



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

**ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA APLICADA À ESTIMATIVA DA
VIDA DE PRATELEIRA DE SALSICHA**

MESTRANDA

Patrícia Moises Davila Battistella

ORIENTADORA

Prof.^a Cleide Rosana Vieira Batista, PhD.

**FLORIANÓPOLIS-SC
2008**

PATRÍCIA MOISES DAVILA BATTISTELLA

**ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA APLICADA À ESTIMATIVA DA
VIDA DE PRATELEIRA DE SALSICHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Cleide Rosana Vieira Batista, PhD.

**FLORIANÓPOLIS-SC
2008**

Página com dados da banca

Agradecimentos

A Deus pelo amor, equilíbrio, harmonia e determinação em minha caminhada.

À pessoa do Dr. Paulo Rogério Franchin, que não mediu esforços para que este trabalho se concretizasse.

Em especial ao meu marido, Itamar, pela paciência, compreensão e incentivo.

À Perdigão Agroindustrial S/A, principalmente para os integrantes da Garantia de Qualidade e Laboratório de Microbiologia pela oportunidade e pela confiança depositada em mim na realização do meu trabalho.

Aos professores: Cleide, Paulo, Dalton e Antônio Carlos, um sincero obrigado pela confiança, paciência e dedicação.

Aos colegas, família e amigos, meu sincero e eterno obrigado pela forma como acompanharam a minha evolução, pela experiência de vida transmitida com palavras e gestos, me incentivando e acreditando no meu potencial.

Battistella, P. M. D. Análise de Sobrevivência Aplicada à Estimativa da Vida de Prateleira de Salsichas. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

RESUMO

Este estudo teve por objetivo determinar a vida de prateleira de salsichas embaladas a vácuo estocadas a 2°C, 6,5°C, 15°C e 21°C, além de identificar as principais causas de deterioração e aplicar a ferramenta estatística de análise de sobrevivência para avaliação dos resultados. Primeiramente foi realizado um estudo preliminar, a fim de, averiguar quais parâmetros estavam envolvidos no processo de deterioração. Das análises realizadas, as análises de contagem total em placas, bactérias láticas e pH obtiveram alteração no decorrer da estocagem. O fim da vida de prateleira das salsichas foi determinada quando a contagem das bactérias láticas chegou a um nível de 10^7 ufc/g em conjunto com a formação de viscosidade, a qual prejudicou visivelmente sua aparência. A contaminação das salsichas pelas bactérias citadas se deu pela manipulação pós-tratamento térmico durante o processo de embalagem e pela capacidade termotolerante dessas bactérias. Após, amostras foram expostas às diferentes temperaturas e monitoradas a períodos de tempo pré-determinados. Os pacotes considerados impróprios para consumo de acordo com a avaliação microbiológica, combinada com a sensorial foram consideradas como “falha”, as amostras consideradas aptas foram denominadas como “censura”. Com auxílio da análise de sobrevivência foi possível estabelecer uma vida de prateleira de 43 dias com possibilidade de 95% dos pacotes estarem sem alterações para salsichas expostas a uma temperatura de 2°C, 21 dias com possibilidade de 91% dos pacotes estarem sem alterações à 6,5°C, 5 dias com possibilidade de 92% dos pacotes estarem sem alterações à 15°C e 2,6 dias com possibilidade de 92% dos pacotes estarem sem alterações à 21°C. Desta forma, conclui-se que as bactérias láticas foram as principais causas de deterioração de salsichas e que a análise de sobrevivência pode ser utilizada não somente para estudos clínicos, epidemiológicos, biológicos, sociológicos e em estudos de reabilitação e sim na avaliação de vida de prateleira de produtos alimentícios.

Palavras Chaves: Vida de Prateleira, Salsicha, Bactérias Láticas, Análise de Sobrevivência

ABSTRACT

This study had as an objective to determine the shelf life of vacuum packed frankfurter stored at 2°C, 6.5°C, 15°C and 21°C, besides to identify the main deterioration causes and to apply the statistical tool of survival analysis for evaluation of the results. Firstly a preliminary study was accomplished to discover which parameters were involved in the spoilage process. It was obtained alteration during the shelf life process from the analyses, like bacteria total count, lactic acid bacteria and pH. The expiring date of the frankfurter shelf life was determined when the lactic acid bacteria reached level 10^7 cfu/g with a slimy formation, which harmed its appearance visibly. The frankfurter contamination by this bacterium is due the recontamination after heat treatment during the packing process and due its sensibility to the heat. Afterwards, samples were exposed to different temperatures and monitored pre-determined time's periods. According to the microbiological evaluation, the inappropriate packages for consumption, combined with the sensorial were considered as " failure ", and the capable samples were denominated as " censure ". With the survival analysis support, it was possible to establish a shelf life of 43 days and it may have a possibility of 95% of packages without alterations for frankfurter kept into temperature of 2°C, 21 days with possibility of 91% of the packages without alterations to 6.5°C, 5 days with possibility of 92% of the packages without alterations to 15°C and 2.6 days with possibility of 92% of the packages without alterations to 21°C. This way, it is assured to say the lactic acid bacteria were the main cause of deterioration of frankfurter and that the survival analysis can be used not only for clinical, epidemic, biological, sociological studies and rehabilitation studies but also to assess the processed food shelf life.

Keywords: Shelf life, Frankfurter, Lactic Acid Bacteria, Survival Analysis

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1 INTRODUÇÃO.....	5
1 SALSICHA.....	5
1.1 INGREDIENTES CÁRNEOS.....	8
1.1.1 Gordura.....	9
1.1.2 Água e Gelo.....	9
1.1.3 Sal.....	10
1.1.4 Açúcares.....	10
1.1.5 Aditivos.....	10
1.2 DESCRIÇÃO DA PRODUÇÃO.....	11
2 VIDA DE PRATELEIRA.....	20
3 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA.....	26
3.1 MÉTODO ATUARIAL OU TÁBUA DE VIDA.....	29
3.2 MÉTODO DE KAPLAN-MEIER.....	31
3.3 MODELO DE COX.....	34
3.3 MODELO DE WEIBULL.....	35
4 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	37
CAPÍTULO 2: ESTUDO PRELIMINAR DA ESTIMATIVA DA VIDA DE PRATELEIRA DE SALSICHA.....	41
1 INTRODUÇÃO.....	42
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1 COLETA DE AMOSTRAS E PLANO DE AMOSTRAGEM.....	44
2.2 ENSAIOS LABORATORIAIS.....	45
3 RESULTADOS.....	47
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	52
5 BIBLIOGRAFIA.....	56
CAPÍTULO 3: ESTIMATIVA DE VIDA DE PRATELEIRA DE SALSICHA ESTOCADAS A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	59

1 INTRODUÇÃO.....	60
2 MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1 COLETA DE AMOSTRAS E PLANO DE AMOSTRAGEM	62
2.2 ENSAIOS LABORATORIAIS	63
2.3 ENSAIOS ESTATÍSTICOS.....	63
3 RESULTADOS	64
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	76
5 BIBLIOGRAFIA.....	80

CAPÍTULO 4: ESTIMATIVA DA VIDA DE PRATELEIRA DE SALSICHAS ESTOCADAS A DIFERENTES TEMPERATURAS UTILIZANDO ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA 83

1 INTRODUÇÃO.....	84
2 MATERIAL E MÉTODOS	88
2.1 COLETA DE AMOSTRAS E PLANO DE AMOSTRAGEM	88
2.2 ENSAIOS LABORATORIAIS	89
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
5 BIBLIOGRAFIA.....	100
6 CONCLUSÕES.....	102
7 TRABALHOS FUTUROS.....	103

LISTAS DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
Figura 1: Produção de Salsichas: Preparo das Carnes.....	12
Figura 2: Produção de Salsichas: Trituração de matérias-primas e ingredientes	12
Figura 3: Produção de Salsichas: Massa pronta para embutir	13
Figura 4: Produção de Salsicha: Tripa artificial e embutimento	13
Figura 5: Produção de Salsicha: Entrada e saída das salsichas nas estufas de cozimento.	14
Figura 6: Produção de Salsichas: Salsichas no tanque de resfriamento e tingimento.	14
Figura 7: Produção de Salsichas:Depelagem.....	15
Figura 9: Ilustração de alguns mecanismos de censura em que (●) representa a falha e (-) a censura.....	28
Figura 10: Estimativas da probabilidade de sobrevida acumulada para câncer de estômago em Campinas, São Paulo, diagnosticados no período 1991-1994 (método de Kaplan-Meier).....	33
CAPÍTULO 2: ESTUDO PRELIMINAR DA ESTIMATIVA DA VIDA DE PRATELEIRA DE SALSICHA.....	41
Figura 1: Contagem total de bactérias (TPC) e Contagem de bactérias lácticas (LAB) de salsichas estocadas a 6,5°C por um período de tempo de 26 dias.	48
Figura 2: Contagem de bactérias lácticas (LAB) versus valor de pH de salsichas estocadas a 6,5°C por um período de tempo de 26 dias.....	49
Figura 3: Aspecto visual da salsicha no tempo zero, ou seja, logo após processamento e antes da estocagem	49
Figura 4: Aspecto visual da salsicha em condições de término de estocagem a 6,5°C	50
Figura 5: Média de cinco medições de intensidade de cor através da Luminosidade (L), da coloração Vermelho (a) e da coloração Amarelo (b) de salsichas estocadas a 6,5°C por um período de tempo de 26 dias.	51
CAPÍTULO 3: ESTIMATIVA DE VIDA DE PRATELEIRA DE SALSICHA ESTOCADAS A DIFERENTES TEMPERATURAS	59
Figura 1: Contagem total de bactérias (TPC) e Contagem de bactérias lácticas (LAB) de salsichas estocadas a 2°C por um período de tempo de 1392 horas.....	68
Figura 2: Contagem total de bactérias (TPC) e Contagem de bactérias lácticas (LAB) de salsichas estocadas a 6,5°C por um período de tempo de 624.	68

Figura 3: Contagem total de bactérias (TPC) e Contagem de bactérias lácticas (LAB) de salsichas estocadas a 15°C por um período de tempo de 168 horas.....	69
Figura 4: Contagem total de bactérias (TPC) e Contagem de bactérias lácticas (LAB) de salsichas estocadas a 21°C por um período de tempo de 84 horas.	69
Figura 5: Contagem de bactérias lácticas (LAB) versus valor de pH de salsichas estocadas a 2°C por um período de tempo de 1392 horas.	70
Figura 6: Contagem de bactérias lácticas (LAB) versus valor de pH de salsichas estocadas a 6,5°C por um período de tempo de 624 horas	70
Figura 7: Contagem de bactérias lácticas (LAB) versus valor de pH de salsichas estocadas a 15°C por um período de tempo de 168 horas.	71
Figura 8: Contagem de bactérias lácticas (LAB) versus valor de pH de salsichas estocadas a 21°C por um período de tempo de 84.....	71
Figura 9: Função de sobrevivência das salsichas estocadas a 2°C por um período de tempo de 1392 horas.....	72
Figura 10: Função de sobrevivência das salsichas estocadas a 6,5°C por um período de tempo de 624 horas.....	72
Figura 11: Função de sobrevivência das salsichas estocadas a 15°C por um período de tempo de 168 horas.....	73
Figura 12: Função de sobrevivência das salsichas estocadas a 21°C por um período de tempo de 84 horas.....	73

CAPÍTULO 4: ESTIMATIVA DA VIDA DE PRATELEIRA DE SALSICHAS ESTOCADAS A DIFERENTES TEMPERATURAS UTILIZANDO ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA 83

Figura 1. Estimativas da probabilidade de contaminação ao longo do tempo.	91
Figura 2. Avaliação da adequabilidade do modelo Weibull usando os resíduos Cox-Snell	93
Figura 3. Avaliação da adequabilidade do modelo log-logístico usando os resíduos Cox-Snell.....	94

LISTAS DE TABELAS

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
Tabela 1: Quantidade máxima permitida de ingredientes em Salsichas.....	8
Tabela 2: Padrão microbiológico de salsicha.....	16
Tabela 3: Cálculo da probabilidade de sobrevivência observada pelo método atuarial (casos incidentes de câncer de estômago em Campinas, São Paulo, entre 1991 e 1994).	31
Tabela 4: Cálculo das estimativas da probabilidade de sobrevivência observada pelo método Kaplan-Meier (casos incidentes de câncer de estômago em homens com idade entre 45 e 54 anos, Campinas, São Paulo, entre 1991 e 1994).	33
CAPÍTULO 2: ESTUDO PRELIMINAR DA ESTIMATIVA DA VIDA DE PRATELEIRA DE SALSICHA.....	41
Tabela 1: Resultados microbiológicos e físico-químicos das amostras de salsicha estocadas à 6,5°C por um período de tempo de 26 dias.....	48
Tabela 2: Resultados da intensidade de cor das salsichas estocadas à 6,5°C por um período de tempo de 26 dias.....	50
Tabela 3: Análise estatística dos resultados de intensidade de cor de salsicha estocadas à 6,5°C por um período de tempo de 26 dias.....	51
CAPÍTULO 3: ESTIMATIVA DE VIDA DE PRATELEIRA DE SALSICHA ESTOCADAS A DIFERENTES TEMPERATURAS	59
Tabela 1: Resultados microbiológicos e físico-químicos das amostras de salsicha estocadas à 2°C por um período de tempo de 1392 horas.	65
Tabela 2: Resultados microbiológicos e físico-químicos das amostras de salsicha estocadas à 6,5°C por um período de tempo de 624 horas.	65
Tabela 3: Resultados microbiológicos e físico-químicos das amostras de salsicha estocadas à 15°C por um período de tempo de 168 horas.	66
Tabela 4: Resultados microbiológicos e físico-químicos das amostras de salsicha estocadas à 21°C por um período de tempo de 84 horas.	67
Tabela 5: Análise estatística da função de sobrevivência das amostras de salsicha estocadas à 2°C por um período de tempo de 1392 horas.	74
Tabela 6: Análise estatística da função de sobrevivência das amostras de salsicha estocadas à 6,5°C por um período de tempo de 624 horas.	74
Tabela 7: Análise estatística da função de sobrevivência das amostras de salsicha estocadas à 15°C por um período de tempo de 168 horas.	74

Tabela 8: Análise estatística da função de sobrevivência das amostras de salsicha estocadas à 21°C por um período de tempo de 84 horas.	75
---	----

CAPÍTULO 4: ESTIMATIVA DA VIDA DE PRATELEIRA DE SALSICHAS ESTOCADAS A DIFERENTES TEMPERATURAS UTILIZANDO ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA 83

Tabela 1: Distribuição das unidades experimentais segundo as temperaturas de estocagem	90
Tabela 2: Ocorrência de deterioração segundo as temperaturas de estocagem	90
Tabela 3: Análise descritiva dos tempos de acompanhamento	90
Tabela 4. Estimativas de máxima verossimilhança para os efeitos das diferentes temperaturas no modelo log-logístico – referência: pacotes armazenados a 21°C.....	95
Tabela 5. Estimativas da vida de prateleira para pelo menos 50% de pacotes não contaminados e os correspondentes intervalos de confiança de 95%.	96
Tabela 6. Estimativas da vida de prateleira para pelo menos 95% de pacotes não contaminados e os correspondentes intervalos de confiança de 95%.	96
Tabela 7. Estimativas da vida de prateleira para pelo menos 99% de pacotes não contaminados e os correspondentes intervalos de confiança de 95%.	96
Tabela 8. Estimativas da vida de prateleira para pelo menos 99,9% de pacotes não contaminados e os correspondentes intervalos de confiança de 95%.	96
Tabela 9. Estimativas de máxima verossimilhança para os parâmetros do modelo. ...	97
Tabela 10. Estimativas da vida de prateleira para pelo menos 95% de pacotes não contaminados e os correspondentes intervalos de confiança de 95%.	98
Tabela 11. Estimativas da vida de prateleira para pelo menos 99% de pacotes não contaminados e os correspondentes intervalos de confiança de 95%.	98
Tabela 12. Estimativas da vida de prateleira para pelo menos 99,9% de pacotes não contaminados e os correspondentes intervalos de confiança de 95%.	98

INTRODUÇÃO

Os produtos industrializados ocupam uma parcela cada vez maior do mercado de alimentos. Eles estão cada vez mais práticos, pois já vêm prontos ou semiprontos. O único trabalho é abrir a embalagem, que inclusive, estão cada vez mais fáceis de abrir e aquecer por alguns minutos em forno microondas. Além da praticidade, os alimentos industrializados também possuem um prazo de validade bem maior do que os produtos "in natura", tornando fácil a estocagem. Estes produtos vieram para ficar e representam uma solução para a vida atropelada das grandes cidades.

Num país como o Brasil de dimensão muito ampla e com grandes concentrações urbanas, muitas vezes os pontos de produção dos alimentos situam-se muito distantes dos pontos de consumo, exigindo um cuidado muito especial na conservação destes alimentos, tanto ao natural como na forma processada.

O processo de urbanização crescente, aliado ao também crescente ingresso da mulher no mercado de trabalho, tem exigido criatividade à indústria na produção de alimentos processados de boa qualidade, seguros, de bom valor nutritivo e de fácil preparação para consumo. Esta tarefa exige continuadas pesquisas e preparação de pessoal para um perfeito domínio dos mecanismos de deterioração dos alimentos, possibilitando com isso um maior controle destas reações e um prolongamento da vida de prateleira dos alimentos.

A vida de prateleira é um atributo importante de todos os alimentos. Pode ser definido como o tempo que se passa desde a produção e embalagem até o ponto em que ele se torna inaceitável para o consumo. É relacionado, então, com a qualidade total do alimento e diretamente ligado ao planejamento da produção, às especificações dos ingredientes, ao processo de manipulação e à estocagem. A vida de prateleira depende do alimento e é essencial que os produtores identifiquem os parâmetros intrínsecos e extrínsecos que limitam esse período.

A maioria dos alimentos por provir de material biológico de origem vegetal ou animal está sujeita a diferentes processos de deterioração, sendo os mais emergentes, aqueles de origem microbiana e que, portanto, recebem sempre o máximo de atenção. Contudo, mesmo com a prevenção adequada a esse tipo de

deterioração, o alimento estará sujeito durante o seu ciclo de vida de prateleira a uma série de outras reações, cuja velocidade, variará em função de muitos fatores, tais como: temperatura, umidade, acidez, teor de oxigênio, embalagem e outros.

Devido à complexidade dos alimentos, a previsão da sua vida de prateleira não é uma tarefa fácil e de resultado preciso. Contudo, é sempre muito importante ter o máximo de informações sobre o alimento a conservar, pois isto, aliado a um bom conhecimento do mecanismo ou da cinética das reações de deterioração irá possibilitar uma estimativa da sua vida de prateleira, além do mais orientará quanto às condições de conservação mais adequadas, àquele tipo particular de alimento.

Atualmente, o método mais utilizado para a determinação da vida de prateleira, é o monitoramento direto. Essa maneira requer baterias de amostras que devem ser tomadas em cada etapa do desenvolvimento do produto. Normalmente, as amostras são estocadas sob condições controladas até sua qualidade se tornar inaceitável. Os atributos testados são sensoriais, microbiológicos e físico-químicos. Esse método não é ideal para produtos com vidas de prateleira extensa.

A necessidade de encontrar produtos com maior prazo de validade, maior confiabilidade e rapidez faz com que novos métodos sejam incorporados para suprir estas necessidades e agilizar o envio de novos produtos para o mercado. O presente trabalho visa avaliar os métodos de análise de vida de prateleira direto e indireto com auxílio da análise estatística de sobrevivência.

1 OBJETIVO GERAL

Determinar a vida de prateleira de Salsichas, embaladas a vácuo sem pasteurização, armazenadas a 2°C; 6,5°C, 15°C e 21°C.

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.1.1 Pesquisar as principais causas de deterioração do produto estudado;
- 1.1.2 Aplicar a análise de sobrevivência para a especificação da vida de prateleira do produto;
- 1.1.3 Estimar a vida de prateleira de salsichas em temperaturas não estudadas com auxílio de modelo matemático desenvolvido com as temperaturas testadas.

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 INTRODUÇÃO

Alimentos cárneos processados são altamente sensíveis à deterioração microbiana devido às suas propriedades: atividades de água, pH e nutrientes. Desta forma, torna-se imprescindível conhecer todos os parâmetros e principalmente o processo de cada linha de produto para poder controlá-los e garantir, desta forma, a inocuidade perante os consumidores. A crescente preocupação da indústria com a qualidade de seus produtos fez com que fossem estudadas alternativas para prolongar a vida de prateleira dos mesmos.

Este capítulo tem por objetivo fazer um levantamento bibliográfico sobre o produto abordado na pesquisa, vida de prateleira e análise estatística.

1 SALSICHA

Segundo denominação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a salsicha é caracterizada como um produto cárneo embutido, formulado com carnes de diversas espécies, vísceras e outros tecidos animais aprovados para o consumo, é embutida em envoltório natural ou artificial ou por processo de extrusão, é submetida a um processo térmico adequado. Poderá ter como processo alternativo o tingimento, depelagem, defumação e a utilização de recheios e molhos. Devido ao próprio procedimento de fabricação, onde se utilizam as mais diversas partes do animal e ao seu amplo consumo pela população. Seu controle microbiológico torna-se um fator imprescindível para assegurar a qualidade do produto e, principalmente, a saúde do consumidor (CARVALHO, 2006; BRASIL, 2000).

A elaboração de produtos embutidos iniciou-se com um simples processo de salga e seca de carne. Isto se fazia para conservar a carne fresca que não poderia ser consumida imediatamente. Nossos antepassados descobriram que

estes produtos melhoravam com a adição de especiarias e outros condimentos. Tanto a conservação como o sabor, eram favorecidos. Os produtos, no entanto, eram mais bem armazenados dentro de envases constituídos de tripas retiradas de intestino de animais (PRICE & SCHWEIGERT, 1994).

A salsicha, no entanto, comanda o carro chefe da família dos embutidos com 27% da produção total. Teve sua origem na cidade de Frankfurt por um açougueiro de nome Johann Georghehner, na Alemanha, por volta de 1484 e em 1893 o consumo explodiu nos Estados Unidos. Os consumidores gostavam do produto porque ele era fácil de comer, prático e barato (PRICE & SCHWEIGERT, 1994; KORMIKIARIS, 2006).

Neste mesmo ano as salsichas tornaram-se o lanche padrão nos estádios de beisebol. O nome “hot dog” começou sua história em Polo Grounds, estádio dos New York Giants. Num dia frio de abril, o comerciante Harry Stevens, responsável pelos alimentos vendidos no estádio, não estava conseguindo vender sorvete e refrigerante e mandou seus funcionários comprarem todas as salsichas e pães que encontrassem. Em menos de uma hora, eles estavam oferecendo os sanduíches utilizando tanques portáteis com água quente e gritando “*They’re red hot! Get your dachshund sausages while they’re red hot!*”, numa tradução livre algo como “Elas estão pelando! Peguem suas salsichas *dachshund* enquanto elas estão quentes!”. Ao mesmo tempo, um cartunista que estava na cabine de imprensa do estádio ao ouvir os vendedores ele fez um *cartum*, onde, sem ter certeza de como escrever “*dachshund*”, ele simplesmente colocou “*Get your hot dog!*”, ou “Pegue o seu cachorro-quente!”. O *cartum* fez muito sucesso e o nome pegou (PRICE & SCHWEIGERT, 1994; KORMIKIARIS, 2006).

Hoje, os americanos consomem cerca de 20 bilhões de *hot dogs* por ano. Durante o campeonato americano de beisebol, eles comem 26 milhões de *hot dogs*. Cada americano consome, em média, 60 *hot dogs* por ano (KORMIKIARIS, 2006).

No Brasil, segundo pesquisas do IBGE indicam que, com o aumento do poder aquisitivo da população, aumentou também o consumo de carnes que, atualmente, é o segundo produto com que o consumidor brasileiro mais gasta dinheiro, logo após o pão.

Dentre os produtos cárneos mais vendidos, assim como nos Estados Unidos, um dos embutidos que mais se destaca, é a salsicha. Isso muito se deve ao aumento no consumo de cachorro-quente, que vem se tornando mesmo uma moda sendo vendidos não só em bares e lanchonetes, mas também em carrocinhas ou em Vans (INMETRO; 2006).

De certa forma, Kormikiaris (2006) já previa o que iria acontecer com a alimentação humana. As pessoas em decorrência de novas demandas geradas pelo modo de vida urbana são obrigadas a reequacionar suas vidas segundo as condições das quais se dispõe, como tempo, recursos financeiros, locais disponíveis para se alimentar, entre outros. As soluções são capitalizadas pela indústria e comércio, apresentando alternativas adaptadas às condições urbanas e delineando novas modalidades no modo de comer, o que certamente contribui para mudanças no consumo alimentar (GARCIA, 2003).

Para comprovar estes fatos, Garcia (2003) em sua pesquisa, apresenta dados obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, onde no início da década de 90, com a abertura de mercado, a importação de produtos alimentares industrializados cresceu 409%. O maior aumento foi observado nas preparações alimentícias diversas (1193%). Como se observa claramente, a industrialização da carne vem se intensificando e com finalidades diversas. Em decorrência deste consumo crescente de alimentos industrializados, as indústrias tornam-se obrigadas a adaptarem-se a esta demanda para continuarem no mercado (OLIVEIRA, 2000).

Os produtos embutidos comportam uma significativa faixa dentro dos produtos industrializados e as salsichas comandam a porcentagem de produção total dos embutidos. A elaboração de embutidos, antes tomada como uma arte, se baseia agora em uma ciência altamente sofisticada. Cada dia surge novos conhecimentos desde a indústria até os laboratórios governamentais ou universitários. Além do mais, as inovações juntamente com a engenharia mecânica em todos os pontos do processo de produção desde a manufatura até o envase, fazem da elaboração de embutidos uma das áreas da indústria cárnea mais dinâmica (PRICE & SCHWEIGERT, 1994).

A produção de embutidos exige uma ampla variedade de ingredientes cárneos e não cárneos, cada um exercendo uma função específica de acordo

com sua propriedade. Dentre os ingredientes cárneos, existe uma grande variação quanto à sua composição devido às diversas fontes das quais essa matéria-prima pode ser obtida (REIS, 1999).

A matéria-prima da salsicha conforme Instrução Normativa Nº4 de 2000, é basicamente composta de carne de diferentes espécies de animais de açougue, carnes mecanicamente separada, miúdos comestíveis de diferentes espécies de animais de açougue, tendões, pele, gordura e alguns ingredientes opcionais como: água, proteína vegetal e/ou animal, agentes de liga, aditivos intencionais, açúcares, aromas, especiarias e condimentos. Os limites máximos permitidos para cada ingrediente encontram-se na tabela abaixo:

Tabela 1: Quantidade máxima permitida de ingredientes em Salsichas

<i>Ingrediente</i>	<i>Limite máximo</i>
Carnes (diferentes espécies e CMS)	60,0%
Miúdos comestíveis	10,0%
Proteínas não cárnicas	04,0%
Amido	02,0%
Gordura	30,0%
Água	10,0%

Fonte: IN nº 4 de 31/03/2000.

