelo de Huang para os tratamentos com OEA (a) e OEO (b).



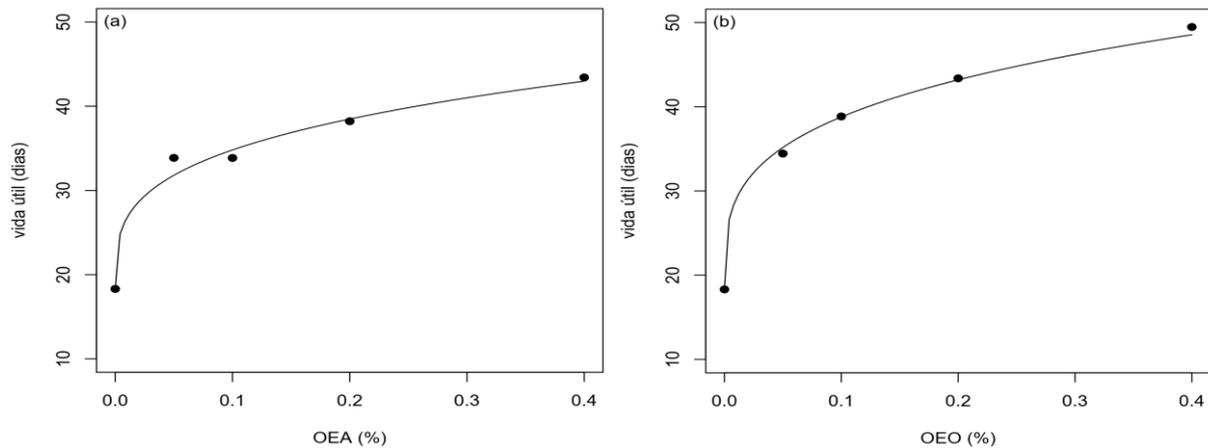
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

- Modelo de Robazza et al.:

$$t_{\text{SLOEA}} = 18,30 + (1,58 \times 10^5 [\text{OEA}])^{0,31} \quad (25)$$

$$t_{\text{SLOEO}} = 18,37 + (4,42 \times 10^5 [\text{OEO}])^{0,26} \quad (26)$$

Figura 15 – Curvas obtidas após o ajuste da Equação 13 aos dados de vida útil estimados pelo modelo de Robazza et al. para os tratamentos com OEA (a) e OEO (b).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Pode-se verificar em todos os tratamentos, que uma pequena dose de OE provoca um grande aumento no prazo de validade em comparação com a amostra não tratada. No entanto, quanto maior a concentração de OE adicionada às linguças Toscana seu aumento da vida útil fica menos intenso, como pode ser visualizado no comportamento assintótico das curvas. Além disso, pode-se observar nas Figuras (13, 14 e 15), para o OEA (a) que o aumento inicial do prazo de validade foi mais acentuado, em relação ao OEO. Esse comportamento sugere que uma quantidade menor de OEA pode promover um aumento significativo no prazo de validade da linguça Toscana, não levando a comprometimento de atributos sensoriais.

A qualidade do ajuste do modelo de Weibull modificado aos dados de vida útil foi estimada através dos parâmetros estatísticos (AF, BF, RMSE, MAE, R^2) conforme apresenta a Tabela 8.

Os valores ajustados para o modelo de Weibull modificado indicaram que o modelo se ajustou bem aos dados empíricos de vida útil, justificando assim sua utilização como equações empíricas para prever a vida de prateleira em função da concentração de OEA e OEO. Em geral, curvas de crescimento côncavas ascendentes foram observadas para todas as concentrações de OEA e OEO analisadas para os diferentes tempos de vida útil.

Tabela 8 – Parâmetros estatísticos obtidos pelos ajustes da Equação 13 aos dados de vida útil da linguiça Toscana estimados pelos modelos primários de Baranyi-Roberts (BAR), Huang (HUG) e Robazza et al. (ROB).

Tratamentos	Índices estatísticos					
	Modelo	AF	BF	RMSE	MAE	R ²
OEA ¹	BAR	1,080	1,001	0,642	0,508	0,995
	HUG	1,058	1,000	0,499	0,375	0,997
	ROB	1,129	1,002	0,967	0,803	0,987
OEO ²	BAR	1,058	1,001	0,456	0,336	0,998
	HUG	1,022	1,000	0,185	0,137	0,999
	ROB	1,016	1,000	0,157	0,116	0,999

Óleo essencial de alecrim¹, Óleo essencial de orégano².

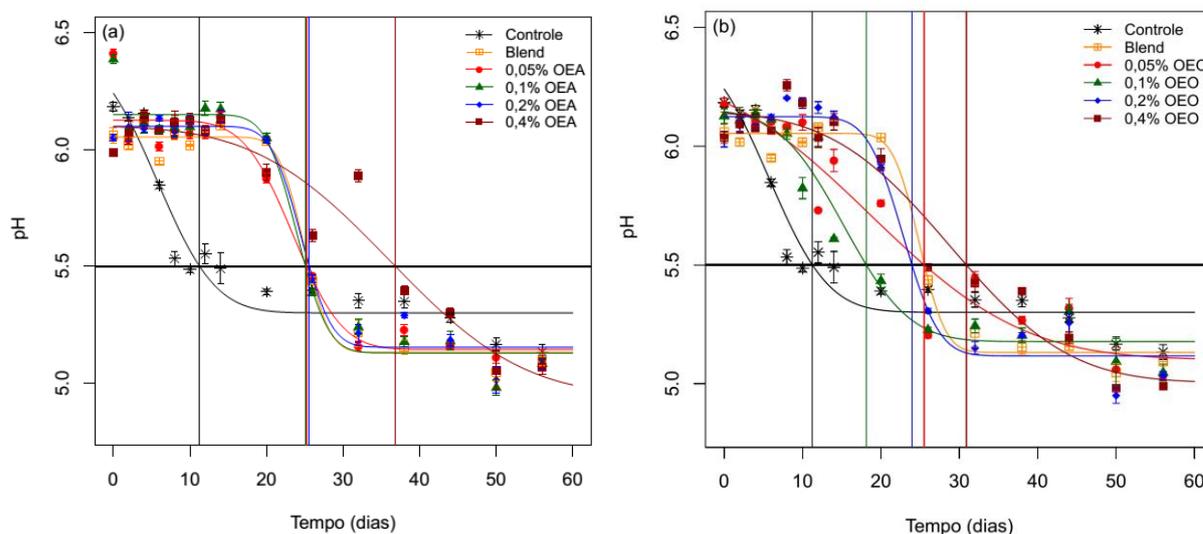
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

5.4 ANÁLISES DE pH

O pH de um produto cárneo é um importante fator a ser analisado, porque afeta muitos fatores de qualidade, incluindo cor, textura e sabor (LEE et al., 2010). Por essa razão, foi analisada a cinética da variação do pH em função do tempo de armazenamento para os diferentes tratamentos testados. As Figuras 16 (a) e 16 (b), apresentam os efeitos da adição do *blend* de ácidos orgânicos e dos tratamentos com diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b), sobre os valores de pH das linguiças Toscanas embalada a vácuo a temperatura de 4 °C, no decorrer do armazenamento.

Os estudos de Romans e Ziegler (2001), Cocolin et al. (2004), Ahmad e Baher (2013), Monteiro et al. (2017), relataram que os valores normais de pH para produtos cárneos e linguiças não devem ser inferiores a 5,5 pois provocam sabores indesejáveis, descoloração, produção de gás, inchaço da embalagem e coloração do produto esverdeada, consequentemente levando a uma rápida deterioração do produto cárneo. Portanto, esse valor foi estabelecido como limite inferior de pH para cada tratamento.

Figura 16 – Curvas obtidas após ajuste da Equação 7 aos dados de pH em função do tempo. As linhas sólidas verticais correspondem ao prazo de validade previsto para cada tratamento.



Blend comercial de ácidos orgânicos¹, Óleo essencial de alecrim², Óleo essencial de orégano³.
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Os valores de pH no início do armazenamento apresentaram-se na faixa de 5,98 a 6,41. Ao decorrer do armazenamento, houve um declínio significativo ($p < 0,05$) nos valores de pH para todos os tratamentos, sendo que foram observados valores de pH finais entre 4,99 e 5,13. Estes resultados são consistentes com relatos anteriores na literatura para linguças frescas conforme Crist et al. (2014), Fasolato et al. (2016), Sharma et al. (2017) e Šojić et al. (2018). O declínio de pH foi mais acentuado para a amostra controle e nas amostras tratadas com as menores concentrações de OEA e OEO e *blend* comercial, verificando que as maiores concentrações levaram a uma estabilização do pH até a concentração bacteriana das BAL atingir 7 log (UFC/g).

As BAL fazem parte da microbiota inicial das linguças Toscanas avaliadas. Conforme Wójciak et al. (2014), esse declínio nos valores de pH durante o armazenamento é uma consequência da formação de ácidos orgânicos a partir de hidratos de carbono sob a influência do aumento da população de BAL presentes na flora nativa do produto cárneo (NYCHAS et al., 2008; WENJIAO et al., 2014). Além disso, as BAL podem influenciar na degradação das proteínas da carne, ocasionando assim, uma redução do pH (BORCH et al., 1996).

A Tabela 9, apresenta os parâmetros estimados após o ajuste da Equação (7) aos dados experimentais do pH.

Tabela 9 – Parâmetros cinéticos (\pm intervalo de confiança de 95%) e vida útil da linguiça Toscana estimada através do ajuste da Equação 7 aos dados experimentais para cada tratamento.

Tratamentos	pH ₀	pH _{max} (dias ⁻¹)	λ (dias)	t* (dias)	t _{SL} (dias)
Controle	6,241(\pm 0,227)	-0,174 (\pm 0,077)	-6,196 (\pm 20,629)	5,718 (\pm 7,910)	11,26
Blend ¹	6,054(\pm 0,046)	-0,324(\pm 0,296)	30,126 (\pm 4,157)	24,887(\pm 1,364)	25,55
0,05% OEA ²	6,126(\pm 0,089)	-0,179(\pm 0,123)	33,528 (\pm 8,011)	23,462(\pm 2,770)	25,24
0,1% OEA ²	6,149(\pm 0,080)	-0,294(\pm 0,216)	30,351 (\pm 4,857)	23,973(\pm 2,087)	25,09
0,2% OEA ²	6,099(\pm 0,055)	-0,282(\pm 0,188)	18,356 (\pm 4,962)	24,524(\pm 1,520)	25,56
0,4% OEA ²	6,098(\pm 0,115)	-0,077(\pm 0,037)	8,670 (\pm 19,065)	36,128(\pm 9,743)	36,83
0,05% OEO ³	6,186(\pm 0,203)	-0,073(\pm 0,036)	-12,166 (\pm 44,494)	18,595(\pm 13,308)	25,53
0,1% OEO ³	6,146(\pm 0,145)	-0,137(\pm 0,073)	2,143 (\pm 9,409)	15,247(\pm 3,091)	18,13
0,2% OEO ³	6,124(\pm 0,070)	-0,258(\pm 0,149)	15,704 (\pm 4,617)	22,856(\pm 1,894)	23,95
0,4% OEO ³	6,139(\pm 0,123)	-0,088(\pm 0,039)	5,030 (\pm 15,701)	28,909(\pm 5,431)	30,91

Blend comercial de ácidos orgânicos¹, Óleo essencial de alecrim², Óleo essencial de orégano³.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

A adição de diferentes concentrações de OEA e OEO e *blend* de ácidos orgânicos afetou significativamente a taxa de diminuição do pH conforme pode ser visualizado pelo parâmetro pH_{max} . Para a amostra não tratada, o valor de pH_{max} , foi igual a -0,17 dias⁻¹. Para a amostra tratada com o *blend* de ácidos orgânicos o pH_{max} foi igual a -0,32 dias⁻¹. Os resultados obtidos para μ_{max} das amostras tratadas com 0,05%, 0,1%, 0,2% e 0,4% de OEA foram de -0,18, -0,29, -0,28, -0,08 dias⁻¹, respectivamente. Por outro lado, os valores obtidos para as amostras tratadas com 0,05%, 0,1%, 0,2% e 0,4% de OEO foram de -0,07, -0,14, -0,26, -0,09 dias⁻¹, respectivamente. Portanto, é possível concluir que o pH diminuiu mais lentamente quando maiores concentrações (0,2 e 0,4%) de OEA, OEO e o *blend* de ácidos orgânicos foram adicionados à linguiça Toscana. Por sua vez, o declínio de pH foi maior quando concentrações mais baixas (0,05, 0,1%) de OEA e OEO foram adicionadas à linguiça Toscana.

Pode-se observar na Tabela 9, que a vida útil da amostra controle calculada através do limite de pH aceitável para linguiças frescas foi igual a 11,26 dias.

As concentrações de 0,4% de OEA e OEO prolongaram a vida útil da linguiça Toscana para 36,80 e 30,95 dias, respectivamente. As aplicações das menores concentrações (0,05%) de OEA e OEO não foram significativamente diferentes quando comparadas com as

concentrações de (0,1 e 0,2%) de OEA e OEO para a extensão da vida útil. Em geral, os valores de vida útil estimados com o critério do pH foram menores que os valores estimados pela população de BAL, indicando que o critério do pH é um pouco mais rigoroso. Entretanto, a maior parte dos autores considera a população de bactérias lácticas como um indicador mais confiável da vida útil.

Os índices estatísticos obtidos pelo ajuste da Equação 7, aos dados experimentais são apresentados na Tabela 10. Para todos os tratamentos, foi obtido um bom ajuste aos dados experimentais, com os valores médios de AIC, BIC, AF, BF, RMSE, MAE de $-21,93 \pm 7,34$, $-18,74 \pm 7,30$, $1,07 \pm 0,02$, $1,00 \pm 0,01$, $0,09 \pm 0,02$, $0,07 \pm 0,02$, respectivamente. Esses valores demonstram que o modelo adotado pode ser utilizado com segurança para prever os efeitos da influência do pH em linguiça Toscana adicionada de *blend* de ácidos orgânicos e diferentes concentrações de OEA e OEO.

Tabela 10 – Parâmetros estatísticos estimados pelos ajustes da Equação 7 aos dados experimentais para cada tratamento.

Tratamentos	Índices estatísticos					
	AIC	BIC	AF	BF	RMSE	MAE
Controle	-16,877	-13,336	1,084	1,001	0,099	0,084
<i>Blend</i> ¹	-36,943	-33,403	1,039	1,000	0,050	0,041
0,05% OEA ²	-19,618	-16,078	1,055	1,001	0,090	0,059
0,1% OEA ²	-20,362	-16,821	1,064	1,001	0,087	0,066
0,2% OEA ²	-31,503	-27,963	1,044	1,000	0,061	0,044
0,4% OEA ²	-17,932	-14,392	1,068	1,001	0,095	0,072
0,05% OEO ³	-12,016	-8,476	1,092	1,001	0,116	0,093
0,1% OEO ³	-20,287	-16,747	1,067	1,001	0,088	0,068
0,2% OEO ³	-24,869	-21,329	1,057	1,000	0,076	0,057
0,4% OEO ³	-18,870	-15,329	1,076	1,001	0,092	0,079

Blend comercial de ácidos orgânicos¹, Óleo essencial de alecrim², Óleo essencial de orégano³.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

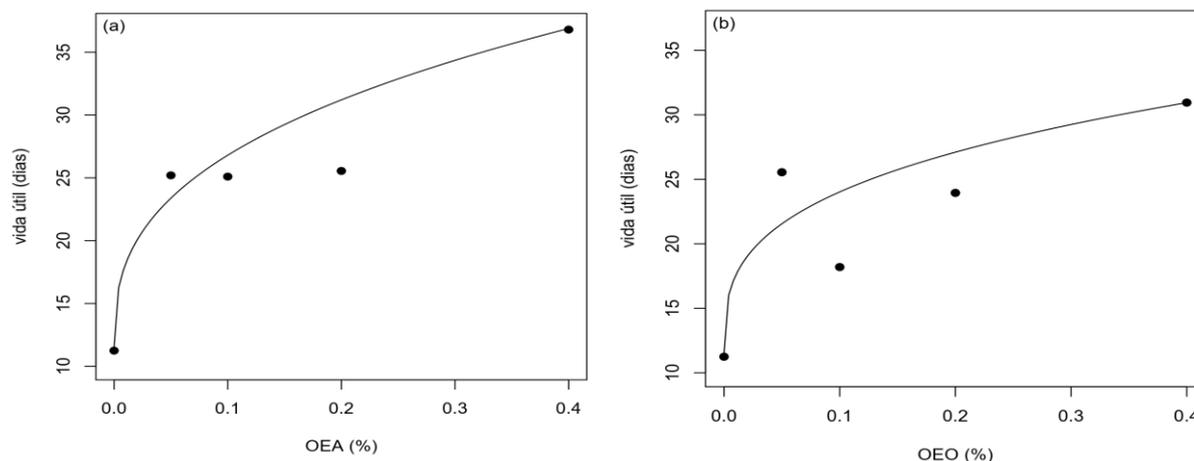
As seguintes expressões empíricas foram obtidas para descrever o prazo de validade em função do pH das linguiças Toscanas.

$$t_{\text{SLOEA}} = 11,55 + (1,68 \times 10^4 [\text{OEA}])^{0,36} \quad (27)$$

$$t_{\text{SLOEO}} = 11,54 + (2,70 \times 10^4 [\text{OEO}])^{0,31} \quad (28)$$

A Figura 17, mostra os ajustes obtidos através das Equações (27 e 28), para os dados experimentais da vida útil, estimados através do limite de pH aceitável para produtos cárneos.

Figura 17 – Curvas obtidas para a vida útil das amostras tratadas com OEA (a) e OEO (b) e função da concentração de óleo essencial usando o pH de 5,5 como limite.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Pode-se observar, de forma análoga à observada para os dados das BAL, que uma pequena concentração de OE causa um aumento significativo no prazo de validade em relação à amostra não tratada. Entretanto, nesta situação, menores concentrações de OEO adicionados à linguiça Toscana fazem com que o aumento da vida útil seja mais intenso quando comparado à mesma concentração de OEA.

5.4.1 pH em função da população de BAL

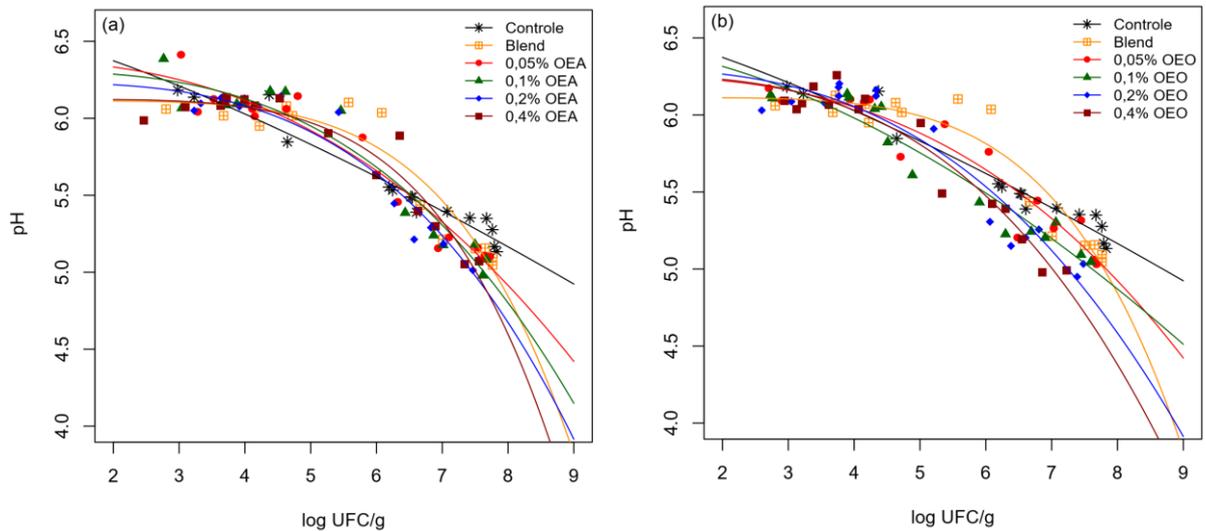
O ácido láctico produzido pelas BAL durante seu crescimento ocasiona a redução do pH do meio nas quais estão inseridas e adaptadas. Conforme já mencionado, essas variações do pH podem estar relacionadas à deterioração dos produtos cárneos. Portanto, no presente estudo procurou-se correlacionar a variação do pH em função da população de BAL presente nas amostras.

A Figura 18 apresenta a variação do pH ao longo do crescimento das BAL para cada tratamento adotado no presente estudo.

Conforme pode ser visualizado na Figura 18, houve um decréscimo nos valores de pH conforme a população de BAL aumentava. Entretanto, esta variação no pH não se deve exclusivamente à ação das BAL, mas também a outras reações químicas que ocorrem na linguiça durante o armazenamento. Verificou-se ainda, que quando a concentração celular de

BAL atingiu 7 log (UFC/g) e esse decréscimo foi mais acentuado para a amostra controle. Isto se deve ao fato de que a mesma apresentou a menor vida útil.

Figura 18 – Cinética de diminuição do pH em função da população de BAL para cada tratamento com OEA (a) e OEO (b). O modelo de Weibull foi ajustado aos dados experimentais.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Esses resultados corroboram com os encontrados nos estudos de Ruiz-Capillas, Carballo e Colmenero (2007), Kreyenschmidt et al. (2010) e Dalcanton et al. (2013), onde o perfil cinético de pH ao decorrer do crescimento celular das BAL se comportou mais constante até atingir valores próximos a 7 log (UFC/g). A Tabela 11, apresenta as funções empíricas obtidas após ajuste do modelo de Weibull para o pH durante o crescimento das BAL na linguiça Toscana.

Tabela 11 – Funções empíricas e índices estatísticos obtidos após ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais de pH em função da população das BAL.