1.1 INGREDIENTES CÁRNEOS

Na produção de embutidos, as carnes são os ingredientes principais, fornecendo suas características aos produtos. Podem ser de origem bovina, suína, de frango, entre outras. As proteínas miofibrilares, principal elemento que compõe a carne, são essenciais para a formação da massa da salsicha homogênea e estável, pois apresentam propriedades emulsionantes. Quando são acrescentadas carnes magras torna-se necessário a adição de agentes espessantes e colágeno para balancear a formulação de forma que a relação colágeno/miofibrilares tenham uma certa proporção equilibrada de modo a evitar defeitos no produto mais tarde. Antes da fabricação são removidos da carne os tendões, tecidos conjuntivos grossos, linfonodos, gorduras, cartilagem, pele de

ossos, restos de pele, hematomas, carimbos de inspeção e demais coisas indesejáveis. Após, a carne é cortada em pedaços de um tamanho que entre na boca do moedor sem dificuldade. Sempre, antes do processamento no cutter a carne deve passar pelo moedor para facilitar a trituração. É de fundamental importância a manutenção da temperatura da carne abaixo de 4°C^{1;2}.

1.1.1 Gordura

São usadas com finalidade de dar um paladar adequado ao produto, sendo usados nos teores de 15-30%. Os toucinhos de melhor qualidade são os de suíno, de cor branca, firmes e sem cheiro. Gorduras como a banha em rama causa uma consistência muito mole à salsicha, sendo mais usadas em patês. As gorduras bovinas são muito duras e causam uma sensação desagradável na boca. Se necessário, deve-se separar o toucinho da pele antes do uso e cortá-lo em pedaços. Moer o toucinho antes de colocá-lo no cutter, facilita o preparo¹.

A gordura também é altamente perecível e sugere-se manter a temperatura em todas as etapas do processo abaixo dos 4°C¹.

1.1.2 Água e Gelo

Somente água potável é usada na preparação de alimentos. Possui duas funções no preparo de embutidos:

- Diminuir a viscosidade da massa e;
- Melhorar as características sensoriais do produto.

Na forma de gelo, diminui e mantêm a temperatura da massa da salsicha abaixo dos 16°C durante a trituração no cutter. Pela legislação alemã a água pode ser usada na proporção de 15-20%, no Brasil são permitidos teores de no máximo 10%³.

¹ Fabricação de embutidos à base de carne suína. http://www.deliciasuina.com.br/noticias_abre.asp?cd_not=25. Acesso em: 23/09/2006.

² Tecnologia de Fabricação de Produtos Cárneos. <http://geocities.yahoo.com.br/consultoriaonline/tecnologias/Salsicha.htm>. Acesso em 23/09/2006.

³ Fabricação de embutidos à base de carne suína. http://www.deliciasuina.com.br/noticias_abre.asp?cd_not=25. Acesso em: 23/09/2006.

1.1.3 Sal

O sal tem a função de extrair e solubilizar as miofibrilas, para que estas, realizem a emulsão da gordura. As miofibrilas somente se dissolvem em água salgada. A adição do sal também ajuda a inibir o desenvolvimento microbiano preservando os alimentos, aumentando a sua vida de prateleira e conferindo um paladar característico ao produto (PRÄNDL *et al*, 1994).

1.1.4 Açúcares

Melhora o sabor e aumenta o brilho do produto³.

1.1.5 Aditivos

Os aditivos possuem diversas funções, conforme descrito abaixo:

- Cura: A cura corresponde à combinação de sal de cozinha ao nitrato e nitrito. Funciona como conservadores e fornece a coloração vermelha ao produto cárneo. Na carne existe uma substância chamada mioglobina, responsável pela sua coloração vermelha. Quando a mioglobina se combina com os derivados do nitrito forma-se outro componente, o nitroso-mioglobina, que é estável durante o cozimento, salga e ao oxigênio do ar. A cura é usada somente em produtos vermelhos, como salsichas, patês e presuntos;
- Eritorbato: Auxilia no desenvolvimento da cor do produto e impede a rancificação dos lipídios. É um "parente" da vitamina C, mas sem as mesmas propriedades⁴;
- Fosfato: É conhecido também como emulsificante. Após o abate do animal, a carne possui 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 salsichas ela deve ser recuperada. O processo é revertido pela a adição de sal e fosfato, sendo que o fosfato deve ser adicionado sempre antes do sal, para que ocorrer a precipitação. Uma boa retenção de água evita a separação da gelatina e gordura, facilitando a

⁴ Fabricação de embutidos à base de carne suína. http://www.deliciasuina.com.br/noticias_abre.asp?cd_not=25. Acesso em: 23/09/2006.

formação da emulsão. Ocorre também, um pequeno aumento de pH quando o fosfato é adicionado de acordo com a legislação, fazendo com que o efeito de repulsão entre as micelas de gordura se eleve e assim afastando mais o pH da carne do ponto isoelétrico dessa⁵; (PRÄNDL *et al*, 1994);

- Glutamato: O glutamato está presente em todas as proteínas e é liberado pelo processo natural que acontece na fase de maturação da carne após o abate. É o agente responsável pelo sabor específico da carne. Como aditivo sua função é melhorar ou acentuar o sabor do produto⁴;
- Condimentos naturais: As salsichas ainda podem conter uma proporção característica de condimentos aromáticos como cominho, coentro, alcarávia, gengibre, macis, baunilha, cebola, alho, pimenta-da-Jamaica, páprica doce e ervas como manjerona, orégano ou salsa. A utilização de pimenta-do-reino também é comum. Na filosofia dos salsicheiros alemães, onde teve origem a salsicha, os condimentos devem refinar o sabor e o aroma da salsicha, mas não podem sobrepor ou mascarar o aroma da matéria prima. Os condimentos são aplicados nas etapas finais da preparação da massa, para evitar uma possível perda de aroma⁵.

1.2 DESCRIÇÃO DA PRODUÇÃO

O processo de produção de salsichas segue os parâmetros descritos a seguir:

- Preparo das Carnes: As carnes utilizadas na fabricação da salsicha devem estar congeladas, de forma a facilitar o controle da temperatura no cutter, durante o processo de trituração. O bloco de carne congelada deve ser cortado com o uso do *quebrador de blocos* ou *serra-fitas* até se obter pedaços de carne adequados para serem moídos, normalmente em discos com furos de 12 mm; depois a carne é levada ao cutter;

⁵ Tecnologia de Fabricação de Produtos Cárneos. <http://geocities.yahoo.com.br/consultoriaonline/tecnologias/Salsicha.htm>. Acesso em 23/09/2006.



Figura 1: Produção de Salsichas: Preparo das Carnes

- Trituração no Cutter: Além de triturar as carnes, tem como objetivo a extração das proteínas miofibrilares (actina, miosina), que possuem a capacidade de estabilizar a emulsão. Para isto deve ser seguida uma seqüência de adição de ingredientes ao cutter:
 - o Carnes magras e metade do salde cura;
 - o Metade do gelo;
 - o Proteína vegetal;
 - o Gordura, restante do sal e outros ingredientes;
 - o Restante do gelo;
 - o Fixador de cor.



Figura 2: Produção de Salsichas: Trituração de matérias-primas e ingredientes

- Avaliação da Massa: Avaliar se a massa está fina, conforme desejado;



Figura 3: Produção de Salsichas: Massa pronta para embutir

- Embutimento: A massa é embutida mecanicamente em tripas artificiais para posterior descascamento;



Figura 4: Produção de Salsicha: Tripa artificial e embutimento

- Cozimento na Estufa: O objetivo dessa etapa do processo é cozinhar a massa, dando características de paladar adequado (cor, sabor e consistência), além de estabilizar a mistura e melhorar a conservação. São indicadas as seguintes condições para o processo:
 - 20 minutos a 55°C, calor seco e chaminé aberta, para ocorrer a formação de cor e facilitar a depilagem;
 - 30 minutos a 70°C, calor seco e chaminé fechada;

- 30 minutos a 80°C; calor úmido e chaminé fechada, até atingir 71°C no centro do produto.



Figura 5: Produção de Salsicha: Entrada e saída das salsichas nas estufas de cozimento.

- Resfriamento: É empregada água fria até a temperatura de 40°C;



Figura 6: Produção de Salsichas: Salsichas no tanque de resfriamento e tingimento.

- Depelagem: Resultado das proteínas sarcoplasmáticas, a casca é retirada automaticamente tomando cuidado com ajuste das lâminas que corta a tripa. O corte deve ser preciso, evitando cortes no produto.



Figura 7: Produção de Salsichas:Depelagem

- Embalagem: São utilizadas embalagens a vácuo (PVdC/náilon-polietileno) (SEBRAE, 2006; GUAHYBA, 2004).



Figura 8: Salsichas nas esteiras para o setor de embalagem

Segundo a Resolução – RDC Nº 12 de 02 de janeiro de 2001 a caracterização dos microrganismos e/ou suas toxinas consideradas de interesse sanitário exigidos para este tipo de produto seguem na tabela abaixo:

Tabela 2: Padrão microbiológico de salsicha

<i>Microrganismo</i>	<i>Tolerância Máxima (UFC/g)</i>
Coliformes a 45°C/g	100
Estaf.coag.positiva/g	100
C. sulfito redutor a 46°C/Com	100
Salmonella sp/25g	Ausente

Fonte: RDC nº 12 de 02/01/2001

Os defeitos mais comuns registrados nesses produtos observados por Price & Schweigert (1994), Guahyba (2004), Musskopf (2006), Silva (1999), Noskowa (1978) e Franco (2005) no decorrer da estocagem são:

- Liberação de líquido: resultado do desequilíbrio entre os teores de água, gordura e proteínas solúveis. Muitas vezes, ocorre uma redução da quantidade de carne magra que é a fonte de proteínas miofibrilares (emulsificantes), por questões econômicas. Esse líquido liberado poderá originar um problema ainda mais grave, isto é, possibilitar o desenvolvimento de microrganismos que irão tornar a salsicha imprópria para o consumo humano. Em algumas ocasiões, as proteínas miofibrilares estão em quantidades adequadas na formulação, mas não são adequadamente extraídas das miofibrilas pela não observância da seqüência da adição dos ingredientes;
- Coloração verde: o esverdeamento é o resultado do desenvolvimento de microrganismos que produzem água oxigenada. Essa água oxigenada, ao reagir com os pigmentos da carne produz o pigmento verde responsável por este defeito. A pasteurização da salsicha, após ser embalada, reduz enormemente este risco. Recomenda-se um aquecimento a 80°C por 20 minutos;
- Quebra de vácuo na embalagem plástica: duas são as possíveis causas desse problema. Uma delas é a ocorrência de microfuros na termosoldagem e a outra é o desenvolvimento de bactérias lácticas heterofermentativas que, ao produzir gás carbônico, provocam a quebra do vácuo. De tempos em tempos, deve ser feito um controle da hermeticidade da termosoldagem, como se faz com a busca de um furo em câmara de ar

com o auxílio de um tanque de água. As bactérias láticas heterofermentativas são resultantes de contaminação de superfícies; por isso o continuado cuidado com limpeza e desinfecção do tampo das mesas da sala de embalagem e das mãos dos funcionários. Recomenda-se o uso de álcool etílico a 70°GL para desinfecção do tampo das mesas e este mesmo álcool adicionado de 2% de glicerina para desinfecção das mãos dos funcionários;

- Arenosidade da massa: O uso de carnes mecanicamente separada e obtida com a máquina calibrada (excessiva extração, rendimentos superiores a 80%), levando consigo excessiva quantidade de microfragmentos ósseos comunica a sensação de arenosidade. Esse problema torna-se mais saliente nas formulações que contenham grandes quantidades de carne mecanicamente separada (CMS).
- Inchamento e ruptura da salsicha durante o consumo: durante o preparo da salsicha para ser consumida (cozimento em água quente), ocorre o seu inchamento, às vezes chegando à ruptura. Tal inchamento é devido ao excesso de colágeno (couro suíno ou pele de frango) presente na formulação;
- Estufamento do saco plástico: a produção de gás é o resultado da multiplicação de microrganismos aderidos à superfície da salsicha, face à contaminação. Recomenda-se checar o programa de limpeza e desinfecção da empresa. A descontaminação poderá ser feita por imersão da salsicha em solução gelada de ácido láctico (2%) antes de ser colocada na embalagem (deixar escorrer) ou pasteurização (80°C por 20 minutos), ou atomização com *Lactobacillus alimentarius* (10^7 UFC/g);
- Textura de papel: o uso de CMS em quantidades altas altera a textura da salsicha. Isto ocorre devido ao fato de que a CMS, ao ser tratada sob altas pressões, sofre uma fragmentação em suas fibras musculares, perdendo sua elasticidade característica. Este defeito pode ser diminuído pela adição de emulsão de couro (5 a 10%);
- Formação de exsudado (viscosidade): é um líquido viscoso formado, geralmente, por bactérias láticas originando uma má impressão do consumidor. As bactérias láticas estão presentes em quase todo tipo de

produto cárneo fresco ou curado, com crescimento também em temperaturas de refrigeração. Por ser um microrganismo não patogênico, está fora da imposição de análise na legislação vigente, mas é hoje um dos principais deteriorantes desse produto, pois é a responsável pela formação de limo (secreção viscosa) superficial ou no interior.

As principais deteriorações de produtos cárneos citadas acima, é caracterizada, principalmente pela manifestação de alterações decorrentes da atividade microbiana, afetando o aspecto, textura e/ou aroma do mesmo, sendo sua ocorrência dependente de três fatores: o substrato cárneo; tipo e número de microrganismo presente; e temperatura (CONTRERAS *et al*, 2003).

Para manter e assegurar as características e inocuidade destes produtos é fundamental que a indústria e os produtores adotem medidas preventivas ao longo das diferentes etapas do processo, no sentido de minimizar os riscos de contaminação do produto por microrganismos, pois isto, é a maior causa de perda econômica por deterioração entre o tempo decorrido desde a colheita ou captura até o consumo. As conseqüências econômicas do estabelecimento envolvido com enfermidades por alimentos são, como regra, catastróficas. As enfermidades transmitidas por alimentos também têm um impacto sócio-econômico considerável. Só há relativamente pouco tempo, foi reconhecido que algumas doenças diarréicas causam seqüelas aparentemente não relacionadas com a mesma, como artrite, problema cardíaco, alergias alimentares, entre outras (ICMSF, 1997; CONTRERAS *et al*, 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, milhões de pessoas adoecem todos os anos em virtude da ingestão de alimentos contaminados. A ocorrência de toxinfecções está relacionada com vários fatores, tais como temperatura, estocagem, conservação, manipulação, hábitos higiênicos, entre outros. Enquanto que as infecções são causadas pela ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos que se multiplicaram, as intoxicações são causadas pela ingestão de alimentos contendo toxina microbiana⁶.

É recomendado para as indústrias alimentícias e autoridades responsáveis pelo controle, adotarem um programa de segurança alimentar, afim de, garantir ao consumidor a inocuidade do produto que ele está adquirindo. Este programa

⁶ Texto disponível em: http://www.segurancaalimentar.ufrgs.br/consumidor_dicas9dva.htm. Acesso em 05/09/2006.

deve incorporar pelo menos as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Os objetivos da segurança alimentar são proporcionar a base científica para que as indústrias selecionem e implementem medidas para controlar os perigos de interesse em determinados alimentos ou processos (ICMSF, 2004).

Sem dúvida, a implementação desta filosofia de trabalho irá auxiliar em muito na redução dos perigos e riscos oferecidos ao consumidor final, podendo inclusive garantir as características pré-definidas de seus produtos durante sua vida de prateleira.

2 VIDA DE PRATELEIRA

Alimentos são naturalmente perecíveis. Numerosas mudanças ocorrem nos alimentos durante o processamento e a estocagem. É sabido que as condições usadas para o processo e estocagem de alimentos podem influenciar adversamente nos atributos de qualidade dos alimentos. Durante a estocagem, um ou mais atributos de qualidade podem alcançar um estado indesejável. Neste instante, o alimento é considerado impróprio para o consumo e isto diz-se ter alcançado o fim de sua vida de prateleira (MAN E ADRIAN, 2000).

O termo vida de prateleira é, portanto, o tempo em que o alimento pode ser conservado em determinadas condições de temperatura, umidade relativa, luz, etc, sofrendo pequenas, mas bem estabelecidas alterações que são até certo ponto, consideradas aceitáveis pelo fabricante, pelo consumidor e pela legislação alimentar vigente (COSTA, 2005; FREITAS, BORGES E HO, 2001; VITALI E QUAST, 1996; NEW ZEALAND, 2005).

Durante a estocagem e distribuição, os alimentos são expostos freqüentemente a condições ambientais, como temperatura, umidade, oxigênio e luz. Estas condições podem disparar muitos mecanismos de reações que podem ter ligações com a degradação de alimentos. Em consequência destes mecanismos, os alimentos podem ser alterados a tal extensão que poderão ser rejeitados pelo consumidor ou podem se tornar prejudiciais à pessoa que os consome, conforme exemplificado acima. A boa compreensão das diferentes reações que causam a deterioração do alimento é prioridade antes de desenvolver procedimentos específicos para a evolução da vida de prateleira do alimento (MAN E ADRIAN, 2000).

Para que o alimento mantenha esta qualidade algumas características devem ser preservadas, tais como:

- Permanecer seguro para o consumo com características químicas, físicas e microbiológicas aceitáveis para o consumo regular do produto;
- Manter sua aparência, odor, textura e paladar;
- Suas reivindicações nutricionais contidas no rótulo devem ser mantidas (NEW ZEALAND, 2005; FREITAS, BORGES E HO, 2001).

Geralmente quem embala e vende o produto é legalmente responsável por calcular quanto tempo este produto pode ser razoavelmente mantido sem muitas mudanças na qualidade. O rótulo do produto, no entanto, deve conter os dados de sua vida de prateleira e quais as condições que ele deve ser mantido para que este objetivo seja alcançado (NEW ZEALAND, 2005; FREITAS, BORGES E HO, 2001).

Cada país possui sua própria regulamentação, mas os dados mais comuns e importantes são relatados abaixo:

- Venda: os produtos devem ser encaminhados até seu ponto de venda com um período de tempo, mais distante possível do fim de sua vida de prateleira para que ele possa ser estocado, se necessário, sem correr o risco de haver mudanças consideráveis em sua qualidade;
- Garantia da qualidade dos dados: o produto deve possuir um nível de qualidade aceitável pelo consumidor até seu último dia de vida de prateleira;
- Dados na embalagem: a embalagem deve conter todos os dados necessários para que o produto conserve suas características como: informações sobre como o produto deve ser armazenado e data de fabricação, lote, validade (FREITAS, BORGES E HO, 2001).

Calcular este tempo não é uma tarefa fácil, pois todos os alimentos deterioram com o tempo. Há alguns fatores, descritos abaixo, que devem ser considerados para mensurar quando um alimento inicia sua perda de qualidade:

- Crescimento microbiológico: o crescimento de algumas bactérias, bolor e leveduras em alimentos podem conduzir a uma deterioração precoce, além de causar uma intoxicação;
- Perda/Ganho de umidade: pode resultar na perda de nutrientes, escurecimento enzimático e rancificação. Alimentos secos podem ficar vulneráveis a contaminações microbianas se adquirirem umidade;
- Mudanças químicas: pode resultar na perda de odor e sabor, mudanças na cor, escurecimento enzimático e perda de nutrientes;
- Mudanças induzidas pela claridade: pode causar rancificação, perda vitamínica e enfraquecimento das cores naturais;

- Mudanças de temperatura: aumenta ou diminui a velocidade de outras formas de deterioração;
- Danos físicos: danos em alimentos embalados podem torná-lo vulnerável para deteriorações microbianas e não-microbianas como furos em embalagens plásticas, amassamento de latas, etc;
- Outros: deterioração por roedores e insetos, alterações de aromas e odores de alimentos armazenados próximos a produtos com odor extremamente forte e produtos adulterados (NEW ZEALAND, 2005).

Devido a composição química e as características biológicas, a carne é um excelente ambiente para o crescimento microbiológico. Devido a isso, a multiplicação microbiana torna-se o fator principal da deterioração destes produtos. A microbiota inicial varia de contagens de bactérias mesófilas à psicotróficas. Portanto, boas práticas de manipulação e cuidados especiais, devem ser mantidos durante todas as operações, incluindo ainda, a utilização de métodos de conservação para inibir ou minimizar a multiplicação (SILVA, 1999). A qualidade microbiológica de produtos cárneos processados é a principal área de preocupação para produtores, consumidores e órgão de saúde pública. Produtos excessivamente contaminados com microrganismos são indesejáveis para ponto de vista da saúde pública, para qualidade de embalagem e estética geral (OKOLOCHA E ELLERBROECK; 2004; SILVA, 1999).

Na planta processadora, a qualidade microbiológica de produtos processados depende do nível de contaminação inicial, número e tipo de microrganismo, eficiência do método de processamento, controle de temperatura, prática higiênica-sanitária da planta processadora (OKOLOCHA E ELLERBROECK; 2004) e conscientização dos funcionários, pois mesmo que o produto passe por um processo de descontaminação, ele pode ser recontaminado pelas mãos dos manipuladores, no fim de seu processo colocando em risco sua inocuidade.

Aliada a contaminação microbiana está a alteração sensorial. Ambas formam um fator chave para determinação da vida de prateleira dos produtos alimentícios. Alimentos microbiologicamente estáveis terão sua vida de prateleira definida pelas propriedades sensoriais. Muitos alimentos frescos, depois de um tempo de estocagem ainda podem estar microbiologicamente seguros por não

apresentar contaminação patogênica, mas pode ser rejeitado devido a mudanças em suas propriedades sensoriais que algumas vezes são causadas por microrganismos não patogênicos, ou seja, microrganismos deteriorantes (HOUGH, GÓMEZ E CURIA; 2003).

Segundo a New Zeland Food Safety Authority (2005) existem dois métodos principais para estimar a vida de prateleira em produtos alimentícios que são:

- Método direto: este método é o mais comumente usado pelas indústrias. Ele envolve a estocagem do produto de acordo com as condições pré-estabelecidas por um período maior do que o esperado pela vida de prateleira, verificando o produto em intervalos regulares para ver o início da deterioração. O procedimento exato é único para cada produto. Detalhes dos passos requeridos são relatados e discutidos a seguir:
 - Passo 1: Identificar quais as possíveis causas de deterioração. Essa deterioração pode ser causada por matérias-primas de baixa qualidade, atividade de água, pH, viabilidade de oxigênio, mudanças químicas e biológicas, embalagens, estocagem, temperatura, etc;
 - Passo 2: Seleção de teste. Você precisa selecionar o teste adequado para determinar a segurança e qualidade do produto, ou seja, após seleção das causas de deterioração classificam-se as mais relevantes. Em geral os testes podem ser divididos em quatro categorias, sendo elas: evolução sensorial, microbiológica, química e física;
 - Passo 3: Planejar o estudo da vida de prateleira. Alguns pontos devem ser seguidos para preparar este estudo, tais como: determinar que testes precisam ser realizados; durabilidade do teste e o tempo necessário para atingir os resultados requeridos; quantas amostras serão testadas e quando o estudo será realizado;
 - Passo 4: Realização do estudo de prateleira. Durante o estudo amostras devem ser estocadas com as mesmas condições de seu produto normal, sua manufatura e embalagem;
 - Passo 5: Determinação da vida de prateleira. Durante o estudo determinar o ponto em que o produto não se encontra dentro dos padrões estabelecidos. Desta maneira você pode decidir quanto

tempo o produto pode ser mantido, aceitável e seguro. O teste deve ser refeito para garantir a repetibilidade dos resultados;

- Passo 6: Monitoramento da vida de prateleira. Amostras devem ser testadas freqüentemente para avaliar o tempo estimado anteriormente. Os resultados devem ser parecidos/idênticos aos alcançados no teste anterior.
- Método indireto: este método usa estocagem acelerada e/ou modelo preditivo para determinar a vida de prateleira. Hoje as indústrias alimentícias sofrem uma forte pressão para desenvolver novos produtos aliados com alta tecnologia e em tempo recorde. Muitos destes produtos possuem longos períodos de vida de prateleira, alguns com semanas ou meses. Para isso, geralmente é realizado um teste acelerado de vida de prateleira, o qual é reduzido a dias ou semanas. Estes testes são usados para obter informações com altos níveis de variáveis aceleradas. Esta informação é geralmente extrapolada para obter a estimativa da vida de prateleira. Testes acelerados vem se tornando crescentemente importante devido a sua rapidez principalmente no lançamento de novos produtos (HOUGH, GARITTA E GÓMEZ; 2006). Uma síntese é relatada abaixo:
 - Estudo acelerado: o período de tempo é diminuído considerando o aumento da taxa de deterioração. Isto, usualmente é realizado com o aumento da temperatura de estocagem. Os resultados são então usados para estimar a vida de prateleira de um produto em condições normais de estocagem;
 - Modelo preditivo: modelos preditivos são equações matemáticas usando informações de dados já testados para predizer um crescimento bacteriológico em condições definidas de tempo e temperatura por exemplo. Modelos preditivos podem ser usados para calcular a vida de prateleira de alimentos. Informações de mudanças que ocorrem no produto que levam a deterioração, propriedades do produto e embalagens são requeridas para os cálculos. Muitos modelos preditivos são especificados para tipos particulares de organismos. Os modelos são usualmente o primeiro

passo na evolução da vida de prateleira dos alimentos (NEW ZEALAND, 2005).

Cabe ao pesquisador decidir qual método melhor se enquadra as suas necessidades.

3 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA

A análise de sobrevivência é uma das áreas da estatística que mais cresceu nas últimas décadas do século passado. A razão deste crescimento é o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas estatísticas combinado com computadores cada vez mais velozes. Uma evidência quantitativa deste sucesso é o número de aplicações de análise de sobrevivência em medicina. Esta foi a área da estatística que mais se destacou e os dois artigos mais citados em toda a literatura estatística no período de 1987 a 1989 foram o do estimador de “*Kaplan-Meier*” para a função de sobrevivência e o do modelo de “*Cox*” (COLOSIMO E GIOLO, 2006).

Geralmente há uma variável de interesse, também chamada de variável dependente ou variável resposta. Essa variável pode ser o número de casos de determinada doença, ou a sua incidência, ou a sua probabilidade de ocorrência, ou outra medida que vise descrever a frequência com que a doença ocorre. Em análise de sobrevivência, a variável dependente de interesse é o tempo decorrido até o aparecimento de algum evento. Esse tempo é denominado “tempo de falha”, podendo ser o tempo até a morte do paciente, bem como até a cura ou recidiva de uma doença. Em estudos de câncer, é usual o registro das datas correspondentes ao diagnóstico da doença, à remissão (após o tratamento, o paciente fica livre dos sintomas da doença), à recorrência da doença (recidiva) e à morte do paciente. O tempo de falha pode ser, por exemplo, do diagnóstico até a morte ou da remissão até a recidiva (PAGANO E GAUVREAU, 2004; COLOSIMO E GIOLO, 2006; KLEINBAUM, 1996; HOUGH, GÓMEZ E CURIA 2003; GIOLO, 2003).

Os estudos clínicos são freqüentemente prospectivos e de longa duração. Mesmo sendo longos, os estudos clínicos de sobrevivência usualmente terminam antes que todos os indivíduos no estudo venham a falhar. Uma característica decorrente destes estudos é, então, a presença de observações incompletas ou parciais. Estas observações, denominadas censuras, podem ocorrer por uma variedade de razões, dentre elas, a perda de acompanhamento do paciente no decorrer do estudo e a não ocorrência do evento de interesse até o término do

experimento. Note que toda informação obtida sobre estes indivíduos é que o tempo até a ocorrência do evento, para cada um deles, é superior ao tempo registrado até o último acompanhamento (COLOSIMO E GIOLO; 2006).

A presença de observações censuradas distingue a análise de sobrevivência de outros tipos de análise. Sem a presença de censura, as técnicas estatísticas clássicas, como análise de regressão e planejamento de experimentos, poderiam ser utilizadas, provavelmente usando uma transformação para a resposta (PAGANO E GAUVREAU, 2004).

Ressalta-se o fato de que, mesmo censurados, todos os resultados provenientes de um estudo de sobrevivência devem ser usados na análise estatística. Duas razões justificam tal procedimento: (i) mesmo sendo incompletas, as observações censuradas fornecem informações sobre o tempo de vida de pacientes; (ii) a omissão das censuras no cálculo das estatísticas de interesse pode acarretar conclusões viciadas (COLOSIMO E GIOLO; 2006). Sem a presença desses dados, não seria possível realizar uma boa estimativa de parâmetros e, assim, fazer uma análise adequada (PEREIRA E VIVANCO 2003).

Alguns mecanismos de censura são diferenciados. Censura do tipo I é aquela que o estudo será terminado após um período pré-estabelecido de tempo. Censura do tipo II é aquela em que o estudo será terminado após ter ocorrido o evento de interesse em um número pré-determinado de indivíduos. Um terceiro mecanismo de censura, a do tipo aleatório, é o que mais ocorre na prática médica. Isto acontece quando o paciente é retirado no decorrer do estudo sem ter ocorrido a falha, ou também, por exemplo, se o paciente morrer por uma razão diferente da estudada (PEREIRA E VIVANCO 2003).

Os mecanismos de censura apresentados na Figura 6 também são conhecidos por censura à direita, pois o tempo de ocorrência do evento de interesse está à direita do tempo registrado. Esta é a situação freqüentemente encontrada em estudos envolvendo dados de sobrevivência. No entanto, outras duas formas de censura podem ocorrer: censura à esquerda e intervalar (COLOSIMO E GIOLO, 2006).

A censura à esquerda ocorre quando o tempo registrado é maior do que o tempo de falha. Isto é, o evento de interesse já aconteceu quando o indivíduo foi observado. Um estudo para determinar a idade em que as crianças aprendem a

ler em uma determinada comunidade pode ilustrar a situação de censura à esquerda. Quando os pesquisadores começaram a pesquisa algumas crianças já sabiam ler e não lembravam com que idade isto tinha acontecido, caracterizando, desta forma, observações censuradas à esquerda. Neste mesmo estudo, pode ocorrer simultaneamente censura à direita para crianças que não sabiam ler quando os dados foram coletados. Os tempos de vida neste caso são chamados de duplamente censurados (KLEINBAUM, 1996).

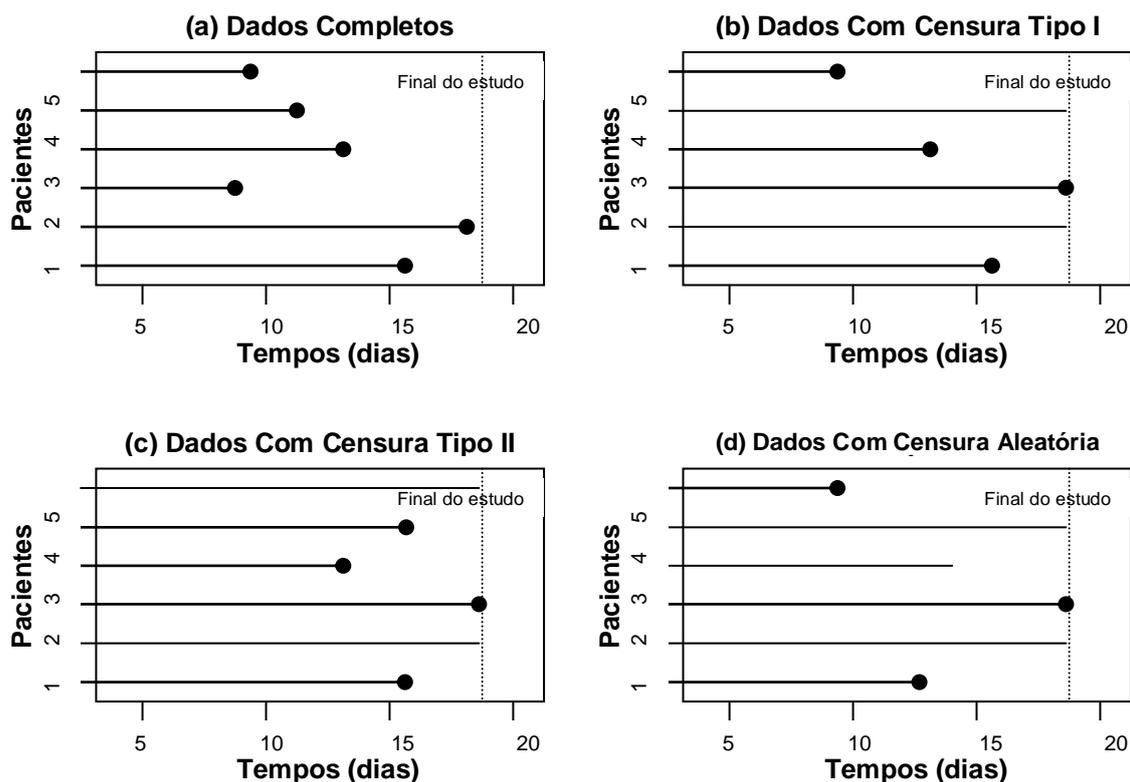


Figura 9: Ilustração de alguns mecanismos de censura em que (●) representa a falha e (-) a censura.

- (a) todos os pacientes experimentaram o evento antes do final do estudo, não teve censura,
- (b) alguns pacientes (2 e 5) não experimentaram o evento até o final do estudo,
- (c) o estudo foi finalizado após a ocorrência de um número pré-estabelecido de falhas e
- (d) o acompanhamento de alguns pacientes não experimentaram o evento até o final do estudo.

A intervalar é o tipo mais geral de censura que acontece, por exemplo, em estudos em que os pacientes são acompanhados em visitas periódicas e é conhecido somente que o evento de interesse aconteceu em um certo intervalo de tempo. Pelo fato de o tempo de falha não ser reconhecido exatamente, mas sim, pertencer a um intervalo. Tais dados são denominados por sobrevivência intervalar (COLOSIMO E GIOLO, 2006).

Uma outra característica de alguns estudos de sobrevivência é o truncamento que é muitas vezes confundido com censura. Truncamento é caracterizado por uma condição que exclui certos indivíduos de um estudo. Nestes estudos, os pacientes não são acompanhados a partir do tempo inicial, mas somente após experimentarem um certo evento.

Na análise de sobrevivência, os parâmetros mais importantes são a probabilidade de sobrevivência no curso de cada um dos intervalos considerados e a probabilidade de sobrevivência acumulada, isto é, a probabilidade de sobreviver do tempo zero até o tempo final considerado. Esta última equivale à probabilidade de sobreviver em todos os intervalos anteriores ao momento considerado e, usualmente, é denominada *Função de Sobrevida* $S(t)$. A escolha do modelo estatístico mais apropriado dependerá do tipo do delineamento do estudo epidemiológico, de seus objetivos, das variáveis estudadas e da maneira pela qual foram coletados e categorizados os dados (TEIXEIRA, FAERSTEIN E LATORRE, 2002).

A estimativa da probabilidade de sobrevivência é, com certeza, mais válida e mais precisa para o período inicial do seguimento, no qual estão disponíveis informações sobre a maioria dos pacientes. Nos períodos posteriores, as informações podem ficar limitadas devido às perdas de seguimento e ao pequeno número de eventos. Somente nas décadas de 1950 e de 1960 apareceram as primeiras propostas de estimadores das probabilidades de sobrevivência que incorporavam a censura, valem dizer, modelos para observações incompletas. As principais técnicas são o método atuarial, o método do produto-limite de “Kaplan-Meier” e o modelo de “Cox” (PAGANO E GAUVREAU, 2004).

3.1 MÉTODO ATUARIAL OU TÁBUA DE VIDA

O método atuarial para dados incompletos calcula as probabilidades de sobrevida em intervalos fixados previamente, e o número dos expostos a risco corresponde aos pacientes vivos ao início de cada intervalo x . O número de expostos (l_x) é ajustado de acordo com o número de censuras que ocorreram neste período, na suposição de que as censuras ocorreram uniformemente

durante o período x e que a experiência subsequente dos casos censurados é a mesma daqueles que permanecem em observação. Assim, na presença de censura, é feito um ajuste no número de pessoas expostas ao risco no início do período x , subtraindo-se metade das censuras do total de expostos ao risco no início do período, supondo-se que estes indivíduos estiveram, em média, expostos ao risco apenas metade do intervalo de seguimento. Nessa tábua de vida, o tempo também é dividido em intervalos fixos e a probabilidade de óbito (q_x) e a de sobrevida (p_x) são calculadas para cada um dos intervalos (TEIXEIRA FAERSTEIN E LATORRE, 2002). Tem-se então:

$$q_x = d_x / l_x^*, \quad p_x = 1 - q_x, \quad l_x^* = l_x - w_x / 2, \quad \text{em que:}$$

q_x = probabilidade condicional de morte no intervalo x ;

d_x = número de mortes (falhas do intervalo);

p_x = probabilidade condicional de sobrevida no intervalo x ;

l_x^* = n^o de expostos ao risco, no intervalo x , corrigidos de acordo com a censura;

l_x = número de pessoas expostas ao risco no início do período;

w_x = número de pessoas perdidas de observação no intervalo x .

Uma das fórmulas das funções de sobrevida é a da probabilidade de sobrevida acumulada até o tempo x , ou $S(t)$ é dada por:

$$S(t) = \prod_{x=0}^{t-1} p_x^* = \prod_{x=0}^{t-1} (1 - q_x^*)$$

Há ainda a fórmula da função de riscos (*hazard function*), ou $h(t)$, também conhecida como força instantânea de mortalidade ou taxa instantânea de óbito em um período curto de tempo, dado que um indivíduo estava vivo até o instante $t-1$ para tempos discretos:

$$h(t) = \frac{d_x}{l_x^* - \frac{d_x}{2}}, \quad \text{dado que } T > t_{x-1}$$

Uma demonstração do método atuarial de cálculo dos elementos da sobrevida pode ser acompanhada na Tabela 3, em que se observa que, no intervalo entre 1 e 2 anos após o diagnóstico (segunda linha), havia 98 pacientes vivos no início do intervalo, ocorreram 46 óbitos e 4 pacientes foram perdidos do

seguimento. Assim, 96 ($98 - (4/2)$) estavam expostos ao risco de morte, resultando na probabilidade de morte de 0,479 ($46/96$) e, conseqüentemente, na probabilidade de sobreviver de 0,520 ($1 - 0,479$). A sobrevida acumulada a dois anos do diagnóstico é de 0,166, resultado da multiplicação da sobrevida nos intervalos do primeiro (0,320) e do segundo ano (0,520). Desta forma, tem-se que a probabilidade de um paciente com câncer de estômago estar vivo após o segundo ano do diagnóstico seria estimada por de 16,7% (TEIXEIRA, FAERSTEIN E LATORRE, 2002).

Tabela 3: Cálculo da probabilidade de sobrevivência observada pelo método atuarial (casos incidentes de câncer de estômago em Campinas, São Paulo, entre 1991 e 1994).

Intervalo (anos) (i)	Vivo ao início do intervalo (l_i)	Nº de óbitos no intervalo (d_i)	Nº de pessoas perdidas de observação no intervalo (w_i)	Efetivo exposto ao risco de morrer (l_i^*)	Probabilidade condicional de morte de morte (q_i)	Probabilidade condicional de morte de sobrevida (p_i^*)	Probabilidade acumulada de sobrevida ao final do intervalo $S(t_i)$
0-1	337	224	15	329,500	0,679	0,320	0,320
1-2	98	46	4	96,000	0,479	0,520	0,166
2-3	48	13	0	48,000	0,270	0,729	0,121
3-4	35	6	2	34,000	0,176	0,823	0,100
4-5	27	4	2	26,000	0,153	0,846	0,084

Fonte: TEIXEIRA, FAERSTEIN E LATORRE, 2002.

Um esquema diferente é aquele em que o desfecho de interesse pode ser classificado em diversas categorias, geralmente diferentes causas de óbito. Para esse tipo de análise é introduzida a metodologia de riscos competitivos e são modelos que podem envolver a teoria de cadeias markovianas (ANDERSEN *et al.*, 1993; BECKER, 1989). Essa tábua de vida é conhecida como tábua de vida com múltiplos decrementos. Quando se trabalha com os riscos competitivos os tempos de sobrevivência para cada uma das causas formam um sistema em que cada um deles é uma variável aleatória (BERETA, 2002).

3.2 MÉTODO DE KAPLAN-MEIER

Na análise de sobrevivência pelo método de Kaplan-Meier, segundo Giolo (2003) os intervalos de tempo não são fixos, mas determinados pelo aparecimento de uma ou mais falhas (por exemplo, o óbito). Nessa situação, designa-se números para a identificação da falha e da censura, ou seja, o número de óbitos em cada intervalo pode ser caracterizado pelo número 1 (um) e a

censura pode ser caracterizada pelo número 0 (zero). Este método, primeiramente, deve-se ordenar os tempos de sobrevida em ordem crescente. Os sobreviventes ao tempo t (l_t) são ajustados pela censura, ou seja, os pacientes censurados entram no cálculo da função de probabilidade de sobrevida acumulada até o momento de serem considerados como perda. Isto propicia o uso mais eficiente das informações disponíveis. Define-se a função $S(t)$ por um estimador conhecido como *estimador produto limite de Kaplan-Meier*, pois é o limite do produto dos termos até o tempo t :

$$S(t) = \prod_{i=0}^j \frac{l_j - i}{l_j}, \text{ em que } \begin{cases} i=1, \text{ falha} \\ i=0, \text{ censura} \end{cases}$$

e l_j = número de expostos ao risco no início do período. No caso de haver empate, utiliza-se na fórmula o maior valor de i (tempo da observação). Por exemplo:

$$\text{se: } t_2 = t_3 = t_4 \Rightarrow p_{(2)} = p_{(3)} = p_{(4)} = \frac{l_2 - 4}{l_2}$$

Uma demonstração do cálculo da taxa de sobrevivência observada pelo método de Kaplan-Meier pode ser vista na Tabela 4. Observando a linha referente a 11 meses após o diagnóstico (oitava linha), verifica-se a ocorrência de 1 óbito entre os 12 pacientes vivos no início do mês. Assim, a probabilidade condicional de morte foi de 0,083 (1/12) e a probabilidade condicional de sobrevida de 0,916 (1 – 0,083) naquele mês, resultando numa sobrevida acumulada aos 11 meses de 0,427, resultado da multiplicação das probabilidades de sobrevida dos períodos anteriores. Desta forma, deduz-se que, para os pacientes com câncer de estômago do sexo masculino e com idade entre 45 e 54 anos, diagnosticados em Campinas, São Paulo, entre 1991 e 1994, a probabilidade de sobrevida após 11 meses foi estimada em 42,8%. A Figura 8 apresenta esta curva. A distinção essencial entre o método atuarial e o método de Kaplan-Meier é que este último elimina a necessidade de assumir que as censuras das observações ocorram uniformemente durante este intervalo. Assume-se apenas que as observações censuradas teriam a mesma experiência futura do que aquelas que continuam sendo observadas (TEIXEIRA, FAERSTEIN E LATORRE, 2002).

Tabela 4: Cálculo das estimativas da probabilidade de sobrevivência observada pelo método Kaplan-Meier (casos incidentes de câncer de estômago em homens com idade entre 45 e 54 anos, Campinas, São Paulo, entre 1991 e 1994).

Meses após o diagnóstico (<i>t</i>)	Nº de vivos no início do mês (<i>l_i</i>)	Óbitos (<i>d_i</i>)	Censuras (<i>w_i</i>)	Probabilidade condicional de morte ($q_i = d_i/l_i$)	Probabilidade condicional de sobrevida ($p_i = 1 - q_i$)	Probabilidade acumulada de sobrevida $S(t)$
0	29	5	0	0,172	0,827	0,827
1	24	2	0	0,083	0,916	0,758
2	22	2	1	0,090	0,909	0,689
3	19	2	0	0,105	0,894	0,617
5	17	1	0	0,058	0,941	0,580
6	16	1	1	0,062	0,937	0,544
10	14	2	0	0,142	0,857	0,466
11	12	1	0	0,083	0,916	0,427
13	11	3	0	0,272	0,727	0,311
14	8	1	0	0,125	0,875	0,272
18	7	1	0	0,142	0,857	0,233
19	6	1	0	0,166	0,833	0,194
38	5	1	0	0,200	0,800	0,155
48	4	1	0	0,250	0,750	0,116
53	3	1	0	0,333	0,666	0,077

Fonte: TEIXEIRA, FAERSTEIN E LATORRE, 2002.

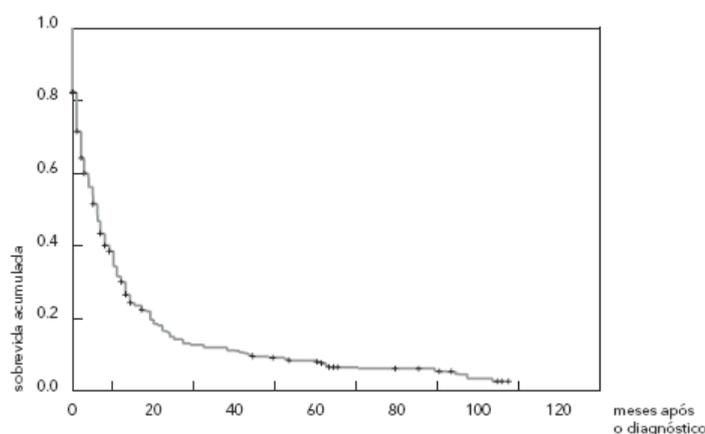


Figura 10: Estimativas da probabilidade de sobrevida acumulada para câncer de estômago em Campinas, São Paulo, diagnosticados no período 1991-1994 (método de Kaplan-Meier).

Os dois métodos referidos assumem como premissa que as observações censuradas têm a mesma probabilidade de sofrerem o evento que aquelas que permanecem em observação, isto é, as censuras devem ser independentes da sobrevivência. Nos estudos que contemplam períodos extensos de observação é necessário assegurar que não tenham existido mudanças importantes nas características destes indivíduos e no diagnóstico, exposição ou tratamento da doença em estudo ao longo deste período. Tais mudanças poderiam introduzir viés nas estimativas de sobrevida, cuja direção depende das características da coorte e do período estudado. A aplicação desses modelos permite comparar o

conjunto de curvas de sobrevivência das diversas categorias de uma única variável independente. Para comparar as curvas de sobrevivência acumulada entre diferentes categorias de uma mesma variável, recomenda-se utilizar o teste *log-rank*, que se baseia no confronto entre os óbitos observados nos dois grupos e aqueles esperados. A diferença entre óbitos observados e esperados é avaliada por meio do teste do qui-quadrado. Esta estimativa enfatiza o tamanho do efeito e indica a faixa de valores plausíveis para a sobrevida. Vale lembrar que o objetivo maior é o de descrever a mortalidade atribuída à doença em estudo e com esta finalidade podemos utilizar as *taxas de sobrevida corrigidas*, que são calculadas da mesma maneira (método atuarial ou Kaplan-Meier); contudo, consideram como óbito apenas aqueles atribuídos à doença em estudo. Neste caso os pacientes que morreram por outra causa ou por causa desconhecida devem ser tratados como pacientes com tempo de observação incompleto (censura) (TEIXEIRA, FAERSTEIN E LATORRE, 2002).

3.3 MODELO DE COX

O modelo de regressão de Cox, proposto por Cox em 1972, é sem dúvida um dos mais populares na análise de dados de sobrevivência. Este modelo permite que a análise dos tempos de vida até a ocorrência de um evento seja realizada considerando-se as covariáveis de interesse. Cox, assim como outros autores, propõem modelar dados de sobrevivência, na presença de covariáveis, por meio da função de risco.

Em 1972, Cox desenvolveu um modelo de regressão semi-paramétrico, também conhecido como *modelo de riscos proporcionais de Cox*, *modelo de Cox*, ou *regressão de Cox*. Essa técnica é indicada quando se deseja estudar sobrevivência sob o prisma de causalidade ou da predição, pois fornece as estimativas das razões de risco dos fatores estudados, podendo-se avaliar o impacto que alguns fatores de risco ou fatores prognósticos têm no tempo até a ocorrência do evento de interesse (BERETA, 2002).

3.3 MODELO DE WEIBULL

A análise estatística de dados de sobrevivência, pode ser realizada, utilizando-se os modelos probabilísticos para o tempo de falha, sendo que os mais usados para descrever a variável tempo até a ocorrência de um evento são: exponencial, Weibull e log-normal (STRAPASSON, 2007).

Segundo Collet (2003), uma distribuição de probabilidade que tem um papel central em dados de análise de sobrevivência é a distribuição de Weibull, introduzida em 1951 por Weibull no contexto de teste de confiabilidade industrial. O autor ainda ressalta que esta distribuição é tão importante para análise paramétrica de dados de sobrevivência quanto a distribuição normal é para modelos lineares.

Uma variável aleatória T com distribuição de Weibull com parâmetro de escala $\lambda > 0$ e parâmetro de forma $\gamma > 0$, isto é, $T \sim \text{Weibull}(\gamma, \lambda)$ tem função de densidade de probabilidade, função de sobrevivência e função de taxa de falha dadas, respectivamente, por

$$f(t) = \frac{\gamma}{\lambda^\gamma} t^{\gamma-1} \exp\left\{-\left(\frac{t}{\lambda}\right)^\gamma\right\}, t \geq 0$$

$$S(t) = \exp\left\{-\left(\frac{t}{\lambda}\right)^\gamma\right\}, t \geq 0$$

$$h(t) = \frac{\gamma}{\lambda^\gamma} t^{\gamma-1}, t \geq 0$$

Note que o parâmetro λ tem a mesma unidade de medida de t e γ não tem unidade.

Uma das características importantes dessa distribuição é que ela apresenta uma grande variedade de formas, por exemplo, quando $\gamma = 1$ a função de taxa de falha é constante e os tempos de sobrevivência têm uma distribuição exponencial. Para outros valores de γ , a função de taxa de falha cresce ou decresce monotonicamente.

Conforme vimos até o momento, a análise de sobrevivência é um ramo da estatística usado extensivamente em estudos clínicos, epidemiológicos, biológicos, sociológicos e em estudos de reabilitação. Em algumas pesquisas recentes a análise de sobrevivência tem sido aplicada para avaliação sensorial da vida de prateleira de alimentos e função de falha que pode ser definida como

sendo a probabilidade de um consumidor estocar um produto por um tempo maior que x .

A análise de sobrevivência é aplicada em estocagem acelerada de elementos industriais e materiais como componentes eletrônicos, lâmpadas, ou partes automotivas. Recentemente, sua aplicação vem sendo expandida e largamente estudada para a área de alimentos, como fizeram Gimenez, Varela, Salvador, Ares, Fiszman e Garita (2005) na estimativa de vida de prateleira de pão, Varela, Salvador e Fiszman (2005) com estimativa em maçãs, Gámbaro, Gimenez, Varela, Garita e Hough *et al* (2004) em *Alfajor*, Rodrigues e Ando (2002) com estimativa em arroz entre outros.

4 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2001. Resolução – RDC Nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico para Padrões Microbiológicos para Alimentos. Brasília-DF.

ANDERSEN, P.K.; BORGAN, O.; GILL, R.D.; KEIDING, N. 1993. Statistical Models Based on Counting Process. N. Verlag. Springer

BECKER, N.G. 1989. Analysis of Infectious Disease Data. London: Chapman and Hall.

BERETA, E. M. P. 2002. Testes de Significância Repetidos em Análise de Sobrevivência. Universidade Estadual de Campinas. *Dissertação de Mestrado*, Campinas-SP.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 31/03/2000. Instrução Normativa Nº 4, Anexo IV: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salsicha.

CARVALHO, L. T. Maio/Junho 2006. Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle na Linha de Produção de Salsichas. *Revista Higiene Alimentar*. 20 (141): 36-44.

COLLET, D. 2003. Modelling Survival Data in Medical Research. London: Chapman & Hall.

COLOSIMO, E. A.; GIOLO, S. R. 2006. Análise de Sobrevivência Aplicada. 1ª Edição, Editora Edgard Blücher, São Paulo-SP.

CONTRERAS, C. J. *et al.* 2003. Higiene e Sanitização na Indústria de Carnes e Derivados. Livraria Varela, São Paulo-SP.

COSTA, J. C. 06/2005. Modelo Weibull com Parâmetros Dependentes de Covariáveis: Aplicação na Determinação de Vida de Prateleira. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Exatas. Departamento de Estatística. *Dissertação de Mestrado*. Belo Horizonte-MG.

COX, D. R. 1972. Regression Models and Life Table. *Journal of Royal Statistical Society*. Series B, 39:1-38.

Fabricação de embutidos à base de carne suína. Disponível em: http://www.deliciasuina.com.br/noticias_abre.asp?cd_not=25. Acesso em: 23/09/2006.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. 2005. Microbiologia dos Alimentos. Editora Ateneu, São Paulo-SP.

FREITAS, M. A.; BORGES, W.; HO, L. L. 2001. A Statistical Model for Shelf Life Estimation Using Sensory Evaluation Scores. *Relatório Técnico RTP-10/2001*.

Universidade federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Exatas. Departamento de Estatística. Minas Gerais.

GÁMBARO, A.; GIMÉNEZ, A.; VARELA, P.; GARITA, L.; HOUGH, G. 2004. Sensory Shelf-life Estimation of *Aljajor* by Survival Analysis. *Journal of Sensorial Studies*. 19: 500-509.

GARCIA, R. W. D. Outubro/Dezembro 2006. Reflexos da Globalização na Cultura Alimentar: Considerações Sobre as Mudanças na Alimentação Urbana. *Revista de Nutrição*. 16 (4).

GIMÉNEZ, A., VARELA, P., SALVADOR, A., ARES, G., FISZMAN, S., GARITTA, L. 2005. Shelf Life Estimation of Brown Pan Bread: A Consumer Approach. *Food Quality and Preference*.