Tratamentos	Funções empíricas	AF	BF	RMSE	R ²
Controle	$pH(y) = 6,60 - \left(\frac{y}{6,07}\right)^{1,32}$	1,055	1,000	0,073	0,953
<i>Blend</i> ¹	$pH(y) = 6,11 - \left(\frac{y}{7,63}\right)^{5,03}$	1,090	1,001	0,122	0,922
0,05% OEA ²	$pH(y) = 6,38 - \left(\frac{y}{6,85}\right)^{2,46}$	1,093	1,001	0,112	0,939
0,1% OEA ²	$pH(y) = 6,31 - \left(\frac{y}{6,99}\right)^{3,05}$	1,105	1,001	0,118	0,940
0,2% OEA ²	$pH(y) = 6,23 - \left(\frac{y}{7,01}\right)^{3,36}$	1,077	1,001	0,106	0,944
0,4% OEA ²	$pH(y) = 6,12 - \left(\frac{y}{7,34}\right)^{4,90}$	1,077	1,001	0,101	0,932
0,05% OEO ³	$pH(y) = 6,23 - \left(\frac{y}{7,20}\right)^{2,71}$	1,090	1,001	0,121	0,915
0,1% OEO ³	$pH(y) = 6,46 - \left(\frac{y}{6,11}\right)^{1,73}$	1,097	1,001	0,111	0,930
0,2% OEO ³	$pH(y) = 6,30 - \left(\frac{y}{6,60}\right)^{2,80}$	1,116	1,001	0,134	0,921
0,4% OEO ³	$pH(y) = 6,26 - \left(\frac{y}{6,50}\right)^{3,04}$	1,084	1,001	0,105	0,942

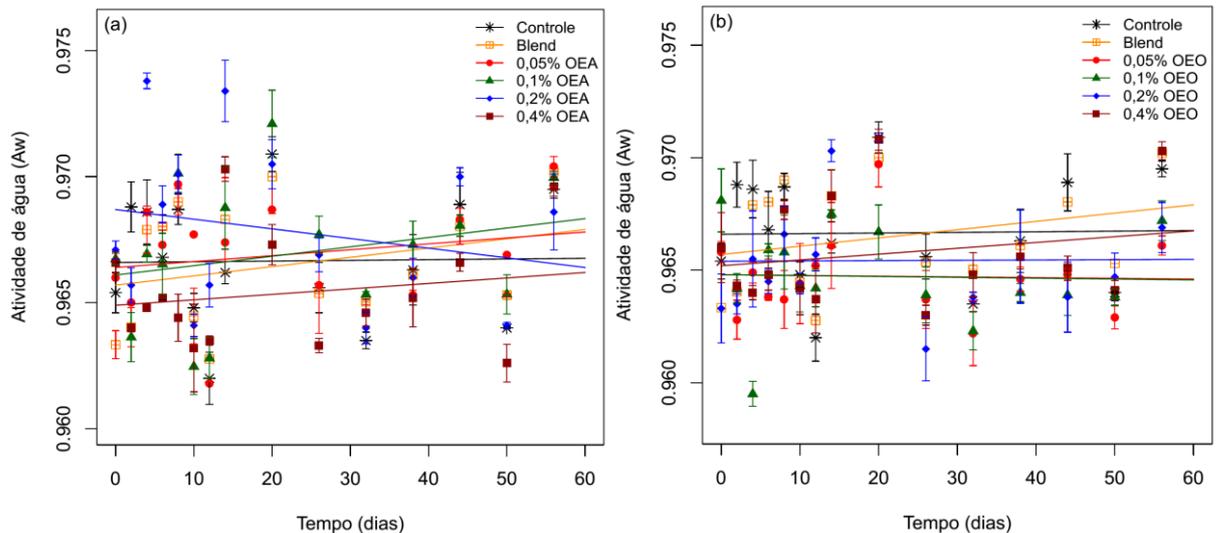
Blend comercial de ácidos orgânicos¹, Óleo essencial de alecrim², Óleo essencial de orégano³.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

5.5 MODELAGEM DA ATIVIDADE DE ÁGUA

Visualiza-se na Figura 19 (a e b), o perfil cinético de variação da a_w da linguiça Toscana refrigerada a 4 °C e armazenada a vácuo para os diferentes tratamentos. Em geral, a maioria das carnes frescas e produtos cárneos apresentam um valor de a_w maior que 0,85 (DAVE; GHALY, 2011). Os valores de a_w , obtidos ao longo do armazenamento para a linguiça Toscana se mantiveram aproximadamente constantes ou com uma ligeira variação linear, indicando assim uma boa estabilidade nos diferentes tratamentos durante o armazenamento refrigerado. Neste sentido, os resultados obtidos neste estudo concordam com os observados por Metaxopoulos et al. (2002), Wójciak et al. (2014) e Zhang et al. (2016), que apresentaram a_w constante de 0,98 para linguiças de carne suína mantidas sob refrigeração.

Figura 19 – Variação da atividade de água durante armazenamento para os diferentes tratamentos empregados.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

5.6 CINÉTICA DE VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE COR

A cor é um dos principais atributos de qualidade que determinam se um determinado produto cárneo será comprado. Além disso, do ponto de vista do consumidor, é a característica que determina o prazo de validade da carne (BEKHIT et al., 2018). A cor da carne e produtos cárneos e dos produtos cárneos está relacionada com os pigmentos naturais, como a mioglobina e a hemoglobina, encontrados na carne.

A variação na cor da carne depende de muitos fatores relacionados aos animais (espécie, raça, sexo, idade, dieta e atividade). A atividade bacteriana é outro fator que contribui para as alterações dos pigmentos na carne crua influenciando significativamente nos parâmetros de coloração (FAUSTMAN et al., 1993). A ação das BAL em linguiça Toscana e demais produtos cárneos, provoca, em geral, mudanças na cor. Durante o armazenamento ocasionalmente podem ocorrer reações químicas complexas que alteram a cor do produto. Estas reações afetam a concentração de compostos como a mioglobina, oximioglobina, desoximioglobina e metamioglobina, as quais estão relacionadas as principais causas da deterioração da cor da carne e dos produtos cárneos.

Para modelar a cinética de mudança dos parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h^o dos diferentes iluminantes (A) e (D65), foi utilizado um modelo cinético de primeira ordem foi utilizado, descrito na Equação (11).

As Figuras de 20 a 29 apresentam os ajustes do modelo cinético de primeira ordem dos parâmetros de cor L^* , a^* , b^* , C^* e h° para os iluminantes (A) e (D65) para cada tratamento. Os resultados mostram que todos os parâmetros de cor diminuíram durante o armazenamento refrigerado. Conclusões semelhantes foram obtidas em outros estudos, e mudanças no pH e na formação de ácido láctico pelas BAL foram apontadas como os principais fatores responsáveis pela redução dos parâmetros de cor em produtos cárneos (BOZKURT, 2006; PÉREZ-ÁLVAREZ, 2008).

Em geral, observou-se uma diminuição maior dos parâmetros quando foram adicionadas menores concentrações de óleos essenciais nas linguiças Toscanas, indicando que a adição de *blend*, OEA e OEO promoveram uma maior estabilidade da cor das linguiças em relação à amostra controle.

No que diz respeito às constantes de velocidade da reação (Tabela 12), o processo de descoloração manifestou-se pela redução dos valores de k que está relacionado à oxidação de componentes presentes na carne (GRIMSRUD et al., 2008).

Tabela 12 – Valores de k estimados e índices estatísticos obtidos após ajuste da Equação 5 aos dados dos diferentes parâmetros (L^* , a^* , b^* , C^* e h°) de coloração para os iluminantes (A) e iluminante (D65).

Tratamento	Parâmetros de coloração									
	L^* (A)	L^* (D65)	a^* (A)	a^* (D65)	b^* (A)	b^* (D65)	C^* (A)	C^* (D65)	h° (A)	h° (D65)
Controle	-0,0001	-0,0001	0,0008	-0,0005	0,0038	0,0053	0,0020	0,0023	0,0022	0,0037
<i>Blend</i> ¹	0,0022	0,0022	0,0043	0,0027	0,0055	0,0068	0,0048	0,0049	0,0008	0,0025
0,05% OEA ²	0,0031	0,0031	0,0048	0,0033	0,0069	0,0082	0,0056	0,0058	0,0016	0,0032
0,05 % OEO ³	0,0039	0,0040	0,0046	0,0032	0,0062	0,0079	0,0020	0,0057	0,0011	0,0027
0,1% OEA ²	0,0028	0,0028	0,0036	0,0020	0,0052	0,0066	0,0042	0,0044	0,0012	0,0030
0,1% OEO ³	0,0028	0,0028	0,0034	0,0024	0,0050	0,0064	0,0052	0,0045	0,0012	0,0026
0,2% OEA ²	0,0012	0,0011	0,0031	0,0016	0,0043	0,0054	0,0036	0,0037	0,0009	0,0024
0,2% OEO ³	0,0027	0,0028	0,0028	0,0013	0,0044	0,0065	0,0034	0,0041	0,0012	0,0033
0,4% OEA ²	0,0020	0,0020	0,0020	0,0005	0,0027	0,0036	0,0023	0,0023	0,0004	0,0019
0,4% OEO ³	0,0016	0,0022	0,0034	0,0028	0,0031	0,0052	0,0033	0,0040	-0,0001	0,0016

Blend comercial de ácidos orgânicos¹, Óleo essencial de alecrim², Óleo essencial de orégano³.

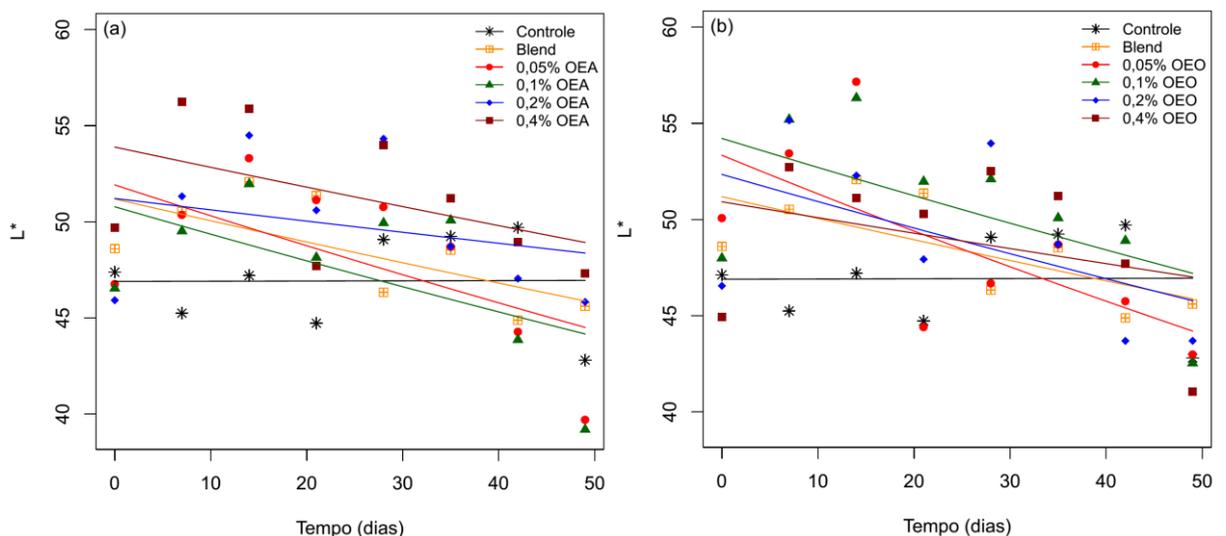
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Pode ser visto na Tabela 12, que os resultados obtidos para a amostra controle não foram consistentes. Na verdade, obteve-se o pior ajuste da Equação (9) aos dados

experimentais para este tratamento. Portanto, o valor do parâmetro k para a amostra controle deve ser analisado com cautela.

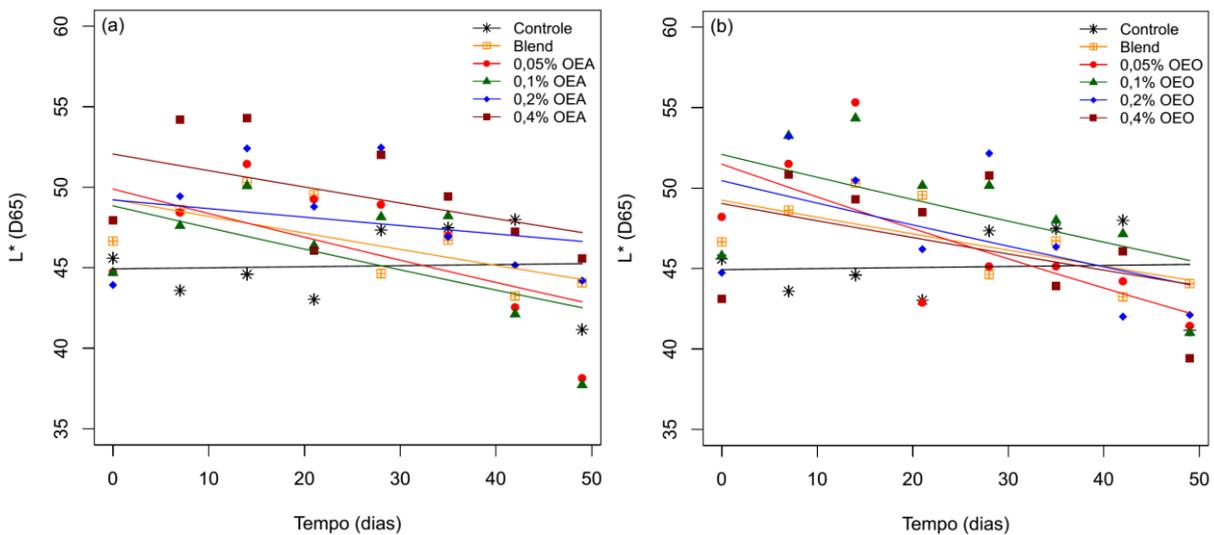
A luminosidade (L^*), é considerada o principal parâmetro que descreve a qualidade dos produtos cárneos. Em relação ao comportamento dos valores de L^* , Figuras 20 e 21, os resultados indicam uma maior variação principalmente na amostra controle. Porém, assim como no presente estudo, relatos presentes na literatura indicam que L^* é o parâmetro que mais varia em carne e produtos cárneos durante o armazenamento em condições de refrigeração (BINGOL; ERGUN, 2011). Isto pode ser atribuído ao fato de ocorrerem reações de oxidação que ocorrem na carne durante o armazenamento (LINARES; BÓRNEZ; VERGARA, 2008). Conforme Nerin et al. (2006), os compostos antioxidantes presentes nos OE, tem a capacidade de retardar a oxidação da mioglobina que é responsável pela formação de metamioglobina, gerando assim uma estabilização dos valores de L^* , a^* e b^* durante o armazenamento. Além disso, essa variação de L^* , pode ser explicada pela falta de interação da amostra controle (sem adição de OE) com componentes dos OE que retardam a oxidação da carne (KULKARNI et al., 2011).