GIOLO, S. R. 20--. Modelos de Riscos Proporcionais. Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.

GIOLO, S. R. 2003. Variáveis Latentes em Análise de Sobrevivência em Curvas de Crescimento. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, *Tese de Doutorado*, Piracicaba-SP.

GUAHYBA, A. S. 2004. Embutidos de Massa Escaldada. Apostila disciplina Tecnologia de Carnes e Derivados do Curso Técnico de Alimentos do Centro de Educação Profissional Martin Luther.

HOUGH, G.; GARITTA, L.; GÓMEZ, G. 2006. Sensory Shelf Life Predictions by Survival Analysis Accelerated Storage Models. *Food Quality and Preference*. 17: 468-473.

HOUGH, G.; GÓMEZ, G.; CURIA, A. 2003. Survival Analysis Applied to Sensory Shelf Life of Foods. *Journal of Food Science*. 68 (1): 359-362.

http://www.segurancaalimentar.ufrgs.br/consumidor_dicas9dva.htm. Acesso em 05/09/2006.

ICMSF. Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas dos Alimentos. 1997. APPCC na Qualidade e Segurança Microbiológica de Alimentos. Livraria Varela, São Paulo-SP.

ICMSF. Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas dos Alimentos. 2004. Microorganismos de Los Alimentos 7. Editorial Acribia, Zaragoza, España.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia. Salsicha em Lata Tipo Viena, Carne Seca (Charque) e Jerked Beef. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/salsicha.asp>, Acesso em 30/06/2006.

KLEINBAUM, D. 1996. Survival Analysis. New York. Springer-Verlag.

KORMIKIARIS, G. Alemães e Austríacos “Brigam” por Invenção do Hot Dog. Folha UOL OnLine. Disponível em http://www1.folha.uol.com.br/folha/equilibrio/equi20000904_hotdoghist.shtml, Acesso 20/06/2006.

MAN, D.; ADRIAN, J. 2000. Shelf Life Evolution of Foods. Gaithersburg, Aspen.

MUSSKOPF, G. 2006. Embutidos de Massa Escaldada. Apostila disciplina Tecnologia de Carnes e Derivados do Curso Técnico de Alimentos do Centro de Educação Profissional Martin Luther.

NEW ZEALAND FOOD SAFETY AUTHORITY. 02/2005. A Guide to Calculating the Shelf Life of Foods. Wellington, New Zealand.

NOSKOWA, G. L. 1978. Microbiologia de las Carnes Conservadas por el Frio. Editorial Acribia S.A., Zaragoza-España.

OKOLOCHA, E. C.; ELLERBROECK, L. January/2004. The Influence of Acid and Alkaline Treatments on Pathogens and the Shelf Life of Poultry Meat. *Food Control*.

OLIVEIRA, E. *et al.* 2000. Determinações em Nutrientes Minerais em Alguns Produtos Cárneos. *Revista Brazilian Journal of Food Technology*. 3: 121-127.

PAGANO, M; GAUVREAU, K. 2004. Princípios da Bioestatística. Editora Pioneira Thompson, São Paulo-SP.

PEREIRA, P. J., VIVANCO, M. J. F. Mar/Abr 2003. Viabilidade da Aplicação de Mecanismos de Censura Tipo I e Aleatória em Dados Entomológicos. *Rev. Ciência Agrotéc. Lavras*. 27 (2): 438-442.

PRÄNDL, O.; FISCHER, A.; SCHMIDHOFER, T.; SINELL, H. J. 1994. Tecnología e Higiene de la Carne. Editorial Acribia S.A., Zaragoza-España.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. 1994. Ciencia de la Carne y los Productos Carnicos. Editora: Acribia; 2ª Edição, Zaragoza (Espana).

REIS, R. A. A.; SANTOS, W. L. M.; OLIVEIRA, A. L. 12/1999. Identificação da Hidroxiprolina como Índice de Qualidade de Salsicha Comercializada em Belo Horizonte-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 51 (6): 589-594.

SEBRAE-MG. 2006. Projeto: Ponto de Partida - Fábrica de Embutidos. Belo Horizonte-MG.

SILVA, E. N. 1999. Contaminação e Deterioração de Carne. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Roteiro de Aula TP 161 – Tecnologia Avançada de Carnes e Derivados, São Paulo-SP.

Tecnologia de Fabricação de Produtos Cárneos. Disponível em: <http://geocities.yahoo.com.br/consultoriaonline/tecnologias/Salsicha.htm>. Acesso em 23/09/2006.

TEIXEIRA, M. T. B., FAERSTEIN, E., LATORRE, M. R. Mai/Jun 2002. Técnicas de Análise de Sobrevida. *Cad. Saúde Pública*. 18: 579-594.

VARELA, P., SALVADOR, A., FISZMAN, S. 2005. Shelf Life Estimation of 'Fuji' Aples: Sensory Characteristics and Consumer Acceptability. *Postharvest Biology and Technology*. 38.

VITALI, A. A.; QUAST, D. G. 1996. Reações de Transformação e Vida de Prateleira de Alimentos Processados. *Manual Técnico Nº 06*, Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, 2ª Edição, Campinas-SP.

CAPÍTULO 2: ESTUDO PRELIMINAR DA ESTIMATIVA DA VIDA DE PRATELEIRA DE SALSICHA

CAPÍTULO 2: ESTUDO PRELIMINAR DA ESTIMATIVA DA VIDA DE PRATELEIRA DE SALSICHA

1 INTRODUÇÃO

Os produtos industrializados ocupam uma parcela cada vez maior do mercado de alimentos. Eles estão cada vez mais práticos, pois já vêm prontos para o consumo ou então, semiprontos. O único trabalho é abrir a embalagem, que inclusive, estão cada vez mais fáceis de abrir e aquecer por alguns minutos em forno microondas. Além da praticidade, os alimentos industrializados também possuem um prazo de validade bem maior do que os produtos "in natura", tornando fácil a estocagem. Estes produtos vieram para ficar e representam uma solução para a vida atropelada das grandes cidades.

A vida de prateleira é um atributo importante de todos os alimentos. Pode ser definido como o tempo que se passa desde a produção e embalagem até o ponto em que ele se torna inaceitável para o consumo. É relacionado, então, com a qualidade total do alimento e diretamente ligado ao planejamento da produção, às especificações dos ingredientes, ao processo de manipulação e à estocagem. A vida de prateleira depende do alimento e é essencial que os produtores identifiquem os parâmetros intrínsecos e extrínsecos que limitam esse período.

Devido à complexidade da composição dos alimentos, a previsão da sua vida de prateleira não é uma tarefa fácil e de resultado preciso. Contudo, é sempre muito importante ter o máximo de informações sobre o alimento a conservar, pois isto, aliado a um bom conhecimento do mecanismo ou da cinética das reações de deterioração irá possibilitar uma estimativa da sua vida de prateleira, além de orientar quanto às condições mais adequadas de conservação, àquele tipo particular de alimento.

A necessidade de encontrar produtos com maior prazo de validade, maior confiabilidade e rapidez, faz com que novos métodos sejam incorporados para suprir estas necessidades e agilizar o envio de novos produtos para o mercado.

Para avaliar qual o processo de deterioração que ocorre durante a estocagem, foram realizados ensaios microbiológicos como contagem total de bactérias, coliformes à 35°C, coliformes à 45°C, *Staphylococcus aureus*, clostrídios sulfito redutores, *Salmonella* sp, bactérias lácticas, *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* sp e *Listeria* sp; ensaios físico-químicos com determinação da atividade de água e pH além de ensaios sensoriais que possibilitaram averiguar a intensidade de cor, o aparecimento de viscosidade no interior da embalagem e presença de pontos esverdeados no produto.

Este estudo teve como objetivo determinar quais os principais parâmetros microbiológicos, físico-químicos e/ou sensoriais que definem a vida de prateleira de salsichas estocadas em uma temperatura de aproximadamente 6,5°C. Resultados deste estudo servirão como base para estudos subseqüentes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DE AMOSTRAS E PLANO DE AMOSTRAGEM

A pesquisa foi elaborada com 25 amostras de salsichas coletadas imediatamente após a embalagem. Cada amostra contempla 1 (um) pacote embalado à vácuo contendo aproximadamente 1kg de produto. A coleta foi realizada em 5 dias subseqüentes, sendo que a cada dia foi coletado 5 pacotes, conforme definido por Thiemig, Buhr e Wolf (1998). Esta técnica de amostragem permite avaliar o produto, em um único dia, com tempos diferentes de estocagem, ou seja, no sexto dia, por exemplo, se pode avaliar pacotes com 1, 2, 3, 4 e 5 dias de vida de prateleira. Desta forma, é possível avaliar a evolução do processo de deterioração mais nitidamente, visto que, a deterioração conjunta dos produtos dificulta a observação do pesquisador, pois vários pacotes podem deteriorar num mesmo dia, tornando a tarefa do analista excessivamente árdua. Dos 5 pacotes coletados diariamente, um foi destinado ao ensaio inicial microbiológico, físico-químico e sensorial, restando, portanto, 4 pacotes para continuação do teste. Os pacotes foram estocados em refrigerador com temperatura controlada de aproximadamente 6,5°C utilizando para controle da temperatura um registrador calibrado tipo "TempRecord (Didai – Brasil/Nova Zelândia)". Os pacotes restantes foram avaliados diariamente visualmente por uma equipe experiente, afim de detectar a presença de viscosidade no interior dos pacotes. Com 7, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 e 26 dias foram realizados ensaios microbiológicos, físico-químicos e sensoriais.

Em caso de dúvidas durante a avaliação sensorial, mais de um pacote poderia ser aberto a fim de confirmar os resultados através de ensaios laboratoriais como foi o caso dos dias 13, 15 e 16. Para dias onde mais de um pacote foi avaliado, a análise de dados, foi realizada através da média dos resultados destes dias, automaticamente calculada pelo software utilizado (Statistica 7.1).

Foi considerado inapto para o consumo e fim da vida de prateleira amostras com presença excessiva de viscosidade, manchas verdes ou contagem microbiológica superior a 10^7 ufc/g.

2.2 ENSAIOS LABORATORIAIS

Os ensaios microbiológicos realizados nas amostras de salsichas foram: contagem total de bactérias (PCA – Plate Count Agar, Merk, Germany – ABNT – MB 3462), contagem de coliformes à 35°C/contagem de coliformes à 45°C (Petrifilm – E. coli/Coliform Count Plate, 3M, USA – AOAC 991.14 – Método Petrifilm®), contagem de *Listeria monocytogenes* e *Listeria* sp (ALOA – Listeria Selective Agar Base, Merk, Germany – ISO 11290.1/A1 e 11290.2-2004), pesquisa de *Salmonella* sp (MRSV – Rappaport Vassiliadis Medium Semi Solid, Acumedia, Michigan – AOAC 993.07), contagem de *Pseudomonas* sp (GSP – Pseudomonas Aeromonas Selective Agar, Merk, Germany) contagem de *Staphylococcus aureus* (Baird Parker Agar, Acumedia, Michigan – ABNT – 11/91 – MB-3464), contagem de clostrídios sulfito redutores (SPS – Perfringes Selective Agar, Merk, Germany – ABNT 08/93 – NBR-12893), contagem de bactérias lácticas (MRS – Lactobacilli MRS Agar, Acumedia, Michigan) e contagem de *Brochothrix thermosphacta* (STAA – Streptomycin Thallous Acetate Actidione, Biolife, Italy). Os ensaios físico-químicos realizados foram pH e atividade de água (Aqualab - BRASEQ). Para ensaio sensorial foram avaliados a intensidade de cor para os parâmetros de Luminosidade (L), Vermelho (a) e Amarelo (b) com auxílio do equipamento “Minolta (Japan)” em 5 salsichas de cada pacote amostral. Cada salsicha recebeu 3 medições (superior, meio e inferior). Também foi observada nas unidades amostrais a presença de viscosidade e manchas esverdeadas.

Periodicamente eram feitas inspeções visuais para avaliar as condições do produto armazenado. Caso houvesse suspeita de comprometimento, o pacote correspondente era aberto e ensaios laboratoriais eram realizados a fim de confirmar a suspeita. Caso não houvesse esta suspeita durante a inspeção visual, um pacote era selecionado ao acaso e ensaios laboratoriais eram realizados para confirmar o não comprometimento.

Nos ensaios microbiológicos de bactérias lácticas foram realizados testes para verificar a espécie predominante a partir de colônias características isoladas do meio de cultura MRS com auxílio do API 50CHL (bioMérieux, França).

3 RESULTADOS

As amostras foram avaliadas em períodos de tempo pré-determinados a fim de detectar os principais parâmetros microbiológicos, físico-químicos e sensoriais envolvidos no processo de deterioração no decorrer do tempo de estocagem.

A Tabela 1 apresenta os resultados significativos dos ensaios microbiológicos em logaritmo e ensaios físico-químicos das amostras de salsichas estocadas a 6,5°C durante 26 dias.

De acordo com os resultados obtidos observou-se diferença significativa nos ensaios microbiológicos de contagem total de bactérias e contagem de bactérias lácticas e no ensaio físico-químico de pH.

Para a contagem total de bactérias e contagem de bactérias lácticas, ambos os resultados partiram de uma contagem de 2,00 Log₁₀ ufc/g observada no início do período de estocagem para 7,76 Log₁₀ ufc/g observada no término da vida de prateleira. Os valores de pH também oscilaram em decorrência do tempo de estocagem e apresentaram uma variação de 0,46, ou seja, partiram de um valor de 6,32 para 5,86 no término da vida de prateleira. Uma correlação considerável foi verificada entre os ensaios microbiológicos de contagem total de bactérias com a multiplicação das bactérias lácticas demonstrada na Figura 1. Outra ligação foi observada na Figura 2, pois conforme aumenta a multiplicação das bactérias lácticas, simultaneamente, ocorre o decréscimo do valor de pH.

Os ensaios microbiológicos de coliformes a 45°C, coliformes a 35°C, *Staphylococcus aureus*, clostrídios sulfito redutores, *Salmonella* sp, *Pseudomonas* sp, *Brochothrix thermosphacta*, *Listeria monocytogenes* e *Listeria* sp não apresentaram qualquer alteração no decorrer da vida de prateleira, assim como o ensaio físico-químico de atividade de água. Quanto ao aspecto sensorial uma das alterações percebidas foi o aparecimento de viscosidade conforme apresentado nas Figuras 3 e 4. A intensidade de cor também apresentou diferença significativa de acordo com as Tabelas 2 e 3, porém não foi observado tendência de aumento ou diminuição das tonalidades decorrentes do tempo de estocagem conforme a disposição dos dados apresentados na Figura 5.

Tabela 1: Resultados microbiológicos e físico-químicos das amostras de salsicha estocadas à 6,5°C por um período de tempo de 26 dias.

Tempo (Dias)	Amostra (n)	Ensaio Microbiológicos (Log ₁₀ ufc/g)		Ensaio Físico-Químico
		Contagem Total de Bactérias	Contagem de Bactérias Lácticas	pH
0	1	2,84	2,48	6,34
0	2	2,70	2,00	6,44
0	3	3,11	2,00	6,48
0	4	2,00	2,00	6,21
0	5	2,30	2,00	6,44
7	6	2,00	2,00	6,11
9	7	2,30	2,30	6,29
11	8	3,60	3,00	6,50
13	9	3,00	3,00	6,58
13	10	3,30	3,30	6,43
14	11	3,00	3,00	6,53
15	12	3,00	3,60	6,50
15	13	3,00	3,30	6,40
16	14	3,00	2,00	6,39
16	15	3,30	3,00	6,39
17	16	5,30	4,90	6,39
18	17	5,74	3,38	6,33
19	18	3,65	3,48	6,37
20	19	5,83	2,00	6,38
21	20	7,76	7,76	6,38
22	21	2,70	2,00	6,22
23	22	2,00	2,60	6,30
24	23	6,76	7,76	5,98
25	24	6,76	4,56	5,86
26	25	7,36	7,08	5,88

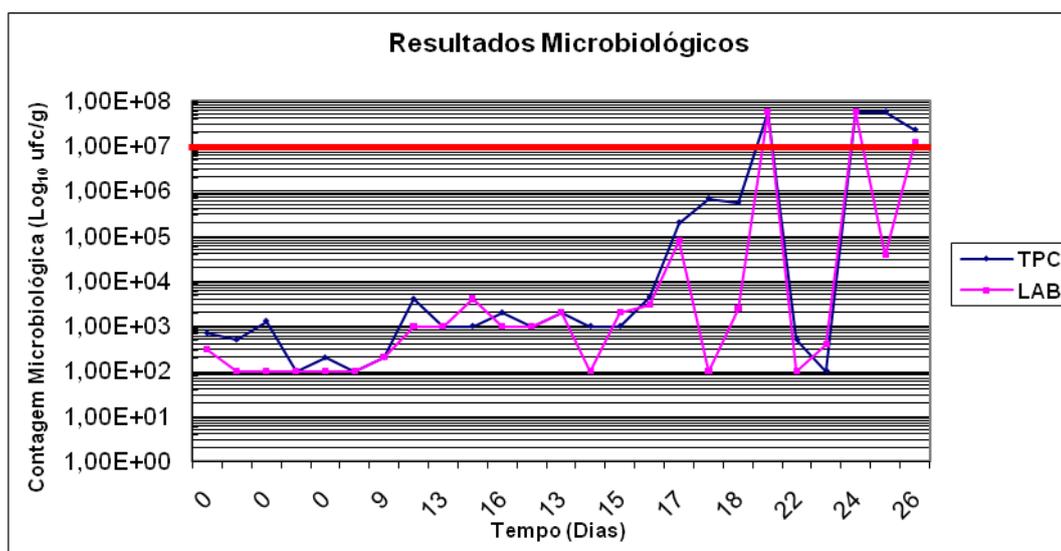


Figura 1: Contagem total de bactérias (TPC) e Contagem de bactérias lácticas (LAB) de salsichas estocadas a 6,5°C por um período de tempo de 26 dias.

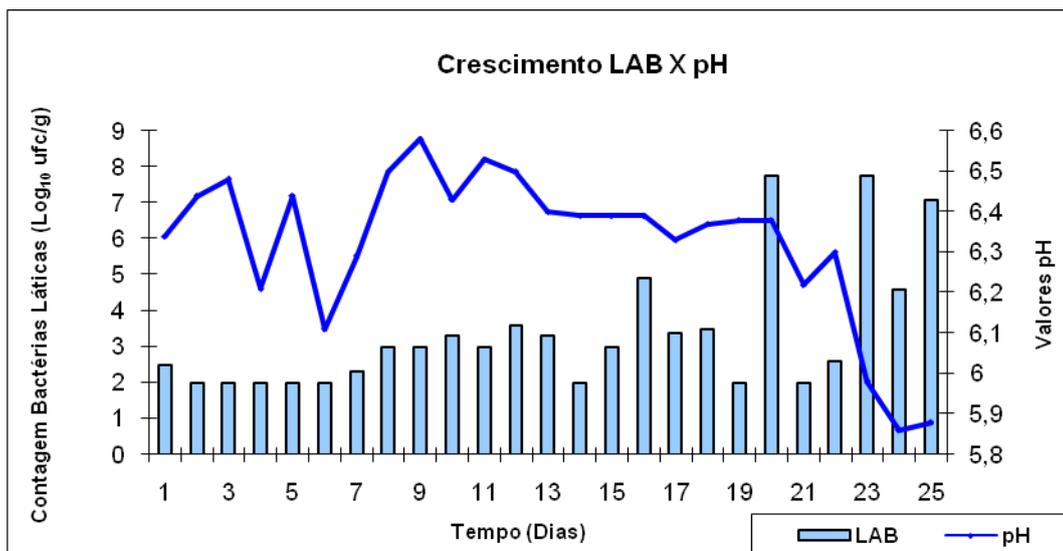


Figura 2: Contagem de bactérias lácticas (LAB) versus valor de pH de salsichas estocadas a 6,5°C por um período de tempo de 26 dias.



Figura 3: Aspecto visual da salsicha no tempo zero, ou seja, logo após processamento e antes da estocagem



Figura 4: Aspecto visual da salsicha em condições de término de estocagem a 6,5°C

Tabela 2: Resultados da intensidade de cor das salsichas estocadas à 6,5°C por um período de tempo de 26 dias

<i>Análise de Cor (Média de cinco medições por amostra)</i>										
<i>Tempo (Dias)</i>	<i>Amostra (n)</i>	<i>Superior</i>			<i>Meio</i>			<i>Inferior</i>		
		<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
0	1	53,74	39,19	56,37	52,98	39,57	56,79	53,34	39,03	56,58
0	2	53,07	39,71	56,38	52,78	40,08	56,37	53,07	40,04	56,56
0	3	50,94	38,04	50,91	50,66	38,17	50,93	50,81	38,65	50,88
0	4	52,30	39,12	50,22	52,37	39,35	55,39	52,06	38,94	55,36
0	5	51,66	39,13	55,50	51,48	39,53	54,14	51,30	39,37	53,71
7	6	53,66	37,28	55,38	53,69	37,86	56,41	53,61	36,68	56,21
9	7	53,32	37,53	55,34	53,62	37,16	55,72	53,47	37,57	55,22
11	8	53,65	38,22	55,31	52,98	38,27	55,31	53,03	38,09	55,28
13	9	52,12	38,45	53,75	52,18	38,39	53,28	52,37	38,25	53,27
13	10	51,92	39,66	53,77	51,56	40,56	53,76	51,24	40,22	53,24
14	11	52,83	38,31	54,29	52,43	38,83	54,08	52,67	38,65	54,19
15	12	54,57	37,91	57,19	54,15	37,89	56,41	54,12	38,30	56,65
15	13	52,18	38,89	54,06	51,76	39,47	53,39	51,65	39,55	52,73
16	14	51,84	38,65	52,72	51,95	38,79	52,86	50,81	41,29	51,78
16	15	54,22	37,37	57,20	53,95	37,38	56,51	53,79	37,49	56,28
17	16	54,70	37,26	56,89	54,09	37,96	56,43	53,96	37,95	56,08
18	17	53,82	37,70	55,77	54,13	37,53	56,61	53,79	37,63	56,03
19	18	53,93	37,25	56,89	54,69	36,69	57,71	54,11	37,07	57,09
20	19	52,38	38,35	53,93	52,36	38,59	54,43	52,41	38,35	54,50
21	20	53,21	37,78	54,02	53,54	37,45	54,57	53,38	37,73	54,96
22	21	53,47	35,97	54,76	53,56	35,88	52,25	53,65	36,18	54,36

Continuação Tabela 2: Resultados da intensidade de cor das salsichas estocadas à 6,5°C por um período de tempo de 26 dias

<i>Análise de Cor (Média de cinco medições por amostra)</i>										
<i>Tempo (Dias)</i>	<i>Amostra (n)</i>	<i>Superior</i>			<i>Meio</i>			<i>Inferior</i>		
		<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>B</i>
23	22	52,23	36,71	53,20	52,38	36,89	53,59	52,70	37,72	54,21
24	23	53,32	37,45	55,17	53,63	37,43	56,00	52,57	37,51	54,12
25	24	53,51	37,42	55,53	52,82	38,30	54,34	52,99	37,67	54,48
26	25	53,43	37,74	55,48	53,75	37,40	55,13	53,22	37,86	54,67

Legenda:

L: Luminosidade;

a: Vermelho;

b: Amarelo.

Tabela 3: Análise estatística dos resultados de intensidade de cor de salsicha estocadas à 6,5°C por um período de tempo de 26 dias

<i>Ensaio</i>	<i>Média de 25 amostras</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Valor Máximo</i>	<i>Valor p</i>
Luminosidade	52,93	50,66	54,70	0,00
Vermelho	38,19	35,88	41,29	0,00
Amarelo	54,81	50,22	57,71	0,00

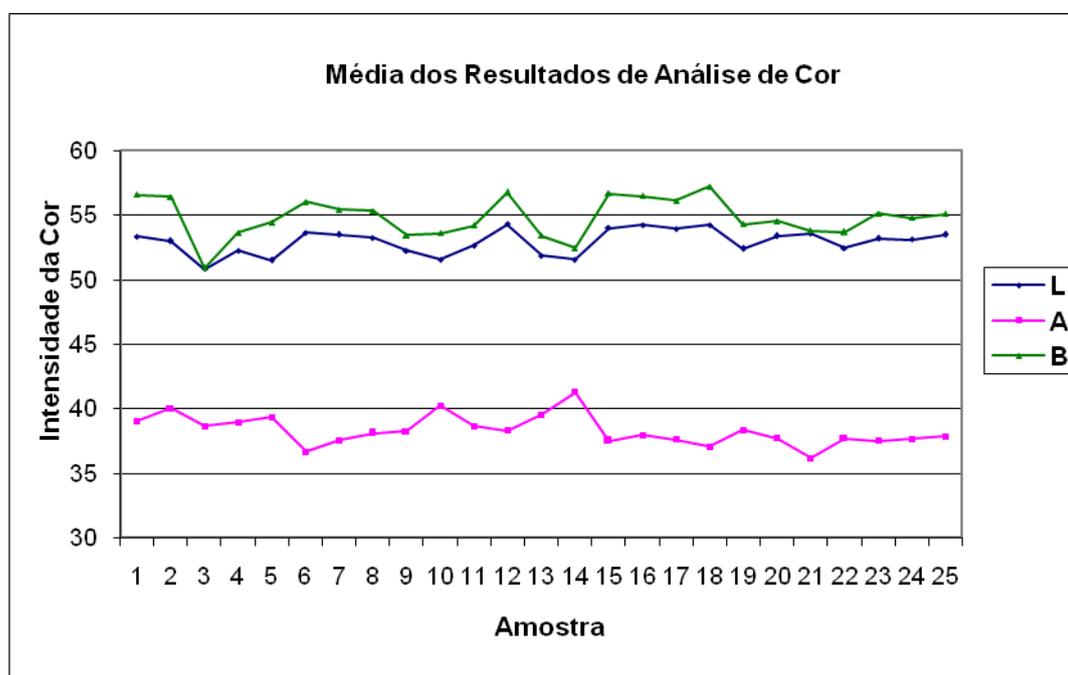


Figura 5: Média de cinco medições de intensidade de cor através da Luminosidade (L), da coloração Vermelho (a) e da coloração Amarelo (b) de salsichas estocadas a 6,5°C por um período de tempo de 26 dias.

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

De acordo com os resultados microbiológicos obtidos através do estudo realizado, observou-se claramente que o processo térmico aplicado ao produto em questão foi eficiente do ponto de vista de qualidade microbiológica e segurança alimentar, ou seja, as alterações decorrente do período de estocagem não colocam em risco a saúde dos consumidores.

Os microrganismos preconizados pela legislação brasileira RDC N°12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, sendo eles: contagem de coliformes a 45°C, contagem de clostrídios sulfito redutores, contagem de *Staphylococcus aureus* e pesquisa de *Salmonella* sp. apresentaram valores abaixo do padrão estabelecido que é no máximo 100 ufc/g para as contagens e ausência para *Salmonella* sp.