Figura 20 – Variação do parâmetro L^* das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, *blend* e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

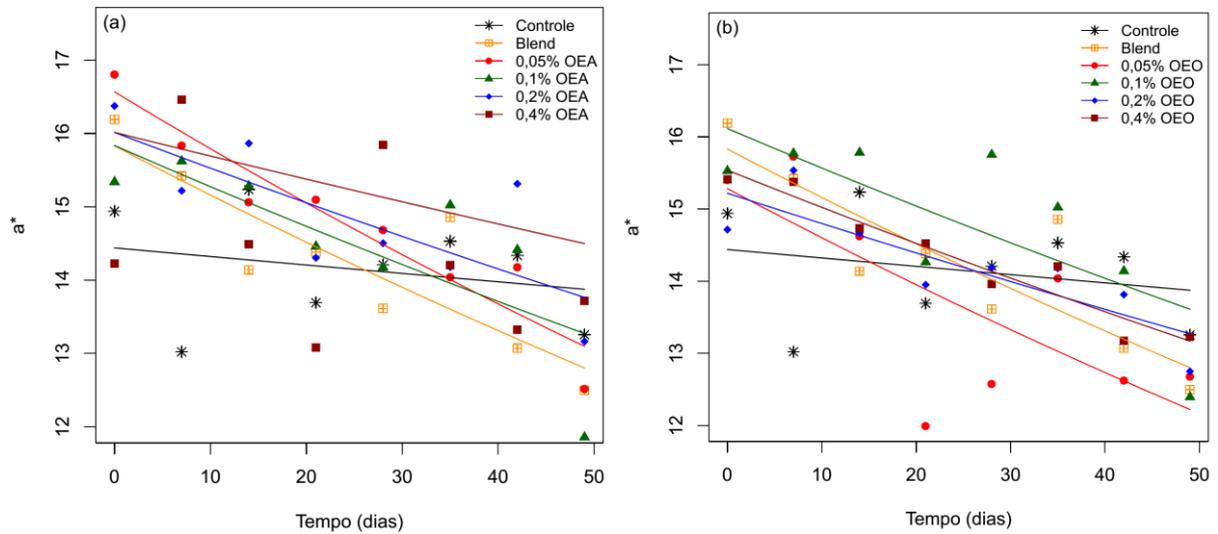
Figura 21 – Variação do parâmetro L^* (iluminante D65) das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, *blend* e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

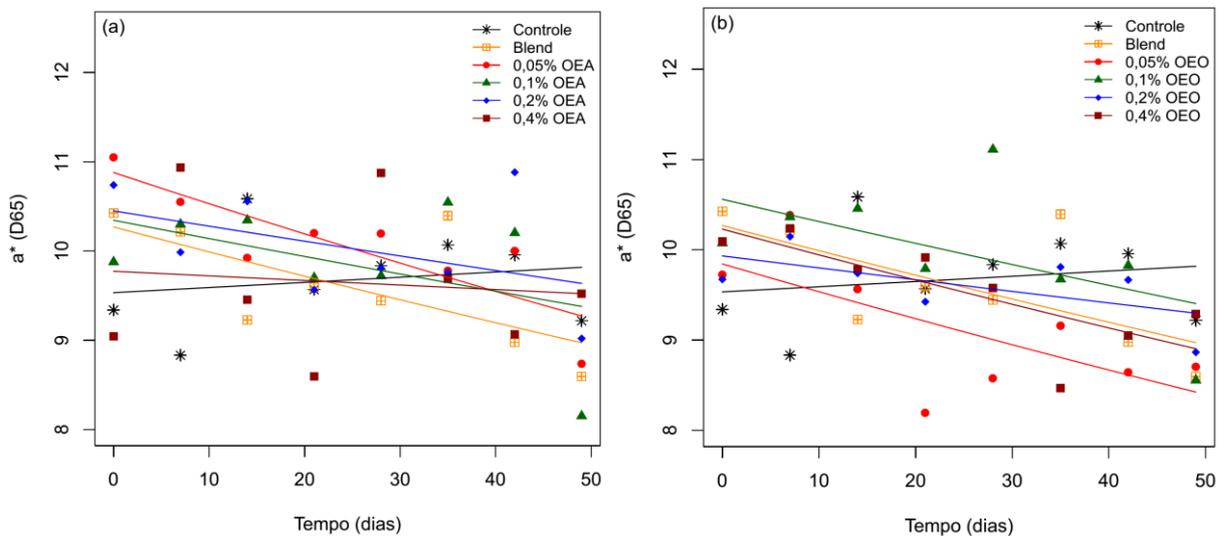
A vermelhidão (a^*) é o parâmetro de cor mais importante para avaliar o escurecimento da carne. No que diz respeito à coordenada a^* , verifica-se nas Figuras 22 e 23 (a e b), que os parâmetros de a^* diminuíram durante o armazenamento para os tratamentos com *blend* de ácidos orgânicos, OEA e OEO.

Figura 22 – Variação do parâmetro (a^*) das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, *blend* e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Figura 23 – Variação do parâmetro a^* (iluminante D65) das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, *blend* e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

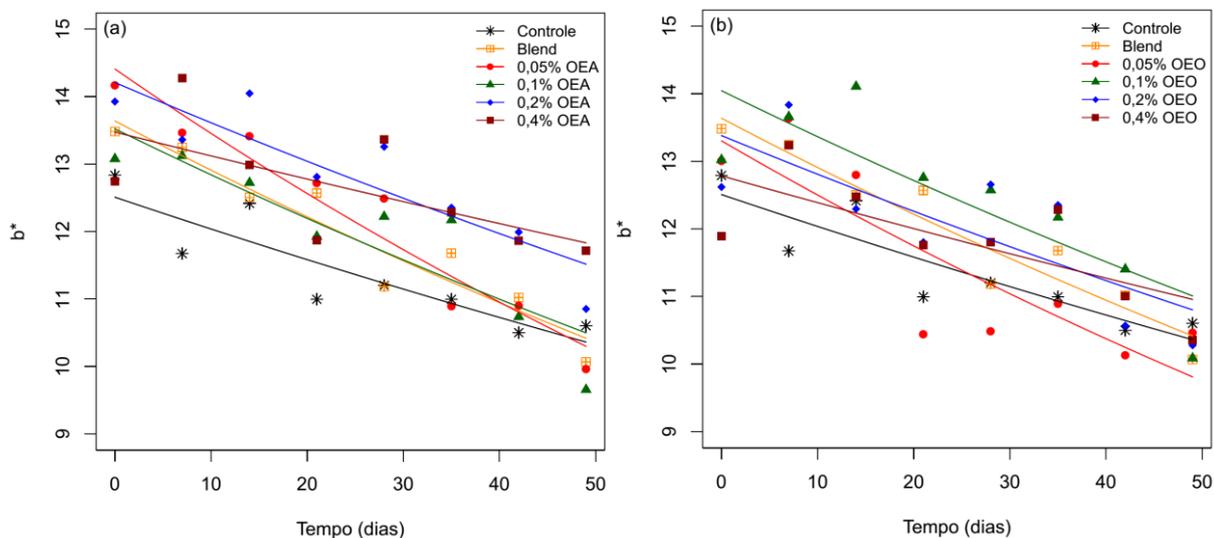
Essas diminuições de a^* representam a perda de vermelhidão na cor da carne (vermelha) para uma transição de sua cor para um vermelho escurecido pela formação de metamioglobina. Estes resultados concordam com os estudos de Esmer et al. (2011), Lorenzo e Gomez (2012) e Sirocchi et al. (2017) que relataram diminuições do valor de a^* e atribuíram

isso à formação de metamioglobina, que provoca o escurecimento da carne ao decorrer do armazenamento.

Com relação ao amarelecimento, conforme mostram as Figuras 24 e 25, menores concentrações de OEO estabilizaram b^* mais efetivamente que o OEA, mas o oposto foi observado para maiores concentrações de óleo.

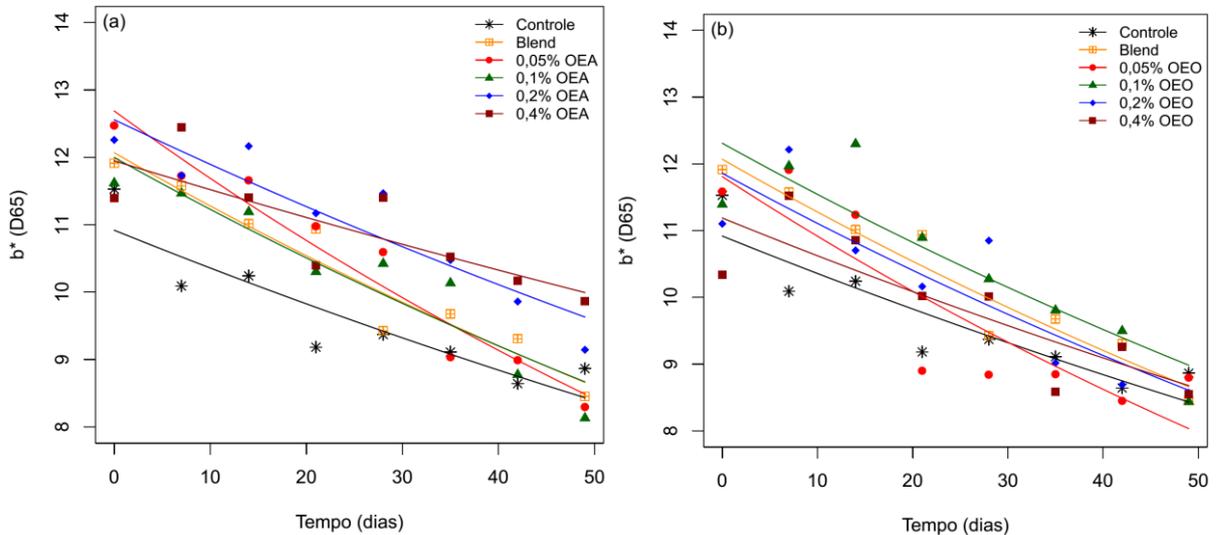
Estes resultados foram coerentes com os obtidos para produtos cárneos tratados com OE em um período de armazenamento de 5 a 7 dias conforme Kahraman et al. (2015) e Zhang, Wu e Guo (2016). No que diz respeito ao parâmetro b^* , o OEO foi mais efetivo em todas as concentrações. A atividade antioxidante dos óleos essenciais pode gerar uma estabilidade na coloração devido à sua capacidade antioxidante de ser capaz de sequestrar os radicais livres e inibir as enzimas hidrolíticas e oxidativas que causam oxidação da carne (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008; TAJKARIMI, IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Figura 24 – Variação do parâmetro b^* das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, *blend* e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