Além dos microrganismos solicitados pela legislação foram também pesquisados nas amostras de salsichas, porém não foi evidenciada a multiplicação significativa, contagem de coliformes a 35°C, de *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* sp, *Listeria monocytogenes* e *Listeria* sp.

A não detecção do *B. thermosphacta*, microrganismo integrante da microbiota deteriorante de produtos cárneos, pode ser devido a presença das bactérias lácticas. De acordo com pesquisas realizadas por Cayré et al (2005); Borch et al (1996) e Nielsen (1983) ocorre a inibição deste microrganismo quando evidencia-se a presença de bactérias lácticas em produtos cárneos embalados com filmes onde a permeabilidade de oxigênio presente na embalagem é baixa, que é o caso da embalagem usada nessa pesquisa.

Porém, de acordo com os valores apresentados na Tabela 1 observamos que durante o período de estocagem as bactérias que tiveram alteração significativa em função do tempo de estocagem foram: contagem total de bactérias e contagem de bactérias lácticas. Ainda na Tabela 1 evidencia-se uma mudança significativa dos valores de pH.

Os resultados sugerem que a contagem total de bactérias seja decorrente da multiplicação das bactérias lácticas, pois, conforme demonstrado na Figura 1, os valores dos ensaios microbiológicos seguem uma tendência, ou seja, tendem a um mesmo comportamento. Como exposto por Noskova (1978), Cayré et al

(2005), Giannuzzi et al (1998), Sakala et al (2002), Blickstad et al (1983), Von Holy et al (1991), Jay (2005), Mantis et al (2007), Pérez-Chabela et al (2008), Massager (2006), Ferreira (2004), Sachindra et al (2005), Liu et al (2006) e confirmado através dos testes realizados em produtos cárneos cozidos refrigerados e embalados em condições anaeróbias, as bactérias lácticas fazem parte da microbiota predominante.

Segundo Noskowa (1978) a multiplicação das bactérias lácticas é devido ao índice de carboidratos presente nas salsichas. Estas, inclusive, apresentam um comportamento irregular em sua estabilidade frente ao calor. Algumas cepas isoladas de produtos cárneos foram inativadas a uma temperatura de 60°C em tempos que oscilaram entre 1 e 28 minutos, porém outras linhagens, dentre elas, o *Lactobacillus viridescens*, não foi destruído quando submetido a uma temperatura de 80°C por 5 minutos, a 75°C em 10 minutos, a 70°C em 15 minutos, a 65°C em 30 minutos, a 60°C em 60 minutos, a 55°C em 120 minutos e a 50°C a 175 minutos; em outras pesquisas algumas cepas de *Lactobacillus* suportaram temperatura de 65°C por aproximadamente 120 minutos.

O processo térmico, o qual foi submetido às salsichas utilizadas para realização desse estudo consistiu em um túnel de cozimento, onde os produtos permanecem em seu interior até atingirem uma temperatura de 73°C. Desta forma, se levarmos em consideração a abordagem do pesquisador Noskowa, é possível que tenha ocorrido a sobrevivência das bactérias lácticas durante o processo de cozimento ao qual foram submetidas as salsichas.

Outros pesquisadores como Palumbo et al (1974) e Pérez-Chabela et al (2008) também chegaram a esta mesma conclusão em suas pesquisas e reforçam a possibilidade de sobrevivência deste microrganismo ao processo de cocção devido a sua resistência ao aquecimento, além de tolerarem quantidades de sal, nitrito e ao processo de defumação (Franz et al 1996).

Todas estas observações estão de acordo com os dados do presente estudo e justifica, desta forma, a multiplicação pós processamento durante o período de estocagem das salsichas.

Dentre as bactérias lácticas isoladas nesse estudo, as espécies predominantes, identificadas com auxílio do API 50CHL, foram *L. curvatus*,

seguido do *L. delbrueckii* e *L. plantarum*. Esses resultados são similares ao encontrado por Pérez-Chabela et al (2008) e Papamanoli et al (2003).

Neste estudo observou-se uma variação de pH de 6,58 a 5,86. De acordo com Borch et al (1996) e Metaxopoulos et al (2002) a produção de ácidos láctico ou acético produzidos pelas bactérias lácticas justifica a queda no valor de pH observado nas amostras no decorrer do tempo de estocagem.

Outras alterações que podem ser observadas em produtos cárneos processados, principalmente em salsichas, além da acidificação mensurada através das medições de pH citadas acima, podem ser evidenciadas ainda a viscosidade e presença de manchas esverdeadas.

A viscosidade observada nitidamente através da Figura 4 é oriunda da produção de ácido pelas bactérias lácticas, pois a viscosidade que ocorre na parte externa dos produtos é favorável em superfícies úmidas, ambiente característico dos pacotes de salsichas (JAY, 2005). Além disso, uma alta ligação foi observada entre as contagens microbiológicas de bactérias lácticas com a viscosidade, ou seja, quando a contagem microbiológica aproximou-se de 10^7 ufc/g iniciou-se um aumento considerável da viscosidade do líquido presente no interior dos pacotes. Esta característica evidencia uma aparência desagradável do produto aos olhos do consumidor e, portanto, tornou-se parâmetro de rejeição do consumidor. Esses resultados são compatíveis com os estudos Borch et al (1996), Mantis et al (2007), Massager (2006), Sachindra et al (2005), Korkeala et al (1989), Liu et al (2006) e Hamasaki et al (2003).

A presença de pintas esverdeadas não foi detectada nas amostras avaliadas, visto que, o fenômeno só ocorre em função da produção de H_2O_2 e geralmente aparece após a exposição ao oxigênio ou através da produção de H_2S , sendo que, este, normalmente não ocorre em pH abaixo de 6.

Outro microrganismo que apresenta características semelhantes são as leveduras, mas estas foram desconsideradas, pois em estudos já realizados (dados não publicados), este microrganismo não apresentou contagens consideráveis nas condições apresentadas no presente estudo.

Quanto à coloração do produto, notou-se uma diferença significativa entre os parâmetros analisados e expostos na Tabela 3, porém, este não foi decorrente do período de estocagem, visto que, não foi observada uma tendência ao

decréscimo ou aumento de algum atributo avaliado de luminosidade e das tonalidades vermelho e amarelo. Tal fato ocorreu, talvez, pela despadronização do processo de tingimento do produto. Visualmente estas diferenças não foram perceptíveis na avaliação sensorial.

Contudo, concluiu-se que a vida de prateleira das salsichas embaladas a vácuo foi determinada quando a contagem de bactérias lácticas chegou a um nível de 10^7 ufc/g em conjunto com a formação de viscosidade, a qual prejudicou visivelmente sua aparência. A contaminação das salsichas pelas bactérias citadas se deu pela capacidade termotolerante das bactérias lácticas e possivelmente por contaminação pós-tratamento térmico, durante o processo de embalagem. O tempo de vida de prateleira do produto exposto a uma temperatura de $6,5^{\circ}\text{C}$ é de aproximadamente 21 dias com probabilidade de 100% dos pacotes estarem sem alterações aparentes e aptas ao consumo humano.

5 BIBLIOGRAFIA

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Ago/1993. Clostrídios Sulfito Redutores e *Clostridium perfringes* em Alimentos. Determinação de Contagem em Placas. NBR 12893. Rio de Janeiro-RJ.

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Nov/1991. Microrganismos Viáveis Aeróbios em Alimentos. Contagem em Placas. MB 3462. Rio de Janeiro-RJ.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2001. Resolução – RDC N° 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico para Padrões Microbiológicos para Alimentos. Brasília-DF.

AOAC – OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. Method 991.14.

AOAC – OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. Method 993.07.

BLICKSTAD, E.; MOLIN, G. 1993. The Microbial Flora of Smoked Pork Loin and Frankfurter sausage Stored in Different Atmospheres at 4°C. *J. Appl. Bacteriol.* 54: 45-56.

BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M. I.; Blixt, Y. 1996. Bacterial Spoilage of Meat Products. *International Journal Food Microbiology.* 33: 103-120.

CAYRÉ, M. E.; GARRO, O.; VIGNOLO, G. 2005. Effect of Storage Temperature and Gas Permeability of Packing Film on the Growth of Lactic Acid Bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in Cooked Meat Emulsions. *Food Microbiology.* 22: 505-512.

FERREIRA, L. D. 2004. Utilização da Microbiologia Preditiva na Avaliação do Crescimento de Bactérias Ácido Láticas em Presunto Fatiado. Dissertação Mestrado Engenharia Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC.

FRANZ, C. M. A. P.; VON HOLY, A. 1996. Thermotolerance of Meat Spoilage Lactic Acid Bacteria and their Inactivation in Vacuum-Packages Vienna Sausages. *International Journal of Food Microbiology.* 29: 59-73.

GIANNUZZI, L.; PINOTTI, A.; ZARITZKY, N. 1998. Mathematical Modelling of Microbial Growth in Packaged Refrigerated Beef Storage at Different Temperature. *Journal Food Microbiology.* 39: 101-110.

HAMASAKI, Y.; AYAKI, M.; FUCHU, H.; SUGIYAMA, M.; MORITA, H. June 2003. Behavior of Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria Isolated from Spoiling Cooked Meat Products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (6): 3668-3671.

ISO INTERNACIONAL STANDARD. 15/10/2004. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Methods for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection Methods. ISO 11290-1.

ISO INTERNACIONAL STANDARD. 15/10/2004. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Methods for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 2: Enumeration Methods. ISO 11290-1.

JAY, J. M. 2005. Microbiologia de Alimentos. Editora Artmed. Sexta Edição. São Paulo-SP.

KORKEALA, H.; ALANKO, T.; MÄKELÄ, P.; LINDROTH, S. 1989. Shelf life of Vacuum-Packed Cooked Ring Sausages at Different Chill Temperatures. *International Journal Of Food Microbiology*. 9: 237-247.

LIU F.; YANG, R. Q.; LI, Y. F. 2006. Correlations Between Growth Parameters of Spoilage Micro-organisms and Shelf-life of Pork Stored Under Air and Modified Atmosphere at -2, 4 and 10°C. *Food Microbiology*. 23: 578-583.

MANTIS, F.; BURRIEL, A. R.; SABATAKOU, O.; VACALOPOULOS, A.; RAMANTANIS, S. 2007. Some Factors Determining the Shelf Life of Vacuum Packed Heat-Treated Greek Sausages. *Veterinarski Arhiv*. 77 (3): 229-235.

MASSAGER, P. R. 2006. Microbiologia dos Processos Alimentares. Livraria Varela. São-Paulo-SP.

METAXOPOULOS, J.; MATARAGAS, M.; DROSINOS, E.H. 2002. Microbial Interaction in Cooked Cured Meat Products Under Vacuum or Modified Atmosphere at 4°C. *J. Appl. Microbiol*. 93: 363-373.

NIELSEN, H.J.S. 1983. Influence of Temperature and Gas Permeability of Packaging Film on Development and Composition of Microbial Flora in Vacuum-Packed Bologna-Type Sausage. *Journal Food Protection*. 46: 693-698.

NOSKOWA, G. L. 1978. Microbiologia de las Carnes Conservadas por el Frio. Editorial Acribia S.A., Zaragoza-España.

PALUMBO, S. A.; HUHTANEN, C. N.; SMITH, J. L. 1974. Microbiology of The Frankfurter Process: Salmonella and Natural Aerobic Flora. *Applied Microbiology*. 27 (4): 724-732.

PAPAMANOLI, E.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; KOTZEKIDOU, P. 2003. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from a Greek Dry-Fermented Sausage in Respect of their Technological and Probiotic Properties. *Meat Science*. 65: 859-867.

PÉREZ-CHABELA, M. L.; TOTOSAUS, A.; GUERRERO, I. Jan-Mar/2008. Evaluation of Thermotolerant Capacity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Commercial Sausages and the Effects of their Addition on the Quality of Cooked Sausages. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. Campinas. 28 (1): 132-138.

SACHINDRA, N. M.; SAKHARE, P. Z.; YASHODA K. P.; NARASIMHA RAO, D. 2005. Microbial Profile of Buffalo Sausage During Processing and Storage. *Food Control*. 16: 31-35.

SAKALA, R. M.; HAYASHIDANI, H.; KATO, Y.; HIRATA, T.; MAKINO, Y.; FUKUSHIMA, A.; YAMADA, T.; KANEUCHI, C.; OGAWA, M. 2002. Change in the Composition of the Microflora on Vacuum-Packaged Beef During Chiller Storage. *International Journal Food Microbiology*. 74: 87-99.

STRAPASSON, E. Comparação de Modelos com Censura Intervalar em Análise de Sobrevivência. Tese Doutorado Estatística e Experimentação Agronômica. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba-SP.

THIEMIG, F.; BUHR, H. und WOLF, G. 1998. Charakterisierung der Haltbarkeit und des Verderbsverhaltens Frischer Lebensmittel. *Fleishwirtschaft*. 78 (2): 152-154.

VON HOLY, A.; CLOETE, T.E.; DYKES, D.A. 1991. Quantification and Characterization of Microbial Populations Associated with Spoiled, Vacuum-Packed Vienna Sausages. *Journal Food Microbiology*. 8:95-104.

**CAPÍTULO 3: ESTIMATIVA DE VIDA DE PRATELEIRA DE
SALSICHA ESTOCADAS A DIFERENTES
TEMPERATURAS**

CAPÍTULO 3: ESTIMATIVA DE VIDA DE PRATELEIRA DE SALSICHA ESTOCADAS A DIFERENTES TEMPERATURAS

1 INTRODUÇÃO

Os produtos industrializados ocupam uma parcela cada vez maior do mercado de alimentos. Eles estão cada vez mais práticos, pois já vêm prontos para o consumo ou então, semiprontos. O único trabalho é abrir a embalagem, que inclusive, estão cada vez mais fáceis de abrir e aquecer por alguns minutos em forno microondas. Além da praticidade, os alimentos industrializados também possuem um prazo de validade bem maior do que os produtos "in natura", tornando fácil a estocagem. Estes produtos vieram para ficar e representam uma solução para a vida atropelada das grandes cidades.

A vida de prateleira é um atributo importante de todos os alimentos. Pode ser definido como o tempo que se passa desde a produção e embalagem até o ponto em que ele se torna inaceitável para o consumo. É relacionado, então, com a qualidade total do alimento e diretamente ligado ao planejamento da produção, às especificações dos ingredientes, ao processo de manipulação e à estocagem. A vida de prateleira depende do alimento e é essencial que os produtores identifiquem os parâmetros intrínsecos e extrínsecos que limitam esse período.

Devido à complexidade da composição dos alimentos, a previsão da sua vida de prateleira não é uma tarefa fácil e de resultado preciso. Contudo, é sempre muito importante ter o máximo de informações sobre o alimento a conservar, pois isto, aliado a um bom conhecimento do mecanismo ou da cinética das reações de deterioração irá possibilitar uma estimativa da sua vida de prateleira, além de orientar quanto às condições mais adequadas de conservação, àquele tipo particular de alimento.

A necessidade de encontrar produtos com maior prazo de validade, maior confiabilidade e rapidez, faz com que novos métodos sejam incorporados para suprir estas necessidades e agilizar o envio de novos produtos para o mercado.

Para avaliar qual o processo de deterioração que ocorre durante a estocagem, foram realizados ensaios microbiológicos como contagem total de bactérias e bactérias lácticas, ensaio físico-químico para determinação do valor de pH além de ensaio sensorial que possibilitou averiguar o aparecimento de viscosidade no interior da embalagem.

Este estudo teve como objetivo estimar o *vida de prateleira* de salsichas embaladas a vácuo estocadas em temperatura controlada de 2°C, 6,5°C, 15°C e 21°C.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DE AMOSTRAS E PLANO DE AMOSTRAGEM

A pesquisa foi elaborada com 135 amostras de salsichas coletadas imediatamente após a embalagem. Cada amostra contempla 1 (um) pacote embalado à vácuo contendo aproximadamente 1kg de produto. A coleta foi realizada em 5 dias subseqüentes, sendo que a cada dia foi coletado 5 pacotes, conforme definido por Thiemig, Buhr e Wolf (1998). Esta técnica de amostragem permite avaliar o produto, em um único dia, com tempos diferentes de estocagem, ou seja, no sexto dia, por exemplo, se pode avaliar pacotes com 1, 2, 3, 4 e 5 dias de vida de prateleira. Desta forma, é possível avaliar a evolução do processo de deterioração mais nitidamente, visto que, a deterioração conjunta dos produtos dificulta a observação do pesquisador, pois vários pacotes podem deteriorar num mesmo dia, tornando a tarefa do analista excessivamente árdua. Dos 5 pacotes coletados diariamente, um foi destinado ao ensaio inicial microbiológico, físico-químico e sensorial, restando, portanto, 4 pacotes para continuação do teste. Os pacotes foram estocados em refrigerador com temperatura controlada de aproximadamente 2°C, 6,5°C, 15°C e 21°C utilizando para controle da temperatura um registrador calibrado tipo "TempRecord (Didai – Brasil/Nova Zelândia)". As análises foram realizadas em dois tempos A e B, sendo que foram respeitados os mesmos parâmetros de estocagem com o intuito de avaliar a repetibilidade dos resultados. Os pacotes restantes foram avaliados diariamente visualmente por uma equipe experiente, afim de detectar a presença de viscosidade no interior dos pacotes. De acordo com os intervalos de tempo pré-determinados apresentados nas tabelas 1, 2, 3 e 4 foram realizados ensaios microbiológicos, físico-químicos e sensoriais.

Em caso de dúvidas durante a avaliação sensorial, mais de um pacote poderia ser aberto a fim de confirmar os resultados através de ensaios laboratoriais, tendo portanto neste dia, mais de uma avaliação. Para estes dias onde mais de um pacote foi avaliado, a análise de dados, foi realizada através da

média dos resultados destes dias, automaticamente calculada pelo software utilizado (Statistica 7.1).

Foi considerado inapto para o consumo e fim da vida de prateleira amostras com presença excessiva de viscosidade ou contagem microbiológica superior a 10^7 ufc/g. Estas amostras receberam a denominação de “falha”. As amostras avaliadas e aptas para consumo receberam a denominação de “censura” para fins de cálculos estatísticos.

2.2 ENSAIOS LABORATORIAIS

Os ensaios microbiológicos realizadas nas amostras foram somente as que tiveram diferença significativa apresentada no capítulo 2, ou seja, contagem total de bactérias (PCA – Plate Count Agar, Merk, Germany – ABNT – MB 3462), contagem de bactérias lácticas (MRS – Lactobacilli MRS Agar, Acumedia, Michigan). A análise físico-química realizada foi pH e também foi observada nas unidades amostrais a presença de viscosidade.

Os pacotes foram armazenados em dois lotes (denominados no banco de dados como A e B) e, periodicamente eram feitas inspeções visuais para avaliar as condições do produto armazenado. Caso houvesse suspeita de comprometimento, o pacote correspondente era aberto e análises laboratoriais eram realizadas a fim de confirmar a suspeita. Caso não houvessem suspeitas de contaminação na inspeção visual, um pacote era selecionado ao acaso e análises laboratoriais eram realizadas para confirmar o não comprometimento.

2.3 ENSAIOS ESTATÍSTICOS

Os dados foram analisados com auxílio do software estatístico *Statistica* versão 7.1 para avaliação da vida de prateleira das amostras utilizando a análise de sobrevivência com estimador de Kaplan Meier.

3 RESULTADOS

As amostras foram avaliadas em períodos de tempo pré-determinados a fim de detectar os principais parâmetros microbiológicos, físico-químicos e sensoriais envolvidos no processo de deterioração no decorrer do tempo de estocagem.

As Tabelas 1, 2, 3 e 4 apresentam os resultados significativos dos ensaios microbiológicos em logaritmo e ensaio físico-químico das amostras de salsichas estocadas a 2°C durante 1392 horas ou 58 dias; estocadas a 6,5°C durante 624 horas ou 26 dias; estocadas a 15°C durante 168 horas ou 7 dias e estocadas a 21°C durante 84 horas ou 3,5 dias respectivamente.

De acordo com os resultados observou-se diferença significativa nos ensaios microbiológicos de contagem total de bactérias e contagem de bactérias lácticas e no ensaio físico-químico de pH.

Para a contagem total de bactérias os resultados partiram de uma contagem média de 2,33 Log₁₀ ufc/g observada no início do período de estocagem para 8,02 Log₁₀ ufc/g observada no término da vida de prateleira. Já as bactérias lácticas iniciaram com uma contagem média inicial de 2,06 Log₁₀ ufc/g e terminaram com valor médio de 7,87 Log₁₀ ufc/g.

Os valores de pH também oscilaram em decorrência do tempo de estocagem e apresentaram uma variação média de 0,49, ou seja, partiram de um valor médio de 6,53 para 6,04 no término da vida de prateleira. Uma correlação considerável foi verificada entre os ensaios microbiológicos de contagem total de bactérias com a multiplicação das bactérias lácticas demonstrada nas Figuras 1, 2, 3 e 4. Outra ligação foi observada nas Figuras 5, 6, 7 e 8, pois conforme aumenta a multiplicação das bactérias lácticas, simultaneamente, ocorre o decréscimo do valor de pH.

Quanto ao aspecto sensorial uma das alterações percebidas foi o aparecimento de viscosidade exatamente como exposto no capítulo 2

As figuras 9, 10, 11 e 12 apresentam o gráfico da função de sobrevivência das amostras de salsichas estocadas a 2°C, 6,5°C, 15°C e 21°C. Esses dados apresentam-se também distribuídos nas Tabelas 5, 6, 7 e 8.

Tabela 1: Resultados microbiológicos e físico-químicos das amostras de salsicha estocadas à 2°C por um período de tempo de 1392 horas.

TESTE A					TESTE B				
Tempo (Horas)	Nº Amostras	Contagem Bactérias Totais	Contagem Bactérias Lácticas	pH	Tempo (Horas)	Nº Amostras	Contagem Bactérias Totais	Contagem Bactérias Lácticas	pH
0	1	3,40	2,00	6,42	0	1	3,340	2,00	6,42
0	2	4,16	3,74	6,33	0	2	4,16	3,74	6,33
0	3	3,60	2,30	6,36	0	3	3,60	2,30	6,36
0	4	3,28	2,30	6,34	0	4	3,28	2,30	6,34
168	5	3,94	2,78	6,44	168	5	3,58	2,84	6,45
336	6	3,52	2,00	6,41	336	6	3,41	3,23	6,47
504	7	3,00	3,00	6,58	504	7	3,00	3,00	6,54
648	8	3,00	3,00	6,47	648	8	3,00	3,00	6,47
720	9	4,61	3,00	6,47	720	9	5,04	3,00	6,49
864	10	4,72	4,82	6,44	864	10	5,44	5,61	6,49
936	11	3,30	3,00	6,48	936	11	3,00	3,00	6,42
960	12	4,57	4,20	6,39	960	12	4,71	3,70	6,38
984	13	5,78	5,99	6,43	984	13	5,62	3,00	6,35
1008	14	6,26	5,41	6,5	1008	14	6,28	3,00	6,49
1032	15	7,22	6,98	6,41	1032	15	6,45	6,25	6,43
1056	16	7,00	7,53	6,44	1056	16	6,50	6,68	6,44
1080	17	7,78	7,51	6,42	1080	17	6,20	5,90	6,6
1128	18	7,78	7,79	6,51	1128	18	6,40	6,30	6,45
1152	19	6,61	7,59	6,41	1152	19	7,13	6,97	6,41
1176	20	6,87	6,83	6,41	1176	20	6,84	6,96	6,43
1200	21	6,76	6,57	6,5	1200	21	6,99	6,91	6,42
1224	22	4,04	3,00	6,49	1224	22	7,00	6,70	6,23
1320	23	7,13	7,11	6,38	1320	23	7,12	7,22	6,34
1368	24	5,51	5,09	6,43	1368	24	7,50	7,02	6,32
1392	25	-	-	-	1392	25	3,40	2,00	6,42
1392	26	-	-	-	1392	26	4,16	3,74	6,33

Tabela 2: Resultados microbiológicos e físico-químicos das amostras de salsicha estocadas à 6,5°C por um período de tempo de 624 horas.

TESTE A					TESTE B				
Tempo (Horas)	Nº Amostras	Contagem Bactérias Totais	Contagem Bactérias Lácticas	pH	Tempo (Horas)	Nº Amostras	Contagem Bactérias Totais	Contagem Bactérias Lácticas	pH
0	1	2,00	2,00	6,31	0	1	2,85	2,48	6,34
0	2	2,00	2,00	6,40	0	2	2,70	2,00	6,44
0	3	2,85	2,70	6,49	0	3	3,11	2,00	6,48
0	4	2,30	2,00	6,50	0	4	2,00	2,00	6,21
0	5	2,30	2,30	6,44	0	5	2,30	2,00	6,44
168	6	2,48	2,54	6,38	168	6	2,00	2,00	6,11
216	7	2,00	2,30	6,28	216	7	2,30	2,30	6,29
264	8	3,70	3,00	6,25	264	8	3,60	3,00	6,50
312	9	3,00	3,00	6,35	312	9	3,00	3,00	6,58

Continuação Tabela 2: Resultados microbiológicos e físico-químicos das amostras de salsicha estocadas à 6,5°C por um período de tempo de 624 horas.

312	10	3,48	3,30	6,39	312	10	3,00	3,60	6,50
336	11	3,60	3,00	6,50	336	11	3,30	3,00	6,39
360	12	3,54	3,48	6,37	360	12	3,00	3,00	6,53
360	13	3,00	3,00	6,42	360	13	3,30	3,30	6,43
384	14	4,40	4,23	6,40	384	14	3,00	2,00	6,39
384	15	3,85	3,00	6,33	384	15	3,00	3,30	6,40
408	16	4,88	4,78	6,50	408	16	3,65	3,48	6,37
432	17	6,04	5,98	6,23	432	17	5,30	5,94	6,39
456	18	5,76	5,48	6,37	456	18	5,83	2,00	6,38
480	19	5,90	5,88	6,38	480	19	5,74	3,38	6,33
504	20	7,04	7,76	6,18	504	20	7,76	7,76	6,38
528	21	7,76	7,76	5,95	528	21	2,70	2,00	6,22
552	22	5,90	5,83	6,30	552	22	2,00	2,60	6,30
576	23	6,69	7,76	5,90	576	23	7,76	7,76	5,98
600	24	7,51	7,76	5,92	600	24	7,76	4,59	5,86
624	25	7,76	7,68	5,98	624	25	7,36	7,08	5,88

Tabela 3: Resultados microbiológicos e físico-químicos das amostras de salsicha estocadas à 15°C por um período de tempo de 168 horas.