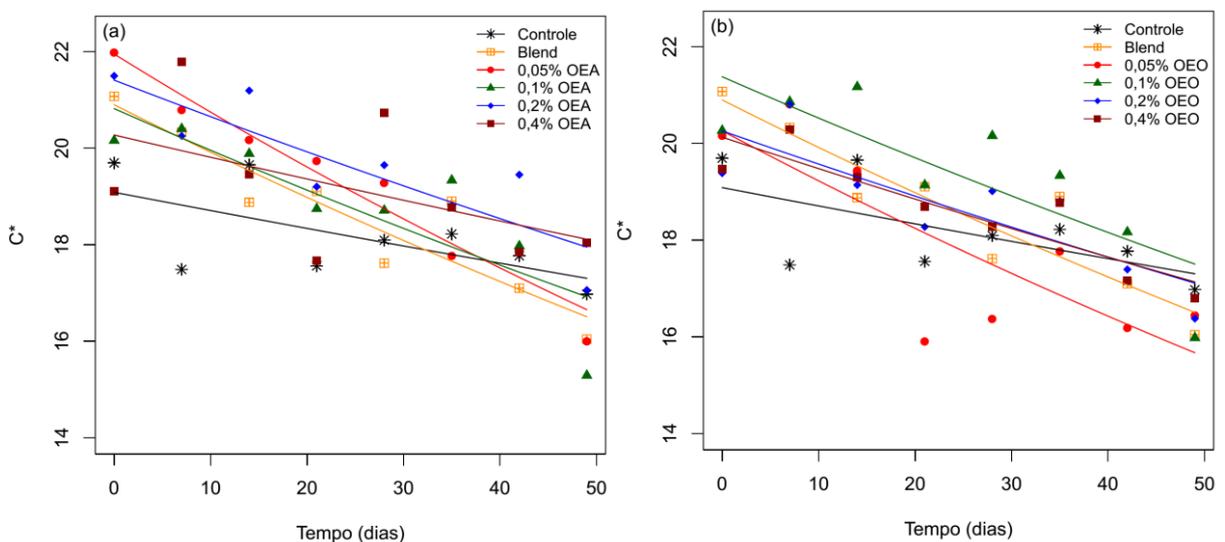
Figura 25 – Variação do parâmetro b^* (iluminante D65) das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, *blend* e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

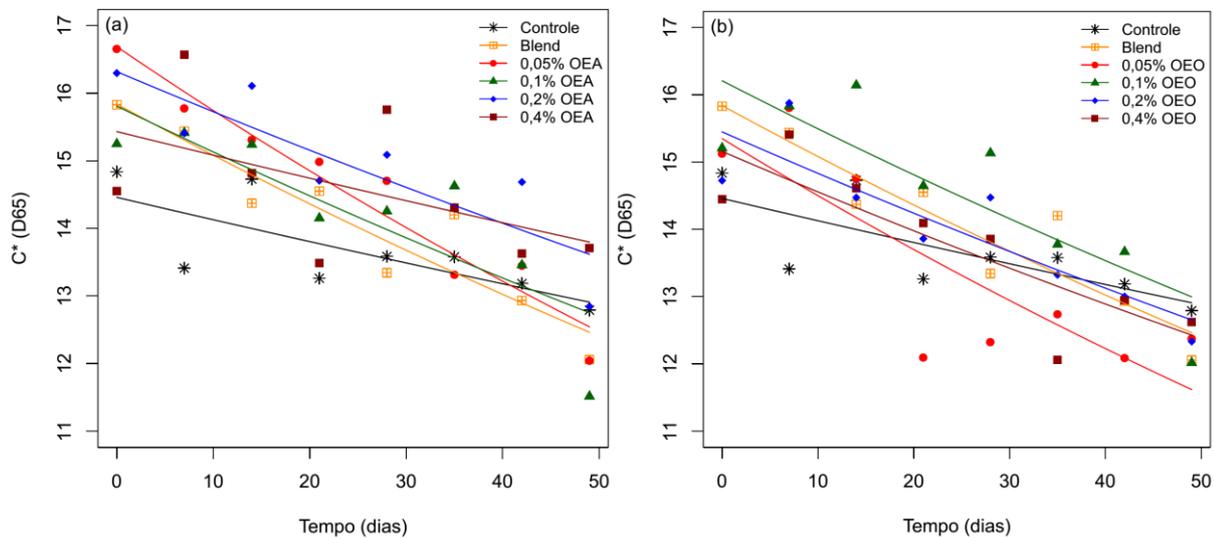
Conforme Kahraman et al. (2015), um bom indicador de *blooming* (quando o oxigênio é absorvido pela carne para formar oximioglobina, pigmento caracteristicamente vermelho que faz com que a carne passe da cor púrpura para a cor adequada de vermelho) é o croma (C^*).

Figura 26 – Variação do parâmetro C^* das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, *blend* e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Figura 27 – Variação do parâmetro C^* (iluminante D65) das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, *blend* e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).

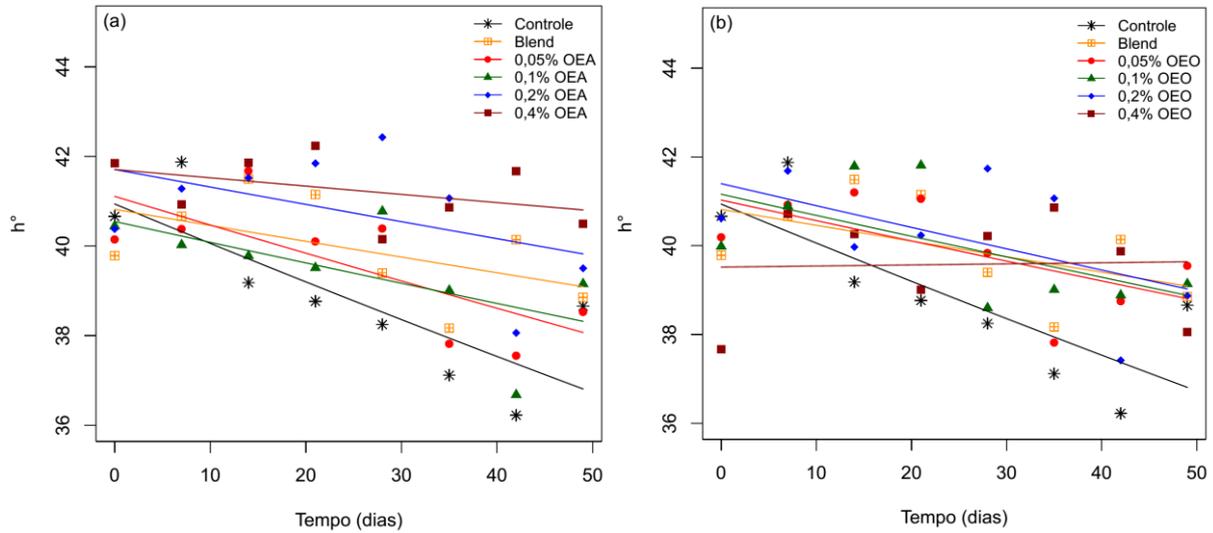


Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Este parâmetro é utilizado para indicar a saturação da cor, por vezes denominada cor viva da carne. Visualiza-se nas Figuras 26 e 27, que os valores de C^* diminuíram ao decorrer do armazenamento em todas as amostras de linguça Toscana. Este comportamento se deve ao fato de C^* representar a soma de suas cores de a^* e b^* e ambos perfis de coloração decaíram ao decorrer do armazenamento da linguça Toscana. Araújo et al. (2018) obtiveram resultados semelhantes para C^* em linguça frescal adicionada de combinações de óleo essencial de alho e nisina. De acordo com Lorenzo et al. (2017), a oxidação também pode afetar negativamente a aparência do produto oxidando a mioglobina em oximioglobina e metamioglobina e produzindo assim pigmentos marrons, ocasionando a redução dos valores de a^* e b^* e consequentemente alterando C^* .

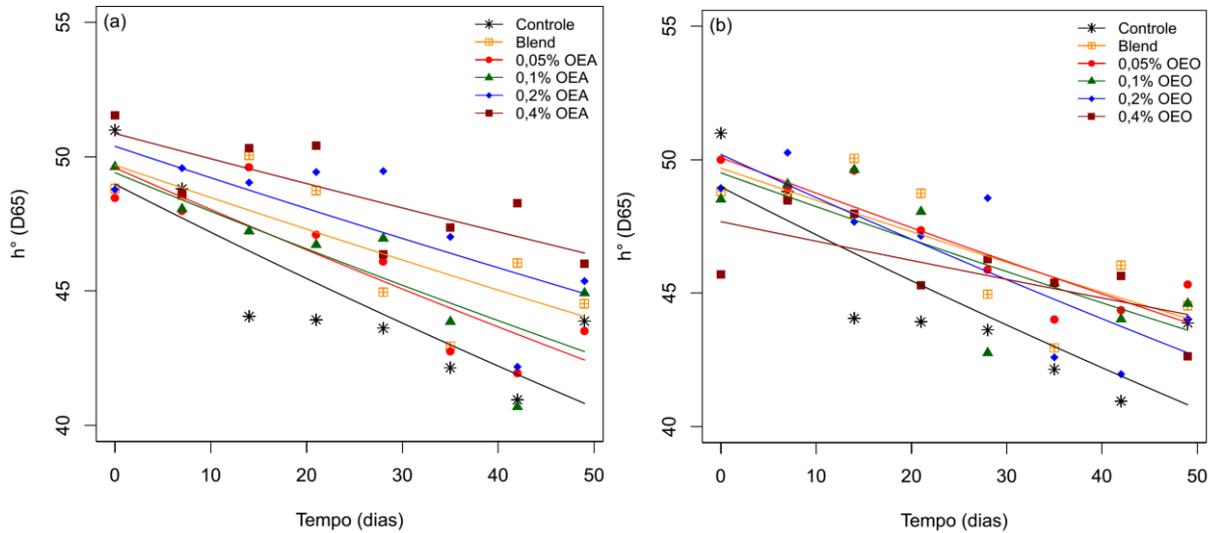
O ângulo de matiz (h°) é o desenvolvimento da cor de vermelho para amarelo. Conforme pode ser observado nas Figuras 28 e 29, ângulos maiores no final do armazenamento para ambos os tratamentos com *blend*, OEA (a) e OEO (b), indicaram um produto mais vermelho e menos amarelo como já era esperado.

Figura 28 – Variação de h° das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, *blend* e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Figura 29 – Variação de h° (iluminante D65), das linguças Toscanas embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C das amostras controle, *blend* e adicionado de diferentes concentrações de OEA (a) e OEO (b).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

De fato, uma diminuição significativa dos valores dos parâmetros a^* e b^* poderia provocar na carne uma aparência mais marrom. Entretanto, as análises dos valores de coloração mostraram que as linguças Toscanas geralmente eram menos leves (menor L^*), menos vermelhas (menor a^*) e menos amarelas (menor b^*) à medida que o tempo de

armazenamento aumentava para as amostras tratadas com *blend*, OEA e OEO, com relação à amostra controle. Isto mostra que as modificações nos parâmetros de coloração da carne no presente estudo foram significativamente afetadas pelo uso do *blend* e diferentes concentrações de OEA e OEO.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram a eficiência da adição dos óleos essenciais de alecrim e orégano para prolongar a vida útil da linguiça Toscana embalada a vácuo. Ambos os óleos essenciais de alecrim e orégano exerceram efeito inibitório no crescimento das bactérias ácido-lácticas da linguiça Toscana durante o armazenamento, proporcionando a extensão da vida de prateleira em relação à amostra não tratada, dependendo da concentração de óleo essencial empregada.