TESTE A					TESTE B				
Tempo (Horas)	Nº Amostras	Contagem Bactérias Totais	Contagem Bactérias Lácticas	pH	Tempo (Horas)	Nº Amostras	Contagem Bactérias Totais	Contagem Bactérias Lácticas	pH
0	1	3,43	2,00	6,31	0	1	2,00	2,00	6,34
0	2	3,20	2,30	6,40	0	2	2,00	2,00	6,44
0	3	2,00	2,00	6,49	0	3	2,70	2,00	6,48
0	4	2,65	2,00	6,50	0	4	2,30	2,00	6,21
24	5	4,93	2,00	6,44	24	5	3,00	2,00	6,44
24	6	3,00	2,45	6,38	24	6	3,70	2,78	6,11
48	7	2,70	2,00	6,28	48	7	3,30	3,30	6,29
60	8	3,00	3,00	6,25	60	8	4,73	3,30	6,50
72	9	5,83	5,86	6,35	72	9	3,38	3,48	6,58
72	10	3,66	3,00	6,39	72	10	5,78	5,65	6,50
84	11	3,48	3,00	6,50	84	11	4,77	4,81	6,39
96	12	6,52	6,08	6,37	96	12	5,66	5,08	6,53
96	13	6,76	6,76	6,42	96	13	6,01	6,76	6,43
96	14	5,96	5,90	6,40	96	14	5,98	5,95	6,39
96	15	3,95	3,87	6,33	96	15	6,18	6,16	6,40
108	16	4,66	3,60	6,50	108	16	6,76	6,76	6,37
120	17	6,76	6,76	6,23	120	17	6,76	6,76	6,39
120	18	7,00	7,00	6,37	120	18	7,30	7,18	6,38
144	19	8,26	6,53	6,38	144	19	7,54	6,64	6,33
144	20	8,15	7,70	6,18	144	20	7,95	7,93	6,38
156	21	7,71	7,66	5,95	156	21	7,77	7,70	6,22
168	22	7,78	7,70	6,30	168	22	7,41	7,60	6,30
168	23	8,18	6,93	5,90	168	23	8,05	6,97	5,98

Tabela 4: Resultados microbiológicos e físico-químicos das amostras de salsicha estocadas à 21°C por um período de tempo de 84 horas.

TESTE A					TESTE B				
Tempo (Horas)	Nº Amostras	Contagem Bactérias Totais	Contagem Bactérias Lácticas	pH	Tempo (Horas)	Nº Amostras	Contagem Bactérias Totais	Contagem Bactérias Lácticas	pH
0	1	2,65	1,00	6,36	0	1	2,00	2,00	6,39
12	2	3,60	3,30	6,37	12	2	2,30	3,30	6,37
24	3	3,26	3,28	6,45	24	3	4,00	2,70	6,40
30	4	7,90	7,75	6,37	30	4	4,89	3,00	6,31
33	5	4,70	4,25	6,40	33	5	5,65	5,30	6,39
36	6	3,00	3,00	6,35	36	6	5,43	5,51	6,33
42	7	4,73	4,46	6,36	42	7	3,41	3,48	6,30
48	8	5,63	5,30	6,46	48	8	4,64	4,40	6,38
51	9	3,76	3,59	6,41	51	9	5,95	5,95	6,42
54	10	5,88	5,32	6,40	54	10	5,73	5,45	6,44
57	11	5,54	4,38	6,45	57	11	6,96	6,00	6,36
60	12	6,90	6,03	6,37	60	12	6,90	6,90	6,37
63	13	7,00	5,00	6,31	63	13	7,08	5,00	6,30
66	14	7,25	6,40	6,37	66	14	6,20	6,20	6,26
69	15	8,00	8,06	6,08	69	15	8,02	8,05	6,18
72	16	7,26	6,40	6,38	72	16	8,04	7,76	6,38
75	17	7,85	7,25	6,37	75	17	7,98	7,83	6,22
78	18	7,64	7,78	6,34	75	18	9,09	7,98	6,16
81	19	6,68	6,36	6,19	78	19	7,95	7,72	6,15
84	20	6,00	7,34	6,22	78	20	8,00	8,09	6,20
-	-	-	-	-	81	21	8,43	8,48	6,17
-	-	-	-	-	81	22	7,99	7,00	6,12
-	-	-	-	-	84	23	8,78	8,76	6,08

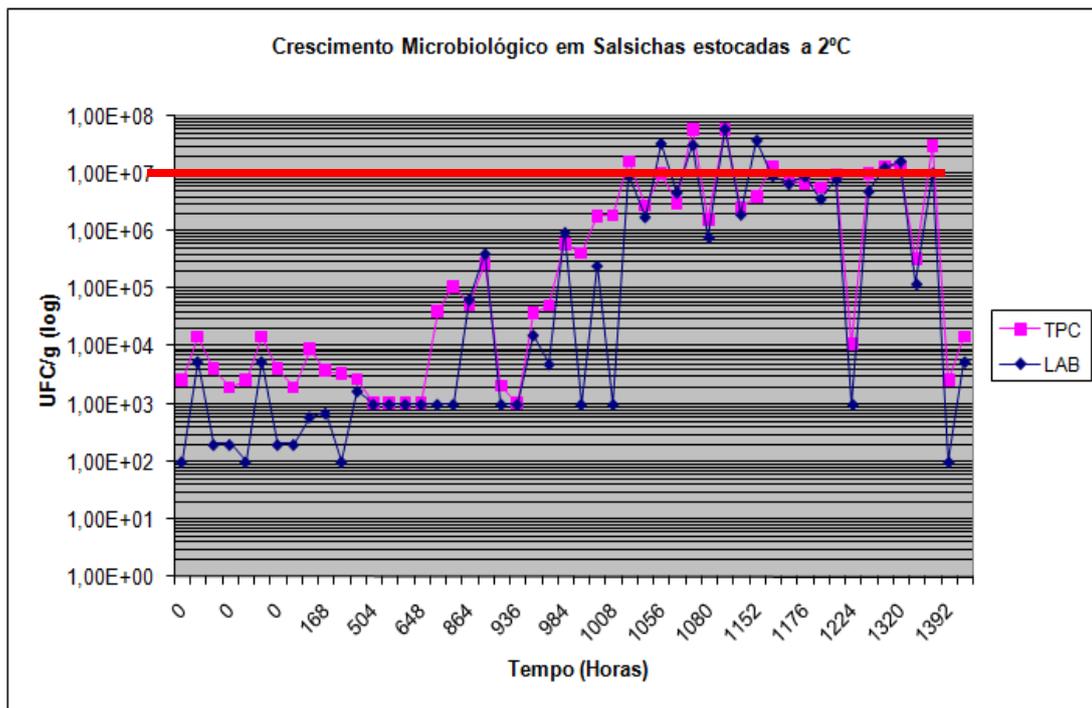


Figura 1: Contagem total de bactérias (TPC) e Contagem de bactérias lácticas (LAB) de salsichas estocadas a 2°C por um período de tempo de 1392 horas.

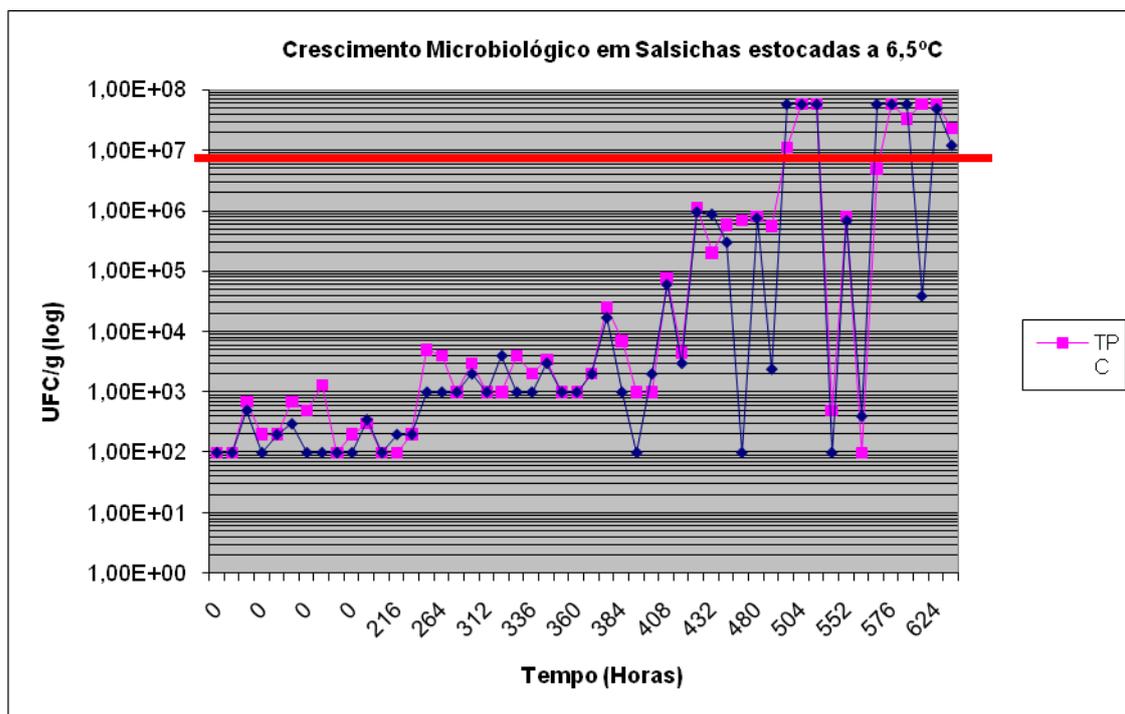


Figura 2: Contagem total de bactérias (TPC) e Contagem de bactérias lácticas (LAB) de salsichas estocadas a 6,5°C por um período de tempo de 624.

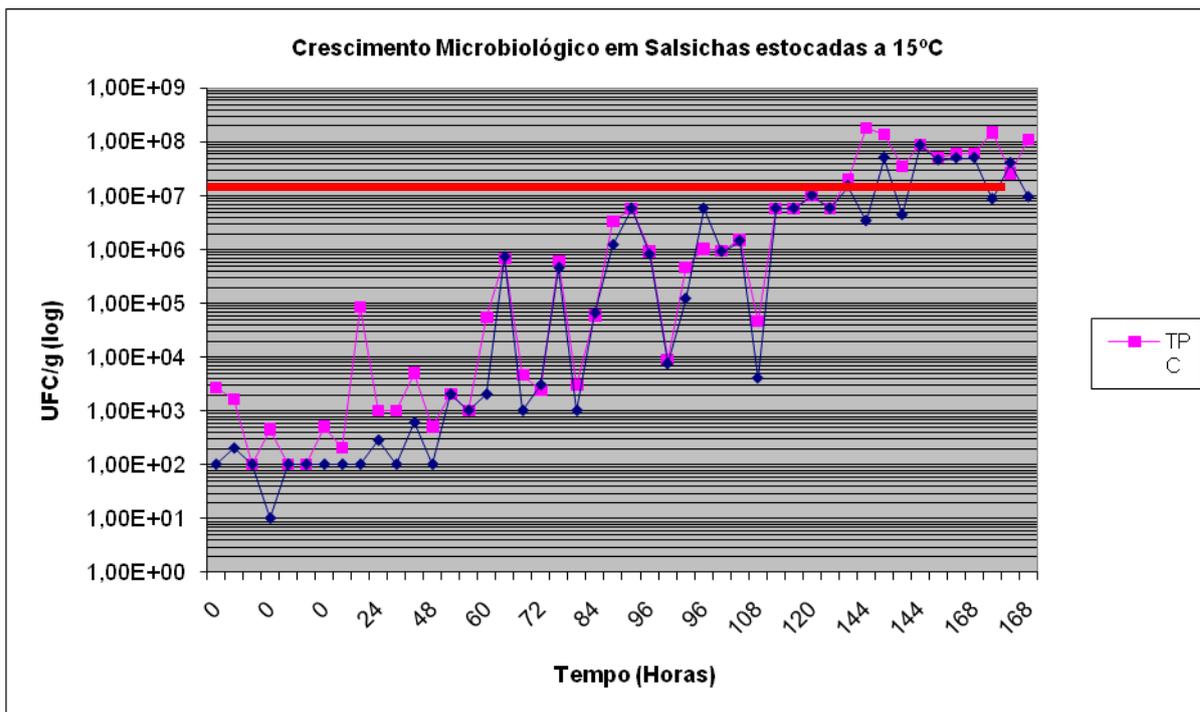


Figura 3: Contagem total de bactérias (TPC) e Contagem de bactérias lácticas (LAB) de salsichas estocadas a 15°C por um período de tempo de 168 horas.

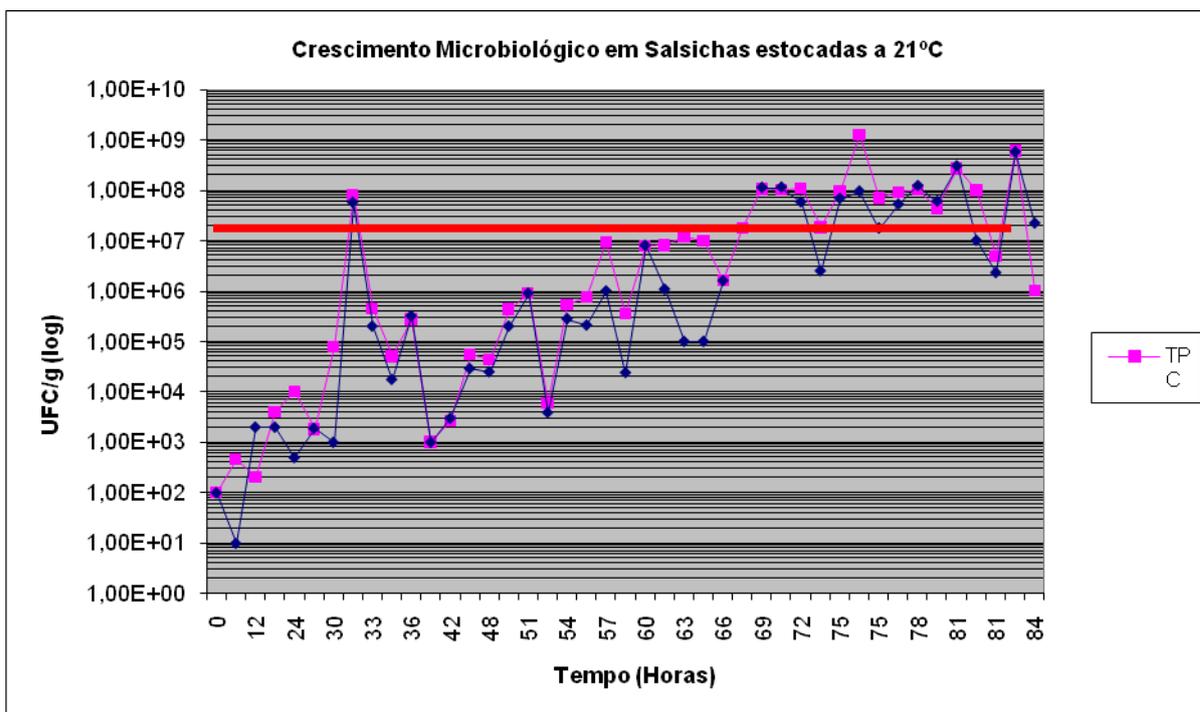


Figura 4: Contagem total de bactérias (TPC) e Contagem de bactérias lácticas (LAB) de salsichas estocadas a 21°C por um período de tempo de 84 horas.

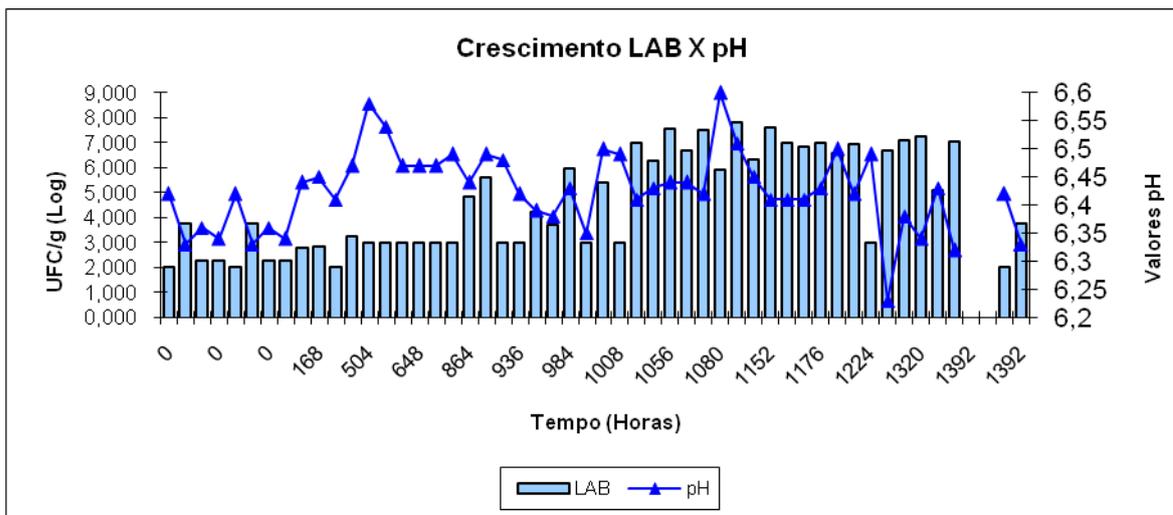


Figura 5: Contagem de bactérias lácticas (LAB) versus valor de pH de salsichas estocadas a 2°C por um período de tempo de 1392 horas.

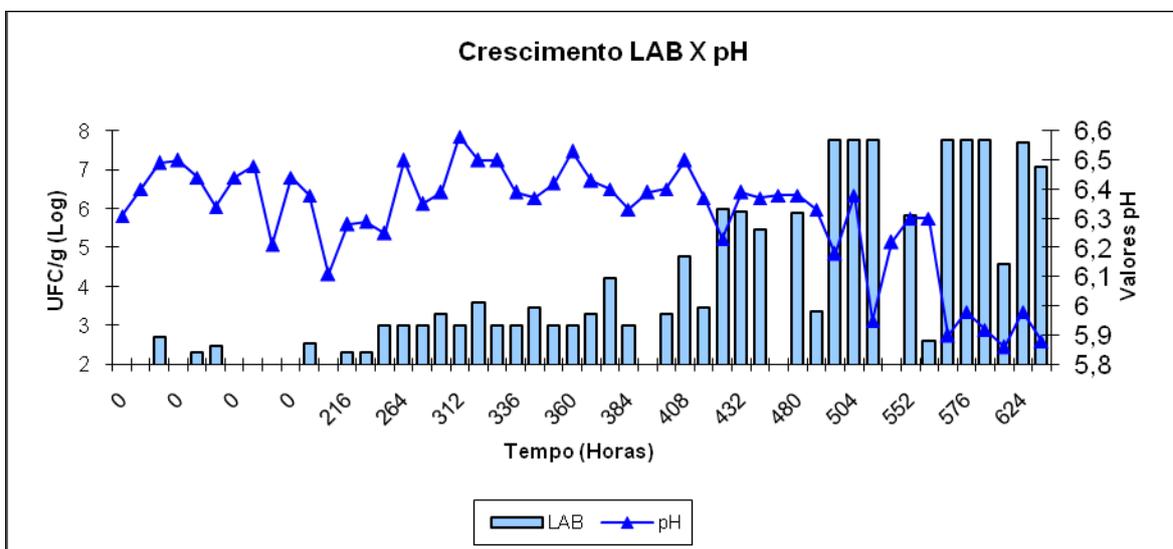


Figura 6: Contagem de bactérias lácticas (LAB) versus valor de pH de salsichas estocadas a 6,5°C por um período de tempo de 624 horas

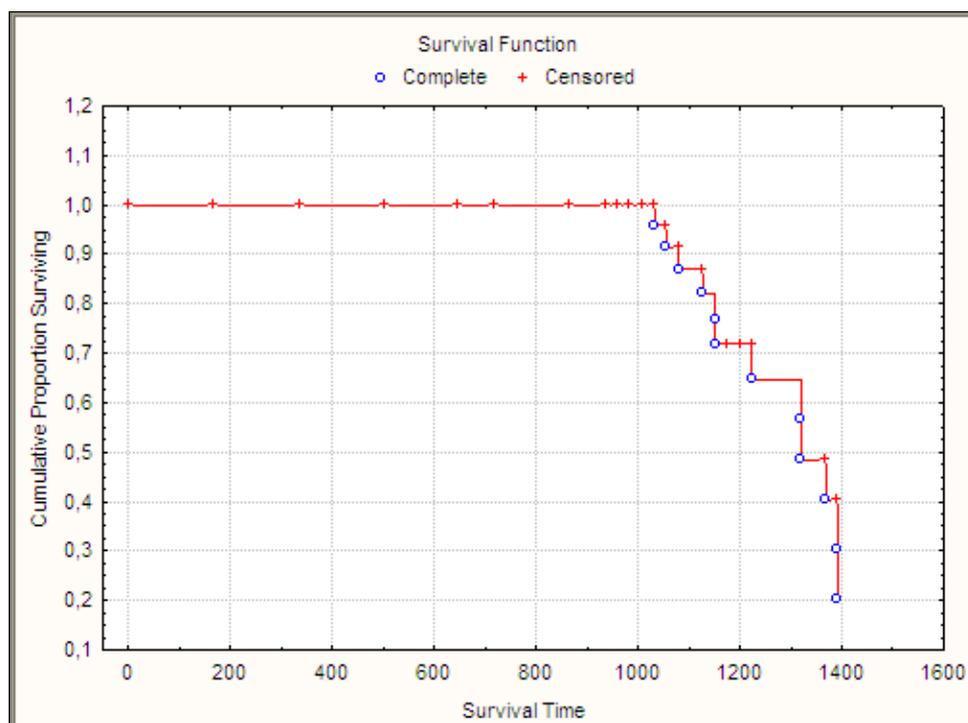


Figura 9: Função de sobrevivência das salsichas estocadas a 2°C por um período de tempo de 1392 horas

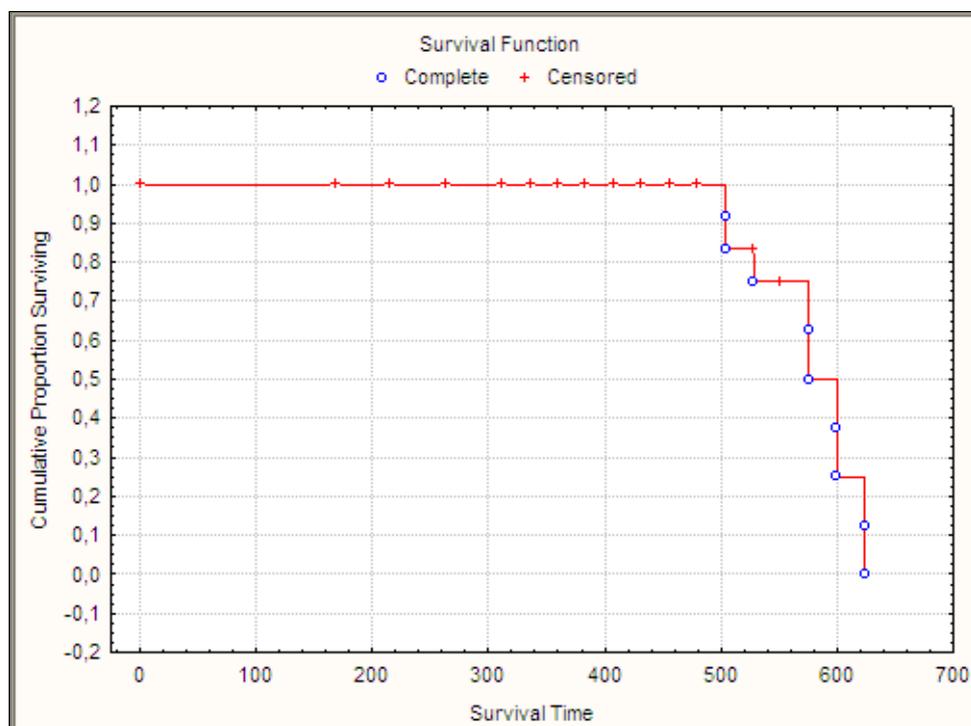


Figura 10: Função de sobrevivência das salsichas estocadas a 6,5°C por um período de tempo de 624 horas

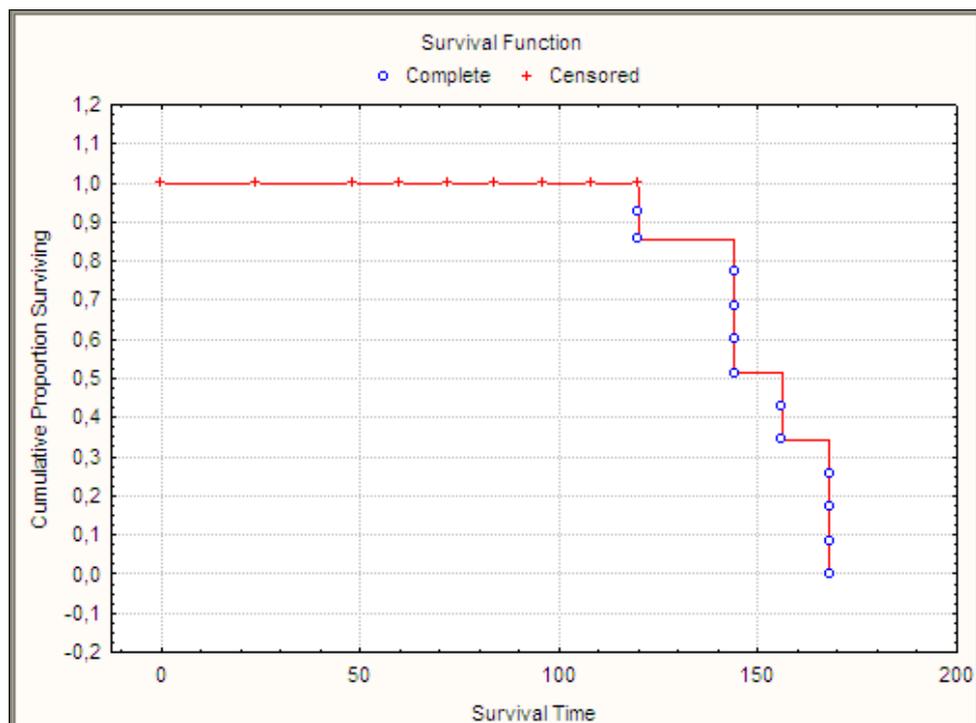


Figura 11: Função de sobrevivência das salsichas estocadas a 15°C por um período de tempo de 168 horas

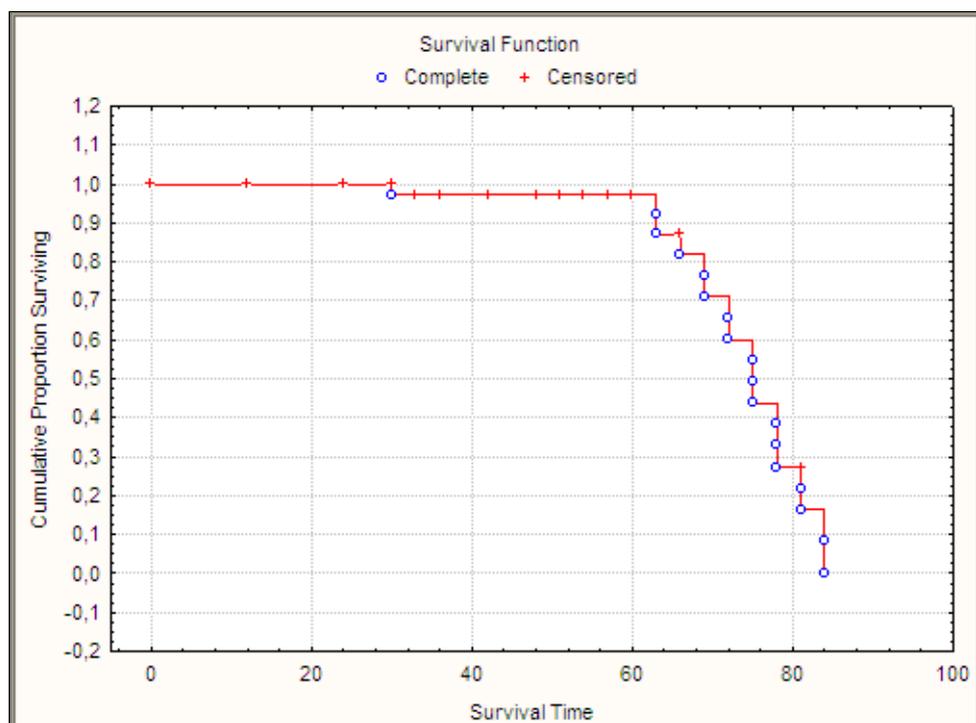


Figura 12: Função de sobrevivência das salsichas estocadas a 21°C por um período de tempo de 84 horas

Tabela 5: Análise estatística da função de sobrevivência das amostras de salsicha estocadas à 2°C por um período de tempo de 1392 horas.

<i>Tempo de Falha (Horas)</i>	<i>Sobrevivência Cumulativa</i>	<i>Erro Padrão</i>
1008	1,00	0,00
1032	0,95	0,04
1056	0,91	0,06
1080	0,87	0,07
1128	0,82	0,08
1152	0,77	0,09
1152	0,72	0,1
1224	0,65	0,11
1320	0,56	0,12
1320	0,48	0,13
1368	0,40	0,13
1392	0,30	0,13
1392	0,20	0,12

Tabela 6: Análise estatística da função de sobrevivência das amostras de salsicha estocadas à 6,5°C por um período de tempo de 624 horas.

<i>Tempo de Falha (Horas)</i>	<i>Sobrevivência Cumulativa</i>	<i>Erro Padrão</i>
480	1,00	0,00
504	0,91	0,08
504	0,83	0,11
528	0,75	0,12
576	0,62	0,15
576	0,50	0,16
600	0,37	0,16
600	0,25	0,15
624	0,12	0,11
624	0,00	0,00

Tabela 7: Análise estatística da função de sobrevivência das amostras de salsicha estocadas à 15°C por um período de tempo de 168 horas.

<i>Tempo de Falha (Horas)</i>	<i>Sobrevivência Cumulativa</i>	<i>Erro Padrão</i>
108	1,00	0,00
120	0,92	0,06
120	0,86	0,09
144	0,77	0,12
144	0,68	0,13
144	0,60	0,14
144	0,51	0,14
156	0,42	0,14
156	0,34	0,13
168	0,25	0,12
168	0,17	0,11
168	0,08	0,08
168	0,00	0,00

Tabela 8: Análise estatística da função de sobrevivência das amostras de salsicha estocadas à 21°C por um período de tempo de 84 horas.

<i>Tempo de Falha (Horas)</i>	<i>Sobrevivência Cumulativa</i>	<i>Erro Padrão</i>
24	1,00	0,00
30	0,97	0,02
63	0,92	0,05
63	0,87	0,07
66	0,81	0,08
69	0,76	0,09
69	0,71	0,10
72	0,65	0,10
72	0,60	0,11
75	0,54	0,11
75	0,49	0,11
75	0,43	0,11
78	0,38	0,11
78	0,32	0,10
78	0,27	0,10
81	0,21	0,09
81	0,16	0,08
84	0,08	0,07
84	0,00	0,00

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Conforme podemos observar através dos resultados dispostos acima os valores tendem a ter um mesmo comportamento em todas as temperaturas. De acordo com os valores apresentados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4 notou-se que durante o período de estocagem as bactérias que tiveram alteração significativa em função do tempo de estocagem foram: contagem total de bactérias e contagem de bactérias láticas. Ainda nestas Tabelas evidencia-se uma mudança significativa dos valores de pH.

Os resultados sugerem que a contagem total de bactérias seja decorrente da multiplicação das bactérias láticas, pois, conforme demonstrado nas Figuras 1, 2, 3 e 4 os valores dos ensaios microbiológicos seguem uma tendência, ou seja, tendem a um mesmo comportamento. Como exposto por Noskowa (1978), Cayré et al (2005), Giannuzzi et al (1998), Sakala et al (2002), Blickstad et al (1983), Von Holy et al (1991), Jay (2005), Mantis et al (2007), Pérez-Chabela et al (2008), Massager (2006), Ferreira (2004), Sachindra et al (2005), Liu et al (2006) e confirmado através dos testes realizados em produtos cárneos cozidos refrigerados e embalados em condições anaeróbias, as bactérias láticas fazem parte da microbiota predominante.

Segundo Noskowa (1978) a multiplicação das bactérias láticas é devido ao índice de carboidratos presente nas salsichas. Estas, inclusive, apresentam um comportamento irregular em sua estabilidade frente ao calor. Algumas cepas isoladas de produtos cárneos foram inativadas a uma temperatura de 60°C em tempos que oscilaram entre 1 e 28 minutos, porém outras linhagens, dentre elas, o *Lactobacillus viridescens*, não foi destruído quando submetido a uma temperatura de 80°C por 5 minutos, a 75°C em 10 minutos, a 70°C em 15 minutos, a 65°C em 30 minutos, a 60°C em 60 minutos, a 55°C em 120 minutos e a 50°C a 175 minutos; em outras pesquisas algumas cepas de *Lactobacillus* suportaram temperatura de 65°C por aproximadamente 120 minutos.

O processo térmico, o qual foi submetido às salsichas utilizadas para realização desse estudo consistiu em um túnel de cozimento, onde os produtos permanecem em seu interior até atingirem uma temperatura de 73°C. Desta

forma, se levarmos em consideração a abordagem do pesquisador Noskowa, é possível que tenha ocorrido a sobrevivência das bactérias lácticas durante o processo de cozimento ao qual foram submetidas as salsichas.

Outros pesquisadores como Palumbo et al (1974) e Pérez-Chabela et al (2008) também chegaram a esta mesma conclusão em suas pesquisas e reforçam a possibilidade de sobrevivência deste microrganismo ao processo de cocção devido a sua resistência ao aquecimento, além de tolerarem quantidades de sal, nitrito e ao processo de defumação (Franz et al 1996).

Todas estas observações estão de acordo com os dados do presente estudo e justifica, desta forma, a multiplicação pós processamento durante o período de estocagem das salsichas.

Neste estudo observou-se um decréscimo no valor de pH em ambos os testes. De acordo com Borch et al (1996) e Metaxopoulos et al (2002) a produção de ácidos láctico ou acético produzidos pelas bactérias lácticas justifica a queda no valor de pH observado nas amostras no decorrer do tempo de estocagem.

A viscosidade observada é oriunda da produção de ácido pelas bactérias lácticas, pois a viscosidade que ocorre na parte externa dos produtos é favorável em superfícies úmidas, ambiente característico dos pacotes de salsichas (JAY, 2005). Além disso, uma alta ligação foi observada entre as contagens microbiológicas de bactérias lácticas com a viscosidade, ou seja, quando a contagem microbiológica aproximou-se de 10^7 ufc/g iniciou-se um aumento considerável da viscosidade do líquido presente no interior dos pacotes. Esta característica evidencia uma aparência desagradável do produto aos olhos do consumidor e, portanto, tornou-se parâmetro de rejeição do consumidor. Esses resultados são compatíveis com os estudos Borch et al (1996), Mantis et al (2007), Massager (2006), Sachindra et al (2005), Korkeala et al (1989), Liu et al (2006) e Hamasaki et al (2003).

O estudo nos permite esclarecer que é possível aplicar a análise de sobrevivência em estudo de vida de prateleira de produtos alimentares, ou seja, é possível verificar a probabilidade do consumidor rejeitar um produto depois de um certo de tempo de estocagem. Esta análise foi extensivamente utilizada em estudos clínicos, epidemiológicos, biológicos, sociológicos e estudos de reabilitação e recentemente, sua aplicação vem sendo expandida e largamente

estudada para a área de alimentos, como fizeram Gimenez, Varela, Salvador, Ares, Fiszman e Garita (2005) na estimativa de vida de prateleira de pão, Varela, Salvador e Fiszman (2005) com estimativa em maçãs, Gámbaro, Gimenez, Varela, Garita e Hough *et al* (2004) em *Alfajor*, Rodrigues e Ando (2002) com estimativa em arroz entre outros.

A vida de prateleira das salsichas embaladas a vácuo foi determinada quando a contagem bacteriana de bactérias lácticas chegou a um nível de 10^7 ufc/g em conjunto com a formação de viscosidade, a qual prejudicou visivelmente sua aparência. A contaminação das salsichas pelas bactérias citadas se deu pela manipulação pós-tratamento térmico durante o processo de embalagem. Já a vida de prateleira pode ser estimada, através das Tabelas 5, 6, 7 e 8 e dos gráficos presentes nas figuras 9, 10, 11 e 12. Esta estimativa pode ser definida de acordo com a necessidade de cada empresa, pois apresenta alternativas diversas de orientação quanto a preservação, bem como a probabilidade de ter no mercado pacotes defeituosos.

Para produto exposto a uma temperatura de 2°C a vida de prateleira é de aproximadamente 1008 horas ou 42 dias sem que nenhum pacote apresente alterações ou 1032 horas ou 43 dias com probabilidade de 95% dos pacotes estarem sem alterações aparentes e aptos ao consumo humano com erro padrão de 4%. Para produto exposto a uma temperatura de 6,5°C a vida de prateleira é de aproximadamente 480 horas ou 20 dias sem que nenhum pacote apresente alterações ou 504 horas ou 21 dias com probabilidade de 91% dos pacotes estarem sem alterações aparentes e aptos ao consumo humano com erro padrão de 8%. Para produto exposto a uma temperatura de 15°C a vida de prateleira é de aproximadamente 108 horas ou 4,5 dias sem que nenhum pacote apresente alterações ou 120 horas ou 5 dias com probabilidade de 92% dos pacotes estarem sem alterações aparentes e aptos ao consumo humano com erro padrão de 6%. Para produto exposto a uma temperatura de 21°C a vida de prateleira é de aproximadamente 24 horas ou 1 dia sem que nenhum pacote apresente alterações ou 30 horas ou 1,25 dias com probabilidade de 97% dos pacotes estarem sem alterações aparentes e aptos ao consumo humano com erro padrão de 2%.

Contudo, concluiu-se que o método estatístico utilizado pode proporcionar opções de armazenamentos e dados de probabilidades de sobrevivência dos produtos apresentados aos consumidores. Também nos proporciona avaliar e estimar a real vida de prateleira de produtos que por algum motivo foi exposto às condições adversas.

5 BIBLIOGRAFIA

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Nov/1991. Microrganismos Viáveis Aeróbios em Alimentos. Contagem em Placas. MB 3462. Rio de Janeiro-RJ.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2001. Resolução – RDC N° 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico para Padrões Microbiológicos para Alimentos. Brasília-DF.

BLICKSTAD, E.; MOLIN, G. 1993. The Microbial Flora of Smoked Pork Loin and Frankfurter sausage Stored in Different Atmospheres at 4°C. *J. Appl. Bacteriol.* 54: 45-56.

BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M. I.; Blixt, Y. 1996. Bacterial Spoilage of Meat Products. *International Journal Food Microbiology.* 33: 103-120.

CAYRÉ, M. E.; GARRO, O.; VIGNOLO, G. 2005. Effect of Storage Temperature and Gas Permeability of Packing Film on the Growth of Lactic Acid Bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in Cooked Meat Emulsions. *Food Microbiology.* 22: 505-512.

FERREIRA, L. D. 2004. Utilização da Microbiologia Preditiva na Avaliação do Crescimento de Bactérias Ácido Lácticas em Presunto Fatiado. Dissertação Mestrado Engenharia Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC.

FRANZ, C. M. A. P.; VON HOLY, A. 1996. Thermotolerance of Meat Spoilage Lactic Acid Bacteria and their Inactivation in Vacuum-Packages Vienna Sausages. *International Journal of Food Microbiology.* 29: 59-73.

GÁMBARO, A., GIMÉNEZ, A., VARELA, P., GARITA, L., HOUGH, G. 2004. Sensory Shelf-life Estimation of *Aljajor* by Survival Analysis. *Journal of Sensorial Studies,* 19: 500-509.

GIANNUZZI, L.; PINOTTI, A.; ZARITZKY, N. 1998. Mathematical Modelling of Microbial Growth in Packaged Refrigerated Beef Storage at Different Temperature. *Journal Food Microbiology.* 39: 101-110.

GIMÉNEZ, A., VARELA, P., SALVADOR, A., ARES, G., FISZMAN, S., GARITTA, L. 2005. Shelf Life Estimation of Brown Pan Bread: A Consumer Approach. *Food Quality and Preference.*

HAMASAKI, Y.; AYAKI, M.; FUCHU, H.; SUGIYAMA, M.; MORITA, H. June 2003. Behavior of Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria Isolated from Spoiling Cooked Meat Products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (6): 3668-3671.

JAY, J. M. 2005. Microbiologia de Alimentos. Editora Artmed. Sexta Edição. São Paulo-SP.

KORKEALA, H.; ALANKO, T.; MÄKELÄ, P.; LINDROTH, S. 1989. Shelf life of Vacuum-Packed Cooked Ring Sausages at Different Chill Temperatures. *International Journal Of Food Microbiology*. 9: 237-247.

LIU F.; YANG, R. Q.; LI, Y. F. 2006. Correlations Between Growth Parameters of Spoilage Micro-organisms and Shelf-life of Pork Stored Under Air and Modified Atmosphere at -2, 4 and 10°C. *Food Microbiology*. 23: 578-583.

MANTIS, F.; BURRIEL, A. R.; SABATAKOU, O.; VACALOPOULOS, A.; RAMANTANIS, S. 2007. Some Factors Determining the Shelf Life of Vacuum Packed Heat-Treated Greek Sausages. *Veterinarski Arhiv*. 77 (3): 229-235.

MASSAGER, P. R. 2006. Microbiologia dos Processos Alimentares. Livraria Varela. São-Paulo-SP.

METAXOPOULOS, J.; MATARAGAS, M.; DROSINOS, E.H. 2002. Microbial Interaction in Cooked Cured Meat Products Under Vacuum or Modified Atmosphere at 4°C. *J. Appl. Microbiol.* 93: 363-373.

NOSKOWA, G. L. 1978. Microbiologia de las Carnes Conservadas por el Frio. Editorial Acribia S.A., Zaragoza-España.

PALUMBO, S. A.; HUHTANEN, C. N.; SMITH, J. L. 1974. Microbiology of The Frankfurter Process: Salmonella and Natural Aerobic Flora. *Applied Microbiology*. 27 (4): 724-732.

PAPAMANOLI, E.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; KOTZEKIDOU, P. 2003. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from a Greek Dry-Fermented Sausage in Respect of their Technological and Probiotic Properties. *Meat Science*. 65: 859-867.

PÉREZ-CHABELA, M. L.; TOTOSAUS, A.; GUERRERO, I. Jan-Mar/2008. Evaluation of Thermotolerant Capacity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Commercial Sausages and the Effects of their Addition on the Quality of Cooked Sausages. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* Campinas. 28 (1): 132-138.

RODRIGUES, L. R. F., ANDO, A. 2002. Caracterização e Avaliação de Três Grupos de Arroz-de-sequeiro de Diferentes Procedências por Meio da Sensibilidade à Radiação Gama. *Bragantia*. 61(1), Campinas-SP.

SACHINDRA, N. M.; SAKHARE, P. Z.; YASHODA K. P.; NARASIMHA RAO, D. 2005. Microbial Profile of Buffalo Sausage During Processing and Storage. *Food Control*. 16: 31-35.

SAKALA, R. M.; HAYASHIDANI, H.; KATO, Y.; HIRATA, T.; MAKINO, Y.; FUKUSHIMA, A.; YAMADA, T.; KANEUCHI, C.; OGAWA, M. 2002. Change in the Composition of the Microflora on Vacuum-Packaged Beef During Chiller Storage. *International Journal Food Microbiology*. 74: 87-99.

THIEMIG, F.; BUHR, H. und WOLF, G. 1998. Charakterisierung der Haltbarkeit und des Verderbsverhaltens Frischer Lebensmittel. *Fleishwirtschaft*. 78 (2): 152-154.

VARELA, P., SALVADOR, A., FISZMAN, S. 2005. Shelf Life Estimation of 'Fuji' Aples: Sensory Characteristics and Consumer Acceptability. *Postharvest Biology and Technology*. 38.

VON HOLY, A.; CLOETE, T.E.; DYKES, D.A. 1991. Quantification and Characterization of Microbial Populations Associated with Spoiled, Vacuum-Packed Vienna Sausages. *Journal Food Microbiology*. 8:95-104.

**CAPÍTULO 4: ESTIMATIVA DA VIDA DE PRATELEIRA DE
SALSICHAS ESTOCADAS A DIFERENTES
TEMPERATURAS UTILIZANDO ANÁLISE DE
SOBREVIVÊNCIA**

CAPÍTULO 4: ESTIMATIVA DA VIDA DE PRATELEIRA DE SALSICHAS ESTOCADAS A DIFERENTES TEMPERATURAS UTILIZANDO ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA

1 INTRODUÇÃO

A carne e seus derivados são um excelente ambiente para o crescimento microbiológico devido a sua composição química e as características biológicas. Desta forma, a multiplicação microbiana torna-se o fator principal da deterioração destes produtos. A microbiota inicial varia de contagens de bactérias mesófilas à psicotróficas. Portanto, as boas práticas de manipulação e os cuidados especiais devem ser mantidos durante todas as operações, incluindo ainda, a utilização de métodos de conservação para inibir ou minimizar a multiplicação (SILVA, 1999). A qualidade microbiológica de produtos cárneos processados é a principal área de preocupação para produtores, consumidores e órgãos de saúde pública. Produtos excessivamente contaminados com microrganismos são indesejáveis do ponto de vista da saúde pública, para qualidade e estética geral (OKOLOCHA E ELLERBROECK; 2004; SILVA, 1999).

Na planta processadora, a qualidade microbiológica de produtos processados depende do nível de contaminação inicial, número e tipo de microrganismo, eficiência do método de processamento, controle de temperatura, prática higiênica-sanitária da planta processadora (OKOLOCHA E ELLERBROECK; 2004) e conscientização dos funcionários, pois mesmo que o produto passe por um processo de descontaminação, ele pode ser contaminado pelas mãos dos manipuladores, no fim de seu processo colocando em risco sua inocuidade.

A alteração sensorial está aliada à contaminação microbiana. Ambas formam um fator chave para determinação da vida de prateleira dos produtos alimentícios. Alimentos microbiologicamente estáveis terão sua vida de prateleira definida pelas propriedades sensoriais. Muitos alimentos frescos, depois de um

tempo de estocagem ainda podem estar microbiologicamente seguros por não apresentar contaminação patogênica, mas pode ser rejeitado devido a mudanças em suas propriedades sensoriais que algumas vezes são causadas por microrganismos não patogênicos, ou seja, microrganismos deteriorantes (HOUGH *et al.*; 2003).

Numerosas mudanças ocorrem nos alimentos durante o processamento e a estocagem. É sabido que as condições usadas para o processo e estocagem de alimentos podem influenciar adversamente nos atributos de qualidade dos alimentos. Durante a estocagem, um ou mais atributos de qualidade podem alcançar um estado indesejável. Neste instante, o alimento é considerado impróprio para o consumo e diz-se ter alcançado o fim de sua vida de prateleira (MAN E ADRIAN, 2000).

O termo vida de prateleira é, portanto, o tempo em que o alimento pode ser conservado em determinadas condições de temperatura, umidade relativa, luz, etc, sofrendo pequenas, mas bem estabelecidas alterações que são até certo ponto, consideradas aceitáveis pelo fabricante, pelo consumidor e pela legislação alimentar vigente (COSTA, 2005; FREITAS *et al.*, 2001; VITALI E QUAST, 1996; NEW ZEALAND, 2005).

Durante a estocagem e distribuição, os alimentos são expostos freqüentemente a condições ambientais, como temperatura, umidade, oxigênio e luz. Estas condições podem disparar muitos mecanismos de reações que podem ter ligações com a degradação de alimentos. Em consequência destes mecanismos, os alimentos podem ser alterados a tal extensão que poderão ser rejeitados pelo consumidor ou podem se tornar prejudiciais à pessoa que os consome. A boa compreensão das diferentes reações que causam a deterioração do alimento é prioridade antes de desenvolver procedimentos específicos para a evolução da vida de prateleira do alimento (MAN E ADRIAN, 2000).

Calcular este tempo não é uma tarefa fácil, pois todos os alimentos se deterioram com o tempo. Fatores como multiplicação microbológica, alterações químicas e sensoriais devem ser consideradas para mensurar quando um alimento inicia sua perda de qualidade.

Atualmente não se tem uma metodologia exata para calcular a vida de prateleira, desta forma, os pesquisadores e as indústrias utilizam a alternativa que mais acham conveniente para esta determinação. Seja por métodos diretos, onde o produto fica estocado em condições controladas até sua deterioração, ou por métodos indiretos, os quais envolvem cálculos, predições e a exposição dos produtos a condições adversas ao recomendado a fim de acelerar sua deterioração.

A análise de sobrevivência é um ramo da estatística que vem sendo adaptado e desenvolvido para determinação da vida de prateleira de alimentos. Esta área cresceu muito nas últimas décadas do século passado para estudos voltados para as áreas clínica, epidemiológica, biológica, sociológica e em de reabilitação.

Em análise de sobrevivência, há uma variável de interesse, também chamada de variável dependente ou variável resposta, que é o tempo decorrido até o aparecimento de algum evento. Esse tempo é denominado “tempo de falha”, podendo ser o tempo até o produto tornar-se impróprio para o consumo.

Em estudos de vida de prateleira de alimentos, os indicadores que podem ser considerados como falha citados por Gacula (1975) são: alta contagem bacteriana, alterações físico-químicas, como por exemplo, mudanças de coloração, odor, textura, etc, alterações sensoriais ou até mesmo a combinação destes critérios. Neste caso, a falha é a condição do produto exibir mudança química, microbiológica, física ou sensorial que são inaceitáveis para o consumo regular do produto.

Uma característica decorrente destes estudos é, então, a presença de observações incompletas ou parciais. Estas observações, denominadas censuras, podem ocorrer por uma variedade de razões, dentre elas, a perda de acompanhamento do paciente no decorrer do estudo e a não ocorrência do evento de interesse até o término do experimento. Note que toda informação obtida sobre estes elementos (produtos) é que o tempo até a ocorrência do evento, para cada um deles, é superior ao tempo registrado até o último acompanhamento.

A presença de observações censuradas distingue a análise de sobrevivência de outros tipos de análise estatística. Desta forma, dados

censurados também fazem parte da avaliação e os dados não são desperdiçados (GACULA e KUBALA, 1975). Duas razões justificam tal procedimento: (i) mesmo sendo incompletas, as observações censuradas fornecem informações sobre o tempo de vida de pacientes; (ii) a omissão das censuras no cálculo das estatísticas de interesse pode acarretar conclusões viciadas (COLOSIMO E GIOLO; 2006). Sem a presença desses dados, não seria possível realizar uma boa estimativa dos parâmetros e, assim, fazer uma análise adequada (PEREIRA E VIVANCO; 2003).

Na análise de sobrevivência, os parâmetros mais importantes são a probabilidade condicional e marginal de sobrevivência no curso de cada um dos intervalos considerados e representada por $S(t)$, e a probabilidade de sobrevivência acumulada, isto é, a probabilidade de sobreviver do tempo zero até o tempo final considerado e representada por $1-S(t)$. Esta equivale à probabilidade de sobreviver em todos os intervalos anteriores ao momento considerado (22). Somente nas décadas de 1950 e de 1960 apareceram as primeiras propostas de estimadores das probabilidades de sobrevivência que incorporavam a censura. As principais técnicas são o método atuarial, o método do produto-limite de “*Kaplan-Meier*”, modelos de regressão paramétricos como Weibull e Log-logístico e o modelo de “*Cox*” (16).

Recentemente a análise de sobrevivência vem sendo expandida e estudada para a área de alimentos, como fizeram Gimenez *et al.* (2005) na estimativa de vida de prateleira de pão, Varela *et al.* (2005) com estimativa de vida de prateleira em maçãs, Gámbaro *et al.* (2004) em *Alfajor*, Rodrigues e Ando (2002) com estimativa de vida de prateleira de arroz entre outros. Desta forma, objetivamos nesta pesquisa introduzir a análise de sobrevivência para determinar a vida de prateleira de salsichas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DE AMOSTRAS E PLANO DE AMOSTRAGEM

A pesquisa foi realizada com 161 amostras de salsichas coletadas imediatamente após a embalagem. Estas, foram armazenadas nas seguintes temperaturas: 2°C, 6,5°C, 15°C e 21°C. Cada amostra contempla 1 (um) pacote embalado à vácuo contendo aproximadamente 1 kg de produto. A coleta foi realizada em 5 dias subseqüentes, ou seja, em cada dia foi coletado 5 pacotes por um período de 5 dias, conforme definido por Thiemig *et al.* (1998) para cada temperatura. Esta técnica de amostragem permite avaliar o produto, em um único dia, com tempos diferentes de estocagem, ou seja, no sexto dia, por exemplo, pode-se avaliar pacotes com 1, 2, 3, 4 e 5 dias de vida de prateleira. Desta forma, é possível avaliar a evolução do processo de deterioração mais nitidamente, visto que, a deterioração conjunta dos produtos dificulta a observação do pesquisador, pois vários pacotes podem deteriorar num mesmo dia, tornando a tarefa do analista excessivamente árdua. Dos 5 pacotes coletados diariamente, um foi destinado à análise inicial microbiológica e físico-química, restando, portanto, 4 pacotes para continuação do teste. Os pacotes foram armazenados em refrigerador com temperatura controlada através de registrador de temperatura "TempRecord (Didai – Brasil/Nova Zelândia)". Os pacotes foram armazenados em dois lotes (denominados no banco de dados como A e B) e, periodicamente eram feitas inspeções visuais para avaliar as condições do produto armazenado. Caso houvesse suspeita de comprometimento, o pacote correspondente era aberto e análises laboratoriais eram realizadas a fim de confirmar a suspeita. Caso não houvesse suspeitas de contaminação na inspeção visual, um pacote era selecionado ao acaso e análises laboratoriais eram realizadas para confirmar o não comprometimento.