Além disso, os modelos primários de crescimento bacteriano de BAR, HUG e ROB podem ser utilizados no ajuste dos parâmetros cinéticos de crescimento da flora natural de bactérias ácido-lácticas em linguiça Toscana. Dentre estes, o modelo de BAR apresentou melhor capacidade preditiva para o crescimento das BAL.

Com relação ao crescimento das BAL e variação do pH, foi possível estimar a vida útil das linguiças Toscanas, fixando-se limites aceitáveis de qualidade e através da obtenção de equações empíricas, podem ser úteis para predição da vida útil nas condições estudadas.

Com base nos resultados das análises físico-químicas, verificou-se que o uso de OEA e OEO, influenciou positivamente os parâmetros de coloração e proporcionaram uma maior estabilização do pH, no período de armazenamento. Porém, como já era esperado a atividade de água da linguiça Toscana não variou significativamente ao decorrer do armazenamento.

Os resultados obtidos levam à conclusão, que a utilização de baixas concentrações de *blend*, OEA e OEO, são úteis como antimicrobianos naturais para aplicações práticas em indústria de produtos cárneos, para prolongar a vida de prateleira e estabilizar parâmetros de qualidade da linguiça Toscana. O fato de que todos os tratamentos com óleos essenciais reduziram o crescimento das BAL, mostraram seu alto potencial de preservação na linguiça Toscana.

7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS:

Como pesquisas futuras, sugere-se:

- Avaliação de diferentes níveis de gordura suína e o efeito da redução de sal, nitrito e nitrato de sódio no efeito inibitório no crescimento das bactérias deteriorantes e patogênicas inoculadas ou não, em linguiça Toscana durante o armazenamento;
- Verificar diferentes óleos essenciais e suas combinações como antimicrobianos naturais, frente a bactérias patogênicas na linguiça Toscana em diferentes condições de embalagens para prolongar a vida útil;
- Avaliar o efeito da microencapsulação por *spray-drying* de diferentes óleos essenciais sobre parâmetros físico-químicos, oxidativas, sensoriais e de qualidade da linguiça Toscana;
- Aplicar análise sensorial para avaliar a aceitação de diferentes concentrações de óleos essenciais por parte do consumidor.
- Avaliar os efeitos da adição dos OEA e OEO sobre a estabilidade química e oxidativa na linguiça Toscana.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. Microbiologia de los Alimentos. Zaragoza: Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 427-435, 1997.
- AGUIRRE, A.; BORNEO, R.; LEÓN, A. E. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. **Food Bioscience**, v. 1, p. 2–9, 2013.
- AHMAD, S.; BAHER AMER. Sensory quality of fermented sausages as influenced by different combined cultures of lactic acid bacteria fermentation during refrigerated storage. **Food Processing & Technology**, v. 4, p. 1-8, 2013.
- AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19, p. 716–723, 1974.
- ALAVI, S. H.; PURI, V. M.; KNABEL, S. J.; MOHTAR, R. H.; WHITING, R. C. Development and validation of a dynamic growth model for *Listeria monocytogenes* in fluid whole milk. **Journal Food Protection**, v. 62, p. 170–176, 1999.
- AL-SEREITIA, M. R.; ABU-AMERB, K. M.; SENA, P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 37, p. 124–131, 1999.
- AMARIEL, S.; POROCH-SERIȚAN, M.; GUTT, G.; OROIAN, M.; CIORNE, E. Rosemary, thyme and oregano essential oils influence on physicochemical properties and microbiological stability of minced meat. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 6, p. 670–676, 2016.
- ARAÚJO, M. K.; GUMIELA, A. M.; BORDIN, K.; LUCIANO, F. B., ERNLUND, R.; MACEDO, F. DE. Combination of garlic essential oil, allyl isothiocyanate, and nisin Z as bio-preservatives in fresh sausage. **Meat Science**, v. 143, p. 177–183, 2018.
- Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína – ABIPECS. **Entrevista, Conquistas da carne suína brasileira e produção de suínos (2014)**. Disponível em < http://abpa-br.com.br/entrevista_conquistas_da_carne_suína >. Acesso em: 12 set. 2018.
- ATTI-SANTOS, A. C.; ROSSATO, M.; PAULETTI, G. F.; ROTA, L. D.; RECH, J. C.; PANSEIRA, M. R.; AGOSTINI, F.; SERAFINI, L. A.; MOYANA, P. Physicochemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 1035–1039, 2005.
- AUDENAERT, K.; D'HAENE, K.; MESSENS, K.; RUYSSSEN, T.; VANDAMME, P.; HUYS, G. 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, p. 12-18, 2010.

- BAJALAN, I.; ROUZBAHANI, R.; PIRBALOUTI, A. G.; MAGGI, F. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 305–311, 2017.
- 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, p. 722-734, 2012.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food Chemical Toxicological**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BALEY, J. W. **Encyclopaedia of Labelling Meat and Poultry Products**. St. Louis: Freezing Provisioning, 1970.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 277-294, 1994.
- BARANYI, J.; ROBINSON, T.; KALOTI, A.; MACKEY, B. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, p. 61–75, 1995.
- BARBOSA, L. N.; PROBST, I. S.; MURBACH TELES ANDRADE, B. F.; BÉRGAMO ALVES, F. C.; ALBANO, M., MORES RALL, V. L.; JÚNIOR, A. F. Essential Oils from Herbs against Foodborne Pathogens in Chicken Sausage. **Journal of Oleo Science**, v. 64, p. 117–124, 2015.
- BEKHIT, E. A.; A.; MORTON, J. D.; BHAT, Z. F.; KONG, L. Meat Color: Factors Affecting Color Stability. **Reference Module in Food Science**, v. 1, p. 1–10, 2018.
- BENDAHO, M.; MUSELLI, A.; GRIGNON-DUBOIS, M.; BENYOUCEF, M.; DESJOBERT, J. M.; BERNARDINI, A. F.; COSTA, J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. **Food Chemistry**, v. 106, p. 132-139, 2008.
- BINGOL, E. B.; ERGUN, O. Effects of modified atmosphere packaging (MAP) on the microbiological quality and shelf life of ostrich meat. **Meat Science**, v. 88, p. 774–785, 2011.
- BORCH, E.; KANT-MADMANSB, M. L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 103-120, 1996.
- BORDAS, A.; BERMEJO, E. Essential oils: A fresh look at the oldest known remedy and beauty booster. **ISO Focus+**, v.6, p.12–13, 2012.
- BOTSOGLU, N. A.; GOVARIS, A.; BOTSOGLU, E. N.; GRIGOROPOULOU, S.; PAPAGEORGIOU, G. Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation in long-term frozen stored turkey meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2930–2936, 2003.

BOVILL, R.; BEW, J., COOK, N.; D'AGOSTINO, M.; WILKINSON, N.; BARANYI, J. Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. **International Journal Food Microbiology**, v. 59, p. 157–165, 2000.

BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I.; JOVIN, E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L.) essential oils. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 55, p. 7879–7885, 2007.

BOZKURT, H. Utilization of natural antioxidants: Green tea extract and *Thymbra spicata* oil in Turkish dry-fermented sausage. **Meat Science**, v. 73, p. 442–450, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **RDC N°2, de 15 de janeiro de 2007**. Regulamento técnico sobre aditivos e aromatizantes. Brasília, Distrito Federal, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **RDC N° 12 de 02 de janeiro de 2001**. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, Distrito Federal, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa DAS-33 de 5 setembro de 2017**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiças. Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Brasília, 05 set. 2017, anexo III, 2017.

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

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

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

CASABURI, A.; NASI, A.; FERROCINO, I.; DI MONACO, R.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F.; ERCOLINI, D. Spoilage-related activity of *Carnobacterium maltaromaticum* strains in air-stored and vacuum-packed meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 7382–7393, 2011.

CAYRÉ, M. E.; GARRO, O.; VIGNOLO, G. Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsions. **Food Microbiology**, v. 22, p. 505–512, 2005.

CHEMAT, F.; BOUTEKEDJIRET, C. **Extraction: Steam Distillation**. In Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, 2015.

CHEUNG, S.; TAI, J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. **Oncology Reports**, v. 17, p. 1525–1531, 2007.

CHRISTOV, S. G. Theory of Proton-Transfer Reactions in Solution. **Chemical Physics**, v. 168, p. 327–339, 1991

CIE. **International commission on illumination, colorimetry: Official recommendation of the international commission on illumination**. Publication CIE. Paris, France: Bureau Central de la CIE, 1976.

COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.; COMI, G. The rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacterial population dynamics during food fermentations. **Food Microbiology**, v. 21, p. 481–487, 2004.

COOK, C. M.; LANARAS, T. **Essential Oils: Isolation, Production and Uses**. Elsevier Ltda, 2015.

CRIST, C. A.; WILLIAMS, J. B.; SCHILLING, M. W.; HOOD, A. F.; SMITH, B. S.; CAMPANO, S. G. Impact of sodium lactate and vinegar derivatives on the quality of fresh Italian pork sausage. **Meat Science**, v. 96, p. 1509–1516, 2014.

DALCANTON, F.; PEREZ-RODRIGUEZ, F.; POSADA-IZQUIERDO, G. D.; ARAGÃO, G. M. F.; GARCÍA-GIMENO, R. M. Modelling growth of *Lactobacillus plantarum* and shelf-life of vacuum-packaged cooked chopped pork at different temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 48, p. 2580-2587, 2013.

DAVE, D.; GHALY, A. E. Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 6, p. 486-510, 2011.

DE LAMBALLERIE-ANTON, M.; TAYLOR, R. G.; CULIOLI, J. High pressure processing of meat. **Meat processing: Improving quality**, v. 1, p. 313-324, 2002.

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

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

DIEZ A. M.; E. M. SANTOS E. M.; JAIME I.; ROVIRA J. Application of organic acid salts and high-pressure treatments to improve the preservation of blood sausage. **Food Microbiology**, v. 25, p. 154–161, 2009.

DIMA, C.; DIMA, S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. **Current Opinion Food Science**, v. 5, p. 29–35, 2015.

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

DUSSAULT, D.; VU, K. D.; LACROIX, M. In vitro evaluation of antimicrobial activities of

various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. **Meat Science**, v. 96, p. 514–520, 2014.

DZUDIE, T.; KOUEBOU, C. P.; ESSIA-NGANG, J. J.; MBOFUNG, C. M. F. Lipid sources and essential oils effects on quality and stability of beef patties. **Journal of Food Engineering**, v. 65, p. 67–72, 2004.

EL-ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E. H. A.; CASABIANCA, H.; EL MOUSADIK, A.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International Journal Pharmaceutical**, v. 483, p. 220–243, 2015.

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

ESMER, O. K.; IRKIN, R.; DEGIRMENCIOGLU, N.; DEGIRMENCIOGLU, A. The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. **Meat Science**, v. 88, p. 221–226, 2011.

ESTÉVEZ, M.; RAMÍREZ, R.; VENTANAS, S.; CAVA, R. Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté. **Food Science Technology**, v. 40, p. 58–65, 2007.

EXARCHOU, V.; NENADIS, N.; TSIMIDOU, M.; GEROTHANASSIS, I. P.; TROGANIS, A.; BOSKOU, D. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 5294–5299, 2002.

FAO. **How to feed the world in 2050**. Population and Development Review, v. 35, 2009. Disponível em: <

http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050 >. Acesso em 3 setembro 2018.

FASOLATO, L.; CARRARO, L.; FACCO, P.; CARDAZZO, B.; BALZAN, S.; TATICCHI, A.; NOVELLI, E. Agricultural by-products with bioactive effects: A multivariate approach to evaluate microbial and physicochemical changes in a fresh pork sausage enriched with phenolic compounds from olive vegetation water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 228, p. 34–43, 2016.

FAUSTMAN, C. **Food from supplement-fed animals**. Technology of reduced-additive foods. London, UK: Blackie Publishing, p.160–194, 1993.

FDA. **Food and drug administration (FDA)**. Code of federal regulations (CFR). Title 21: Food and drugs. Chapter I e Food and drug administration, department of health and human services (Continued), subchapter B, e Food for human consumption, Part 182 e Substances generally recognized as safe (GRAS), subpart a e General provisions, subpart 182.10 e Spices and other natural seasonings and flavorings. Washington, DC: Office of the Federal Register,

2014.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1343-1349, 2009.

FRANCO, B. D. G.; DE MELLO, LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, Editora Atheneu São Paulo, 1996.

FRATIANNI, F.; MARTINO, L. D.; MELONE, A.; FEO, V. D.; COPPOLA, R.; NAZZARO, F. Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 528-535, 2010.

GALVAN, A. P.; ROSA, G.; BACK, J.; LIMA, D. P.; CORSO, M.P. Avaliação sensorial de linguiça tipo Toscana com teor reduzido de gordura e adição de pectina e inulina. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 3, p. 383–398, 2011.

GEITENES, S.; OLIVEIRA, M.F.B.; KALSCHNE, D.L.; SARMENTO, C.M.P. Modelagem do crescimento de bactérias lácticas e análise microbiológica em apresuntado e presunto cozido fatiados e embalados à vácuo. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 15, p. 113-133, 2013.

GEORGANTELIS, D.; AMBROSIADIS, I.; KATIKOU, P.; BLEKAS, G.; GEORGAKIS, S. A. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. **Meat Science**, v. 76, p. 172-181, 2007.

GOULD, G. W. **Mechanisms of action of food preservation procedures**. London, United Kingdom: Elsevier Applied Sci. p. 448, 1989.

GOVARIS, A.; SOLOMAKOS, N.; PEXARA, A.; CHATZOPOULOU, P. S. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 175–180, 2010.

GRIMSRUD, P. A.; XIE, H.; GRIFFIN, T. J.; BERNLOHR, D. A. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 21837–21841, 2008.

GUERRERO, I.; CHABELA, L. Problems caused by bacteria. **Encyclopedia of food microbiology**, v. 2. p. 1266-1272, 2000.

GUINOISEAU, E.; LUCIANI, A.; ROSSI, P. G.; QUILICHINI, Y.; TERNENGO, S.; BRADESI, P. Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, p. 873-879, 2010.

HERRERA, J. Flower size variation in *Rosmarinus officinalis* individuals populations and

habitats. **Annals Botany**, v. 95, p. 431–437, 2005.

HOLZAPFEL, W.H; HABERER P; GEISEN R; BJÖRKROTH J; SCHILLINGER U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 365S-373, 2001.

HOOGENKAMP, H.W. **Soy Protein and Meat Formulations**. St. Louis: Protein Technologies International, 2001.

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

HUANG, L. Estimation of growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef under fluctuating temperature conditions. **Food Microbiology**. v. 20, p. 549–559, 2003.

HUANG, L. Optimization of a new mathematical model for bacterial growth. **Food Control**, v. 32, p. 283-388, 2013.

HUGO, C. J.; HUGO, A. Current trends in natural preservatives for fresh sausage products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 45, p. 12–23, 2015.

HUIS IN' T VELD, J. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 1–18, 1996.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; CHATHA, S. A. S., JABBAR, A.; MAHBOOB, S.; NIGAM, P.S. Essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1070–1107, 2010.

HYLDGAARD, M; MYGIND, T; MEYER, R. K. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–24, 2012.

ICMSF. **International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1986): Microorganisms in Foods**. Sampling for microbiological analysis principles and specific application. Blackwell Scientific Publications, v.2, 1986.

ISO/DIS9235. **Aromatic natural raw materials-vocabulary**. International Standard Organisation (ISO 9235:2013). p.9–10, 2013.

JANSSEN, M.; GEERAERD, A. H.; LOGIST, F.; DE VISSCHER, Y.; VEREECKEN, K. M.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F.; VAN IMPE, J. F. Modelling *Yersinia enterocolitica* inactivation in coculture experiments with *Lactobacillus sakei* as based on pH and lactic acid profiles. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 59–72, 2006.

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, p. 96–108, 2013.

JIANG, Y.; WU, N.; FU, Y.; WANG, W.; LUO, M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 2, p. 63–68, 2011.

JUNEJA, V. K.; BARI, M. L.; INATSU, Y.; KAWAMOTO, S.; FRIEDMAN, M. Thermal destruction of Escherichia coli O157:H7 in sous-vide cooked ground beef as affected by tea leaf and apple skin powders. **Journal Food Protection** v. 72 p. 860–865, 2009.

JUNEJA, V.; MARKS, H.; HUANG, L.; THIPPAREDDI, H. Predictive model for growth of Clostridium perfringens during cooling of cooked uncured meat and poultry. **Food Microbiology**, v. 28, p. 791–795, 2011.

KAHRAMAN, T.; ISSA, G.; BINGOL, E. B.; KAHRAMAN, B. B.; DUMEN, E. Effect of rosemary essential oil and modified-atmosphere packaging (MAP) on meat quality and survival of pathogens in poultry fillets. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 591–599, 2015.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, v.10, p.813–829, 2003.

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, p. 109–116, 2011.

KHAN, M.; KHAN, S. T.; KHAN, N. A.; MAHMOOD, A.; AL-KEDHAIRY, A. A.; ALKHATHLAN, H. Z. The composition of the essential oil and aqueous distillate of Origanum vulgare L. growing in Saudi Arabia and evaluation of their antibacterial activity. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 2, p. 1–13, 2018.

KHORSHIDIAN, N.; YOUSEFI, M.; KHANNIRI, E.; MORTAZAVIAN, A.M. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 23, p. 62–72, 2018.

KINSMAN, D. M.; KOTULA, A. W. AND BREIDENSTEIN, B. C. **Muscle Foods, Meat, Poultry and Seafood Technology**. New York: Chapman & Hall, 1994.

KOKKINI, S.; KAROUSOU, R.; DARDIOTI, A.; KRIGAS, N.; LANARAS, T. Autumn essential oils of Greek oregano. **Phytochemistry**, v. 44, p. 883–886, 1997.

KOUTSOUMANIS, K. P.; STAMATIOU, A. P.; DROSINOS, E. H.; NYCHAS, G. J. E. Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. **Food Microbiology**, v. 25, p. 915–921, 2008.

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

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p. 633–640, 2004.

KULKARNI, S.; DESANTOS, F. A.; KATTAMURI, S.; ROSSI, S. J.; BREWER, M. S. Effect of grape seed extract on oxidative, color and sensory stability of a pre-cooked, frozen, re-heated beef sausage model system. **Meat Science**, v. 88, p. 139–144, 2011.

LABADIE, J. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. **Meat Science**, v. 52, p. 299–305, 1999.

LEE, D.; HWANG, K.; AN, D.; PARK, J.; LEE, H. Model on the microbial quality change of seasoned soybean sprouts for on-line shelf-life prediction. **International Journal Food Microbiology**, v. 118, p. 285–293, 2007.

LEE, M.A.; CHOI, J.H.; CHOI, Y.S.; HAN, D.J.; KIM, H.Y.; SHIM, S. Y.; KIM, C.J. The antioxidative properties of mustard leaf (*Brassica juncea*) kimchi extracts on refrigerated raw ground pork meat against lipid oxidation. **Meat Science**, v. 84, p. 498–504, 2010.

LINARES, M.B.; BÓRNEZ, R.; VERGARA, H. Effect of stunning systems on meat quality of Manchego suckling lamb packed under modified atmospheres. **Meat Science**, v. 78, p. 279–287, 2008.

LIU, F.; YANG, R. Q.; LI, Y. F. Correlations between growth parameters of spoilage microorganisms and shelf-life of pork stored under air and modified atmosphere at 2, 4 and 10 °C. **Food Microbiology**, v. 23, p. 578-581, 2006.

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

LORENZO, J. M.; MUNEKATA, P. E. S, BALDIN, J. C.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, R.; TRINDADE, M. A. The use of natural antioxidants to replace chemical antioxidants in foods. **Strategies for Obtaining Healthier Foods**, v. 1, p. 205-227, 2017.

LORENZO, J.M.; GÓMEZ, M. Shelf life of fresh foal meat under MAP, overwrap and vacuum packaging conditions. **Meat Science**, v. 92, p. 610–618, 2012.

LUKAS, B.; SCHMIDERER, C.; NOVAK, J. Phytochemistry essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). **Phytochemistry**, v. 119, p. 32–40, 2015.

LYHS, U. **Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products**. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finlândia, 2002.

MAFART, P. Food engineering and predictive to combine biological microbiology: on the necessity and physical kinetics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, p. 239-251, 2005.

MAFART, P.; COUVERT, O.; GAILLARD, S.; LEGUERINEL, I. On calculating sterility in thermal preservation methods: Application of the Weibull frequency distribution model. **Acta Horticulturae**, v. 566, p. 107–114, 2002.

MASSAGUER, P.R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Varela, p.258, 2006.

MATARAGAS, M.; SKANDAMIS, P. N.; DROSINOS, E. H. Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. **International Journal Food Microbiology**, v. 126, p. 1–12, 2008.

MCMEEKIN, T. A.; BROWN, J.; KRIST, K.; MILES, D.; NEUMEYER, K.; NICHOLS, D.S.; OLLEY, J.; PRESSER, K.; RATKOWSKY, T. D. A.; ROSS, M. S.; SOONTRANON, S. Quantitative Microbiology: A Basis for Food Safety. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 3, p. 1-4, 1997.

MCMEEKIN, T. A.; MELLEFONT, L. A.; ROSS, T. **Predictive microbiology: past, present and future**. Modelling Microorganisms in Food. CRC Press, Boca Raton Boston New York Washington, DC, p. 7–21, 2007.

MECHERGUI, K.; JAOUADI, W.; COELHO, J. P.; LARBI, M. Effect of harvest year on production, chemical composition and antioxidant activities of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* subsp *glandulosum* (Desf.) Ietswaart) growing in North Africa. **Industrial Crops & Products**, v. 90, p. 32–37, 2016.

MENEZES, N. M. C., MARTINS, W. F., LONGHI, D. A., DE ARAGÃO, G. M. F. Modeling the effect of oregano essential oil on shelf-life extension of vacuum-packed cooked sliced ham. **Meat Science**, v. 139, p. 113–119, 2018.

METAXOPOULOS, J.; MATARAGAS, M.; DROSINOS, E. H. Microbial interaction in cooked cured meat products under vacuum or modified atmosphere at 4°C. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 363–373, 2002.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidante effect of glycosidicallybound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). **Food Chemistry**, v. 71, p. 79-83, 2000.

MONTEIRO, G.M.; SOUZA, X.R.; COSTA, D.P.B.; FARIA, P.B., VICENTE, J. Partial substitution of pork fat with canola oil in Toscana sausage. **Innovative Food Science and**

Emerging Technologies, v. 44, p. 2–8, 2017.

MORSY, M. K.; KHALAF, H. H.; SHAROBA, A. M.; EL-TANAHI, H. H.; CUTTER, C. N. Incorporation of essential oils and nanoparticles in pullulan films to control foodborne pathogens on meat and poultry products. **Journal of Food Science**, v. 79, p. 675-684, 2014.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, p.1451–1474, 2013.

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

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

OCKERMAN, H. W.; BASU, L. Fresh. **Encyclopedia of Meat Sciences**, v. 3, p. 261–266, 2014.

OJEDA-SANA, A. M.; VAN BAREN, C. M.; ELECHOSA, M. A.; JUAREZ, M. A.; MORENO, S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. **Food Control**, v. 31, p. 189-195, 2013.

OUATTARA, B.; SIMARD, R. E.; HOLLEY, R. A.; PIETTE, G. J. P.; BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 155-162, 1997.

OZKAN, G.; SAGDIC, O.; OZCAN, M. Inhibition of pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations. **Food Science and Technology International**, v. 9, p. 85–88, 2003.

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

PAPARELLA, A.; MAZZARRINO, G.; CHAVES-LÓPEZ, C.; ROSSI, C.; SACCHETTI, G.; GUERRIERI, O.; SERIO, A. Chitosan boosts the antimicrobial activity of *Origanum vulgare* essential oil in modified atmosphere packaged pork. **Food Microbiology**, v. 59, p. 23–31, 2016.

PARDI, M.C. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Tecnologia da sua obtenção e transformação. Goiânia, v.1, 1993.

PAVELKOVÁ, A.; KAČÁNIOVÁ, M.; HORSKÁ, E.; ROVNÁ, K.; HLEBA, L.; PETROVÁ, J. The effect of vacuum packaging, EDTA, oregano and thyme oils on the microbiological quality of chicken's breast. **Anaerobe**, v. 29, p.128–133, 2014.

PEARSON, A. M.; GILLET, T. A. **Processed meats**. New York: Chapman & Hall, p. 448,

1996.

PELEG, M., CORRADINI, M.G. Microbial growth curves: what the models tell us and what they cannot. **Critical Reviews Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 917–945, 2011.

PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Overview of meat products as functional foods. Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. **Food Research International**, v. 32, p. 599–607, 2008.

PETROVÁ, J.; PAVELKOVÁ, A.; HLEBA, L.; POCHOP, J.; ROVNÁ, K.; KAČÁNIOVÁ, M. Microbiological quality of fresh chicken breast meat after rosemary essential oil treatment and vacuum packaging. **Animal Science and Biotechnologies**, v. 46, p. 140–144, 2013.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **Ciencia de la Carne y los Productos Carnicos**. Zaragoza (España): Acribia, v. 2 p. 592, 1994.

RAHMATI, S.; JULKAPLI, N. M.; YEHYE, W. A.; BASIRUN, W. J. Identification of meat origin in food products - A review. **Food Control**, v. 68, p. 379–390, 2016.

RAJU, C. V.; SHAMASUNDAR, B. A.; UDUPA, K. S. The use of and refrigerated (6° 2 °C) temperatures. International Journal of nisin as a preservative in fish sausage stored at ambient (28° 2 °C) **Food Science and Technology**, v. 38, p. 171-185, 2003.

REALINI, C. E.; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat Science**, v. 98, p. 404–419, 2014.

REGLERO, G.; FRIAL, P.; CIFUENTES, A.; GARCIA-RISCO, M.R.; JAIME, L.; MARÍN, F. R. Meat-based functional foods for dietary equilibrium omega-6/omega-3. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, p. 1153–1161, 2008.

REZA, M.; ALIREZA, S.; NAZERI, V.; MAGGI, F.; CRAKER, L. Essential oil profile of oregano (*Origanum vulgare* L.) populations grown under similar soil and climate conditions. **Industrial Crops & Products**, v. 119, p. 183–190, 2018.

RIBEIRO-SANTOS, R.; CARVALHO-COSTA, D.; CAVALEIRO, C.; COSTA, H. S.; ALBUQUERQUE, T. G.; CASTILHO, M. C.; SANCHES-SILVA, A. A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Trends in Food Science and Technology**, v. 45, p. 355–368, 2015.

ROBAZZA, S.; TELEKEN, J.T.; GALVÃO, A.C.; MIORELLI, S.; STOLF, D.O. Application of a Model Based on the Central Limit Theorem to Predict Growth of *Pseudomonas* spp. in Fish Meat. **Food Bioprocess Technology**, v. 10, p. 1685–1694, 2017.

ROMANS, J. R.; WILLIAM, J. C.; CARLOSON, C. W.; GREASER, M. L.; JONES, K. W. **The meat we eat**. Danville: Interstate Publishers Inc, v.4, 2001

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology.

Journal of Applied Bacteriology, v. 81, p. 501-508, 1996.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A.; BARANYI, J. Predictive microbiology and food safety. **Encyclopedia of Food Microbiology**, v. 3, p. 1699-1710, 2000.

RUIZ-CAPILLAS, C.; CARBALLO, J.; COLMENERO, F. J. Biogenic amines in pressurized vacuum-packaged cooked sliced ham under different chilled storage conditions. **Meat Science**, v. 75, p. 397-405, 2007.

RUSSELL, S. M.; FLETCHER, D. L.; COX, N. A. Spoilage bacteria of fresh broiler chicken carcasses. **Poultry Science**, v. 75, p. 2041-2047, 1996.

RUST, R. E. **Productos embutidos**. Ciencia de la carne y de los productos carnicos. Zaragoza: Editorial Acribia. v. 13, p. 415- 439, 1994.

SALLAM, K. I.; SAMEJIMA, K. Effects of trisodium phosphate and sodium chloride dipping on the microbial quality and shelf life of refrigerated tray-packaged chicken breasts. **Food Science Biotechnology**, v. 13, p. 45–429, 2004.

SCHWARZ, G. Estimating the dimensional of a model. **Analysis of Statistics**, v. 6, p. 461-464, 1988.

SELIM, S. Antimicrobial activity of essential oils against vancomycin-resistant Enterococci (VRE) and Escherichia coli O157:H7 in feta soft cheese and minced beef meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 187–196, 2011.

SEOW, Y. X.; YEO, C. R.; CHUNG, H. L.; YUK, H. -G. Plant essential oils as active antimicrobial agents. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 54, p. 625–644, 2014.

SHARMA, H.; MENDIRATTA, S. K.; AGRAWAL, R. K.; GURUNATHAN, K.; KUMAR, S.; SINGH, T. P. Use of various essential oils as bio preservatives and their effect on the quality of vacuum packaged fresh chicken sausages under frozen conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 118–127, 2017.

SILVA, B. N.; ANGELO, D.; FIGUEIREDO, W.; BORGES, J.; MARIA, G.; ARAGÃO, F. DE.; CARCIO, M. 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.

SILVEIRA, S. M.; LUCIANO, F. B.; FRONZA, N.; CUNHA, A.; SCHEUERMANN, G. N.; VIEIRA, C. R. W. Chemical composition and antibacterial activity of Laurus nobilis essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7°C. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 86–93, 2014.

SIROCCHI, V.; CAPRIOLI, G.; CECCHINI, C.; COMAN, M. M.; CRESCI, A.; MAGGI, F.; SAGRATINI, G. Biogenic amines as freshness index of meat wrapped in a new active packaging system formulated with essential oils of Rosmarinus officinalis. *International*

Journal of Food Sciences and Nutrition, v. 64, p. 921–928, 2013.

SIROCCHI, V.; DEVLIEGHERE, F.; PEELMAN, N.; SAGRATINI, G.; MAGGI, F.; VITTORI, S.; RAGAERT, P. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil combined with different packaging conditions to extend the shelf life of refrigerated beef meat. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1069–1076, 2017.

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

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

ŠOJIC, B.; PAVLI, B.; ZEKOVI, Z.; TOMOVI, V.; IKONI, P.; NATALIJA, D. The effect of essential oil and extract from sage (*Salvia officinalis* L.) herbal dust (food industry by-product) on the oxidative and microbiological stability of fresh pork sausages. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, p. 749–755, 2018.

SOLOMAKOS, N., GOVARIS, A., KOIDIS, P., BOTSOGLOU, N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 80, p. 159-166, 2008.

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

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, p. 1199–1218, 2010.

TAUXE, R. V.; DOYLE, M. P.; KUCHENMULLER, T.; SCHLUNDT, J.; STEIN, C. E. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 16-28, 2010.

TELEKEN, J. T.; GALVÃO, A. C.; ROBAZZA, W. S. Use of modified Richards model to predict isothermal and non-isothermal microbial growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.49, p. 614–620, 2018.

TERRA N. N. **Apontamentos sobre tecnologia de carnes**. São Leopoldo: Unisinos, v.1, p.216, 1998.

TERRA N. N.; BRUM M. A. R. **Carne e seus derivados**. Técnicas de controle de qualidade. São Paulo: Nobel, v.1, p.119, 1988.

TERRA N. N.; TERRA A. B. M.; TERRA L. M. **Defeitos nos produtos cárneos: origens e**

soluções. São Paulo: Varela, 2001. p. 36 – 81.

TISSERAND, R.; YOUNG, R. **Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals.** Elsevier Health Sciences, 2013.

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

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus* the phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1561–1568, 2002.

USDA-FSIS. Sausages and food safety, 2014. Disponível em: < <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/foodsafety-fact-sheets/meat-preparation/sausages-and-food-safety/c> >. Acessado em 03/09/18.

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

VAN BOEKEL, M.A. On the use of Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 139–159, 2002.

VAN IMPE, J. F.; POSCHET, F.; GEERAERD, A. H.; VERECKEN, K. M. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, p. 97–105, 2005.

VAN IMPE, J.; NICOLAI, B.; MARTENS, T.; DEBAERDEMAEKER, J.; VAN DE WALLE, J. Dynamic mathematical-model to predict microbial-growth and inactivation during food-processing. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2901–2909, 1992.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Meat and meat products technology, chemistry and microbiology. **Meat Science**, v. 43, p. 78-89, 1995.

VASILATOS, G. C.; SAVVAIDIS, I. N. Chitosan or rosemary oil treatments, singly or combined to increase turkey meat shelf-life. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, p. 54–58, 2013.

VASILOPOULOS, C.; DE MAERE, H.; DE MEY, E.; PAELINCK, H.; DE VUYST, L.; LEROY, F. Technology-induced selection towards the spoilage microbiota of artisan-type cooked ham packed under modified atmosphere. **Food Microbiology**, v. 27, p. 77-84, 2010.

VELUGOTI, P., BOHRA, L., JUNEJA, V., HUANG, L., WESSELING, A., SUBBIAH, J., THIPPAREDDI, H. Dynamic model for predicting growth of *Salmonella* spp. in ground

sterile pork. **Food Microbiology**, v. 28, p. 796–803, 2011.

VILELA, J., MARTINS, D., MONTEIRO-SILVA, F., GONZÁLEZ-AGUILAR, G., DE ALMEIDA, J. M.; SARAIVA, C. Antimicrobial effect of essential oils of *Laurus nobilis* L. and *Rosmarinus officinallis* L. on shelf-life of minced “Maronesa” beef stored under different packaging conditions. **Food Packaging and Shelf-life**, v. 8, p. 71–80, 2016.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. **Journal of Food Safety**, v. 27, p. 91–101, 2007.

WENJIAO, F.; YUNCHUAN, C.; JUNXIU, S.; YONGKUI, Z. Effects of tea polyphenol on quality and shelf life of pork sausages. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 191–195, 2014.

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

WÓJCIAK, K. M.; KARWOWSKA, M.; DOLATOWSKI, Z. J. Use of acid whey and mustard seed to replace nitrites during cooked sausage production. **Meat Science**, v. 96, p. 750–756, 2014.

XANTHIAKOS, K.; SIMOS, D., ANGELIDIS, A.; NYCHAS, G.; KOUTSOUMANIS, K. Dynamic modeling of *Listeria monocytogenes* growth in pasteurized milk. **Journal Applied Microbiology**, v. 100, p. 1289–1298, 2006.

YESIL-CELIKTAS, O.; SEVIMLI, C.; BEDIR, E.; VARDAR-SUKAN, F. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, p. 158–163, 2010.

ZHANG, J.; WANG, Y.; PAN, D. -D.; CAO, J.-X.; SHAO, X. -F.; CHEN, Y. -J.; OU, C. -R. Effect of black pepper essential oil on the quality of fresh pork during storage. **Meat Science**, v. 117, p. 130–136, 2016.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 5165-5170, 2001.

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

ZWIETERING, M.; DEWIT, J.; CUPPERS, H.; VANT RIET, K. Modeling of bacterial growth with shifts in temperature. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 204–213, 1994.