Para efeito da análise estatística a ser apresentada, consideramos como *evento* de interesse a contaminação do pacote, confirmada por análises microbiológicas; caso o pacote não apresentava contaminação, uma vez que foi aberto, consideramos como *censura*. Para cada pacote examinado teremos,

então, um *tempo de acompanhamento*, que pode ser um tempo de contaminação ou um tempo de censura. Os dados resultantes dos experimentos foram analisados com o auxílio do software estatístico SAS[®].

2.2 ENSAIOS LABORATORIAIS

Os ensaios microbiológicos realizadas nas amostras foram somente as que tiveram diferença significativa apresentada no capítulo 2, ou seja, contagem total de bactérias (PCA – Plate Count Agar, Merk, Germany – ABNT – MB 3462), contagem de bactérias lácticas (MRS – Lactobacilli MRS Agar, Acumedia, Michigan). A análise físico-química realizada foi pH e também foi observada nas unidades amostrais a presença de viscosidade.

Os pacotes foram armazenados em dois lotes (denominados no banco de dados como A e B) e, periodicamente eram feitas inspeções visuais para avaliar as condições do produto armazenado. Caso houvesse suspeita de comprometimento, o pacote correspondente era aberto e análises laboratoriais eram realizadas a fim de confirmar a suspeita. Caso não houvessem suspeitas de contaminação na inspeção visual, um pacote era selecionado ao acaso e análises laboratoriais eram realizadas para confirmar o não comprometimento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise baseia-se em um conjunto de dados com 161 unidades experimentais (pacotes de salsichas), armazenados a diferentes temperaturas, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição das unidades experimentais segundo as temperaturas de estocagem

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Nº de pacotes</i>	<i>Porcentagem (%)</i>
2,0	42	26
6,5	40	25
15,0	38	24
21,0	41	25
Total	161	100

Pela Tabela 2 nota-se um aumento no número de pacotes deteriorados conforme ocorre aumento na temperatura, a partir de 6,5°C, ou seja, quanto maior a temperatura de estocagem mais susceptível à deterioração o produto se torna.

Tabela 2: Ocorrência de deterioração segundo as temperaturas de estocagem

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Não deteriorados</i>		<i>Deteriorados</i>		<i>Total</i>	
2,0	32	(29%)	10	(20%)	42	(26%)
6,5	31	(28%)	9	(18%)	40	(25%)
15,0	25	(23%)	13	(26%)	38	(24%)
21,0	23	(21%)	18	(36%)	41	(25%)
Total	111	(100%)	50	(100%)	161	(100%)

Algumas medidas descritivas relacionadas ao tempo de acompanhamento (isto é, sem considerar a deterioração ou não dos pacotes) é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Análise descritiva dos tempos de acompanhamento

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tempo de acompanhamento (horas)</i>				
	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Mediana</i>	<i>Máximo</i>
2,0	964,57	323,27	168,00	1032,00	1392,00
6,5	412,80	127,73	168,00	396,00	624,00
15,0	99,79	43,41	24,00	96,00	168,00
21,0	56,20	20,54	12,00	60,00	84,00
<i>Geral</i>	<i>392,05</i>	<i>408,06</i>	<i>12,00</i>	<i>168,00</i>	<i>1392,00</i>

Nota-se uma diminuição nos tempos de acompanhamento médios e medianos, provavelmente influenciados pela maior ocorrência de deterioração,

conforme sugerido pela Tabela 3. Também ocorre uma diminuição na variabilidade conforme aumenta a temperatura, porém é visível que a importância do desvio a 21°C é maior que o observado a uma temperatura de 2°C. Quanto maior a temperatura, mais rapidamente ocorre a deterioração.

Para avaliar o comportamento da ocorrência dos eventos (deterioração dos pacotes) ao longo do tempo, foi utilizado o estimador de Kaplan-Meier (KLEIN E MOESCHBERGER, 1998) para a probabilidade de *não deterioração* (sobrevivência) no instante t (função de sobrevivência). Foram calculadas estimativas para cada temperatura, apresentadas na Figura 1.

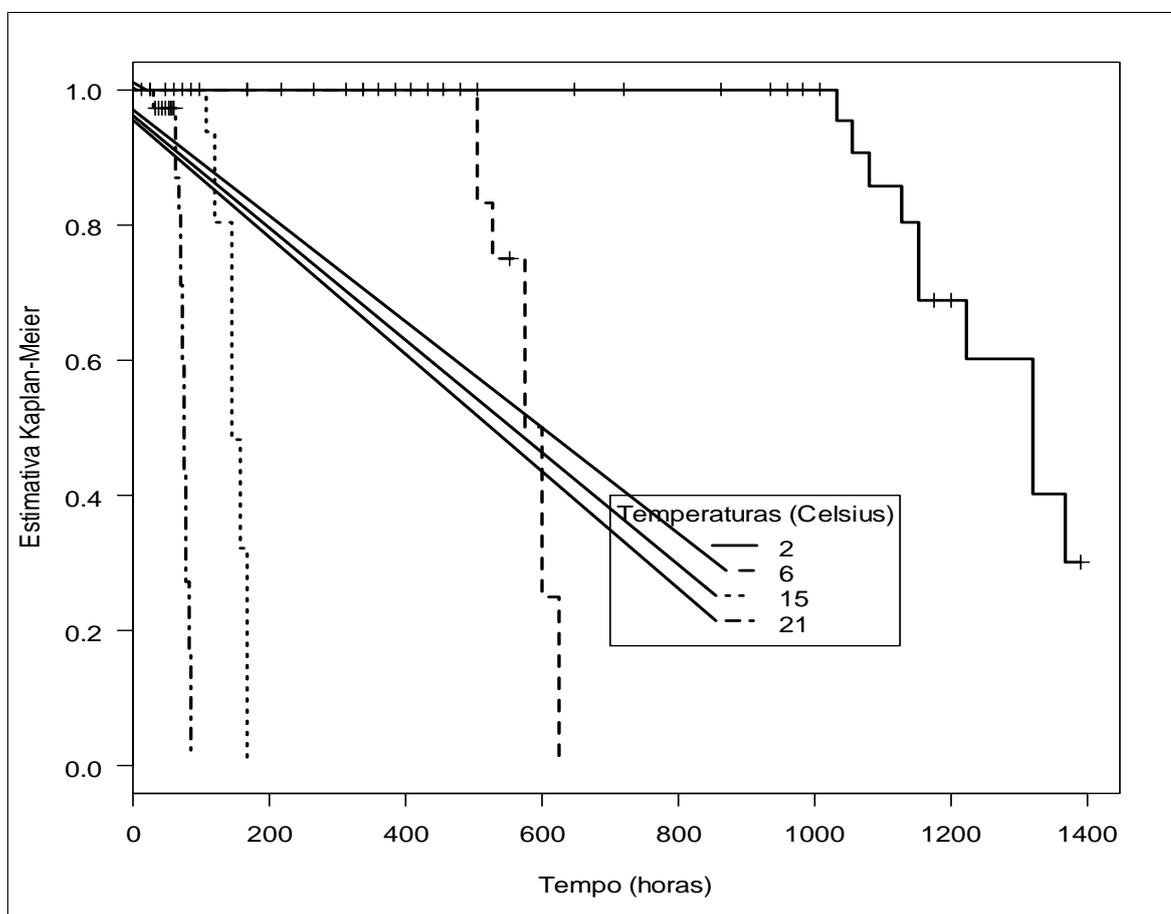


Figura 1. Estimativas da probabilidade de contaminação ao longo do tempo.

O gráfico na Figura 1 sugere a existência de efeito da temperatura na deterioração dos pacotes. Este efeito se dá com uma diminuição no tempo livre de deterioração à medida que a temperatura aumenta (curvas com temperatura mais altas apresentam um decaimento bem mais acentuado do que curvas com

temperaturas mais baixas). Além disso, pode-se notar que os pacotes começam a apresentar deterioração em períodos mais tardios para temperaturas mais baixas.

As diferenças observadas na Figura 1 podem ser avaliadas estatisticamente de forma global através de testes não paramétricos, sendo os mais conhecidos os testes *log-rank* e *Wilcoxon* (Klein e Moeschberger, 1998). O teste *log-rank* assume o mesmo peso ao longo do tempo, ao passo que o teste de *Wilcoxon* atribui maiores pesos a instantes de tempo menores. No caso deste estudo, eles têm, sob a hipótese de igualdade das curvas, distribuição assintótica de qui-quadrado, com 3 graus de liberdade. O teste de *log-rank* fornece, neste caso, valor $p < 0,001$, isto é, as curvas são estatisticamente diferentes. A mesma conclusão é obtida com o teste de *Wilcoxon*, cujo valor p também é inferior a 0,001.

Para estudar as diferenças observadas nas análises anteriores de forma mais criteriosa, utilizaremos uma abordagem paramétrica para a análise.

A escolha da classe de modelos será feita procurando obter um modelo cujos resultados sejam de interpretação mais simples. Avaliamos inicialmente o modelo Weibull (cujo importante caso particular é o modelo Exponencial), visto que, o mesmo foi utilizado em outros estudos de vida de prateleira. Esse modelo foi ajustado e sua adequabilidade foi avaliada através dos resíduos Cox-Snell (KLEIN E MOESCHBERGER, 1998). Caso o modelo escolhido seja adequado, esses resíduos devem-se comportar como uma amostra censurada oriunda de uma população com tempos exponenciais. Desta forma, o gráfico do oposto do log do estimador Kaplan-Meier calculado para os resíduos Cox-Snell, em função dos resíduos (aqui fazendo o papel dos tempos de falha), deve ser aproximadamente uma reta passando pela origem.

A Figura 2 apresenta o gráfico obtido considerando o ajuste dos dados com o modelo Weibull.

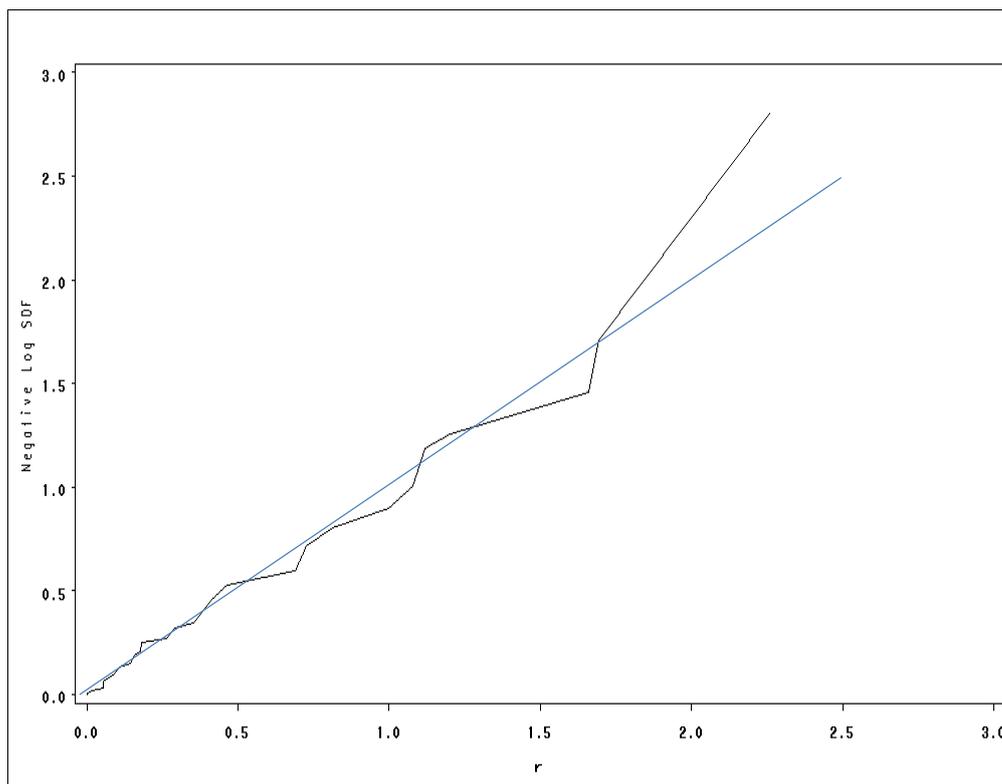


Figura 2. Avaliação da adequabilidade do modelo Weibull usando os resíduos Cox-Snell

O gráfico na Figura 2 mostra, além da curva estimada, uma reta com inclinação de 45 graus, passando pela origem. Como a maior parte da curva encontra-se razoavelmente sobreposta à reta, concluímos que o modelo Weibull pode ser uma escolha adequada. Entretanto notamos a existência de problemas para valores mais altos dos resíduos.

Procuramos então ajustar um modelo log-logístico, que apesar de não ter riscos proporcionais, apresenta vantagens na interpretação da função de sobrevivência entre grupos, através de *odds ratios* (razões de chances).

O modelo log-logístico foi ajustado e sua adequabilidade foi avaliada novamente utilizando-se os resíduos de *Cox-Snell*. A Figura 3 apresenta o gráfico com a estimativa da função de sobrevivência (transformada) em função dos resíduos. Também foi incluída a bissetriz para auxiliar na comparação.

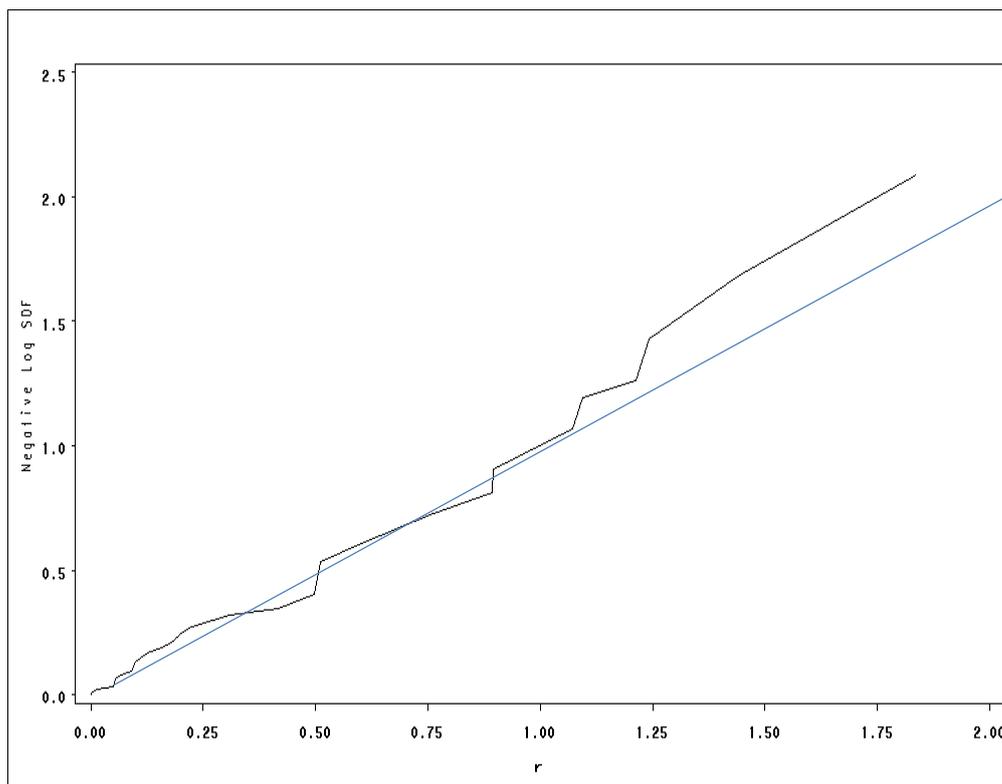


Figura 3. Avaliação da adequabilidade do modelo log-logístico usando os resíduos *Cox-Snell*

O modelo log logístico a ser ajustado é dado pela função de sobrevivência:

$$S(t) = \frac{1}{1 + (\lambda t)^\gamma} \quad (1)$$

onde $\gamma = 1/\sigma$, com σ sendo o fator de escala, e $\lambda = \exp[\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3]$, com X_1 , X_2 e X_3 variáveis indicadoras das temperaturas 2 °C, 6 °C e 15 °C, respectivamente, β_0 correspondendo ao logito para pacotes armazenados à temperatura de 21°C e β_i representando o efeito da temperatura i ($i = 1$ é 2°C, $i = 2$ é 6°C, $i = 3$ é 15°C), relativamente à temperatura de estocagem de 21°C, no logito. Pode-se demonstrar que o logito é dado por:

$$\ln \frac{S(t)}{1 - S(t)} = \frac{1}{\sigma} [\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 - \ln(t)] \quad (2)$$

Nesta fórmula, é fácil ver que o intercepto do modelo, $\beta_0 - \ln(t)$, depende do tempo.

As interpretações serão dadas convenientemente em termos da razão de chances de deterioração (*odds ratio*) relativamente à temperatura de estocagem de 21°C. Essa medida será constante no tempo (suposição *proportional odds*).

Estimativas dos efeitos de cada temperatura no logito são apresentadas na Tabela 4, acompanhadas dos correspondentes erros padrões e valores p para o teste de Wald.

Tabela 4. Estimativas de máxima verossimilhança para os efeitos das diferentes temperaturas no modelo log-logístico – referência: pacotes armazenados a 21°C

Parâmetro	Interpretação	Estimativa	Erro padrão	Valor-p
β_1	2°C - efeito em relação à temperatura de 21°C	2,85	0,04	< 0,001
β_2	6°C - efeito em relação à temperatura de 21°C	2,06	0,05	< 0,001
β_3	15°C - efeito em relação à temperatura de 21°C	0,69	0,05	< 0,001
β_0	21°C – Média do log(tempo de deterioração)	4,31	0,03	< 0,001
σ	Parâmetro de escala	0,07	0,01	

Da Tabela 4 nota-se que pacotes armazenados nas temperaturas 2°C, 6,5°C e 15°C, têm tempos de deterioração significativamente diferentes dos pacotes armazenados a 21°C, sendo que temperaturas menores tendem a fornecer produtos livres de deterioração por um período mais longo.

A vida de prateleira é estimada por:

$$\hat{t}_p = e^{\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 X_1 + \hat{\beta}_2 X_2 + \hat{\beta}_3 X_3 - \hat{\sigma} k_p} \quad (3)$$

onde $k_p = \ln \left(\frac{1 - S_p(t)}{S_p(t)} \right)$ e $S_p(t)$ é o percentil desejado de pacotes não deteriorados. Os limites inferior e superior do intervalo de confiança de 95% para a vida de prateleira são dados por:

$$e^{\hat{t}_p \pm R} \quad \text{onde } R = 1,96 \sqrt{\text{Var}(\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 X_1 + \hat{\beta}_2 X_2 + \hat{\beta}_3 X_3 - \hat{\sigma} k_p)} \quad (4)$$

Nas tabelas 5, 6, 7 e 8 estão apresentados estes valores para os percentis 50 (o valor mediano), 95, 99 e 99,9, para cada uma das quatro temperaturas estudadas.

Tabela 5. Estimativas da vida de prateleira para pelo menos 50% de pacotes não contaminados e os correspondentes intervalos de confiança de 95%.

<i>Temperatura</i>	<i>Estimativa (horas)</i>	<i>Intervalo de confiança (95%)</i>	
		<i>Limite inferior</i>	<i>Limite superior</i>
2,0°C	1284,47	1204,20	1370,09
6,5°C	584,00	544,98	625,82
15,0°C	148,34	138,30	159,10
21°C	74,35	70,41	78,52

Tabela 6. Estimativas da vida de prateleira para pelo menos 95% de pacotes não contaminados e os correspondentes intervalos de confiança de 95%.

<i>Temperatura</i>	<i>Estimativa (horas)</i>	<i>Intervalo de confiança (95%)</i>	
		<i>Limite inferior</i>	<i>Limite superior</i>
2,0°C	1034,81	962,25	1112,84
6,5°C	470,49	434,44	509,53
15,0°C	119,50	109,75	130,12
21,0°C	59,90	55,77	64,32

Tabela 7. Estimativas da vida de prateleira para pelo menos 99% de pacotes não contaminados e os correspondentes intervalos de confiança de 95%.

<i>Temperatura</i>	<i>Estimativa (horas)</i>	<i>Intervalo de confiança (95%)</i>	
		<i>Limite inferior</i>	<i>Limite superior</i>
2,0°C	916,73	839,14	1001,50
6,5°C	416,80	378,79	458,62
15,0°C	105,87	95,57	117,27
21,0°C	53,06	48,47	58,08

Tabela 8. Estimativas da vida de prateleira para pelo menos 99,9% de pacotes não contaminados e os correspondentes intervalos de confiança de 95%.

<i>Temperatura</i>	<i>Estimativa (horas)</i>	<i>Intervalo de confiança (95%)</i>	
		<i>Limite inferior</i>	<i>Limite superior</i>
2,0°C	773,66	688,28	869,64
6,5°C	351,75	310,76	398,15
15,0°C	89,34	78,34	101,89
21,0°C	44,78	39,65	50,57

Desta forma, teremos uma estimativa de vida de prateleira de salsichas estocadas a 2°C de 1284,47 horas ou 53 dias e meio com probabilidade 50% dos pacotes estarem com deterioração capaz de tornar o produto inaceitável para os consumidores, sendo o intervalo de confiança dado por [1204,20;1370,09]. Esta estimativa diminui a medida em que aumenta os percentis, ou seja, a estimativa

de vida de prateleira cai para 1034,81 horas com probabilidade 95% dos pacotes estarem sem deterioração, sendo o intervalo de confiança dado por [962,25;1112,84], 916,73 horas com probabilidade 99% dos pacotes estarem sem deterioração sendo o intervalo de confiança dado por [839,14;1001,50] ou ainda 773,67 horas ou 32 dias com probabilidade 99,99% dos pacotes estarem sem deterioração aparente sendo o intervalo de confiança dado por [688,28;869,64]. Da mesma forma ocorre com as demais temperaturas estudadas, cabe ao pesquisador ou às indústrias escolherem qual estimativa melhor convém levando em consideração o risco da alternativa escolhida.

Porém, como podemos observar nas tabelas de 5 a 8, é conveniente considerar as estimativas da vida de prateleira do limite inferior a fim de ter a certeza de apresentar aos consumidores dados reais e assegurar a qualidade do produto até o último dia de sua vida de prateleira.

Caso o interesse seja o de prever a vida de prateleira para outras temperaturas, uma alternativa seria a utilização de um modelo log logístico dado pela função de sobrevivência (1) com $\lambda = \exp\left\{\alpha_0 + \alpha_1 T + \alpha_2 T^2\right\}$, onde T representa a temperatura de estocagem, α_0 o logito para pacotes armazenados à temperatura 2°C e α_1 e α_2 os coeficientes dos efeitos linear e quadrático, respectivamente.

Estimativas dos parâmetros do modelo são apresentadas na Tabela 9, acompanhadas dos correspondentes erros padrões e valores p para o teste de Wald.

Tabela 9. Estimativas de máxima verossimilhança para os parâmetros do modelo.

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	Valor-p
α_0	7,1518	0,0307	< 0,001
α_1	-0,2032	0,0094	< 0,001
α_2	0,0028	0,0005	< 0,001
σ	0,0737	0,0081	

A vida de prateleira é estimada por:

$$\hat{t}_p = \frac{\ln(-\ln(1-p))}{\alpha_0 + \alpha_1 T + \alpha_2 T^2 - \sigma k_p}$$

onde $k_p = \ln\left(\frac{1}{1 - S_p(t)}\right)$ e $S_p(t)$ é o percentil desejado de pacotes não deteriorados. Os limites inferior e superior do intervalo de confiança de 95% para a vida de prateleira são dados por:

$$\hat{t}_p \pm R \text{ onde } R = 1,96 \sqrt{\text{Var}\left(\hat{\theta}_0 + \hat{\alpha}_1(t-2) + \hat{\alpha}_2(t-2)^2\right) - \hat{\sigma}k_p}.$$

Nas tabelas 10, 11 e 12 estão apresentados estes valores para os percentis 95, 99 e 99,9, para duas outras temperaturas.

Tabela 10. Estimativas da vida de prateleira para pelo menos 95% de pacotes não contaminados e os correspondentes intervalos de confiança de 95%.

Temperatura	Estimativa (horas)	Intervalo de confiança (95%)	
		Limite inferior	Limite superior
8°C	335,75	294,67	359,55
10°C	241,86	205,44	259,01

Tabela 11. Estimativas da vida de prateleira para pelo menos 99% de pacotes não contaminados e os correspondentes intervalos de confiança de 95%.

Temperatura	Estimativa (horas)	Intervalo de confiança (95%)	
		Limite inferior	Limite superior
8°C	297,29	258,49	323,65
10°C	214,16	180,54	233,14

Tabela 12. Estimativas da vida de prateleira para pelo menos 99,9% de pacotes não contaminados e os correspondentes intervalos de confiança de 95%.

Temperatura	Estimativa (horas)	Intervalo de confiança (95%)	
		Limite inferior	Limite superior
8°C	250,729	213,78	281,09
10°C	180,61	149,79	202,49

Em virtude dos cálculos realizados nas temperaturas pré-estabelecidas (2°C, 6,5°C, 15°C e 21°C), podemos estimar a vida de prateleira de salsicha em temperaturas não estudadas como por exemplo a 8°C e a 10°C. A vida de prateleira para estes produtos para pelo menos 99% de pacotes sem deterioração e armazenados a 8°C é um valor de 297,29 sendo intervalo de confiança dado por [258,49;323,65]. Portanto, por questões de segurança da qualidade do produto considera-se a vida de prateleira igual a 258,49 horas ou aproximadamente 11 dias.

Desta forma, os produtores podem estabelecer de maneira precisa o tempo em relação a temperatura que o mesmo foi exposto.

O estudo, contudo, nos permite esclarecer que é possível aplicar a análise de sobrevivência em estudo de vida de prateleira de produtos alimentares, ou seja, é possível verificar a probabilidade do consumidor rejeitar um produto depois de um certo tempo de estocagem em períodos pré-estabelecidos.

5 BIBLIOGRAFIA

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Nov/1991. Microrganismos Viáveis Aeróbios em Alimentos. Contagem em Placas. MB 3462. Rio de Janeiro-RJ.

COLOSIMO, E. A.; GIOLO, S. R. 2006. Análise de Sobrevivência Aplicada. 1ª Edição, Editora Edgard Blücher, São Paulo-SP.

COSTA, J. C. 2005. Modelo Weibull com Parâmetros Dependentes de Covariáveis: Aplicação na Determinação de Vida de Prateleira. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Exatas. Departamento de Estatística. *Dissertação de Mestrado*. Belo Horizonte-MG.

FREITAS, M. A.; BORGES, W.; HO, L. L. A. 2001. Statistical Model for Shelf Life Estimation Using Sensory Evaluation Scores. *Relatório Técnico RTP-10/2001*. Universidade federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Exatas. Departamento de Estatística. Minas Gerais.

GÁMBARO, A.; GIMÉNEZ, A.; VARELA, P.; GARITA, L.; HOUGH, G. 2004. Sensory Shelf-life Estimation of *Aljajor* by Survival Analysis. *Journal of Sensorial Studies*. 19: 500-509.

GIMÉNEZ, A., VARELA, P., SALVADOR, A., ARES, G., FISZMAN, S., GARITTA, L. 2005. Shelf Life Estimation of Brown Pan Bread: A Consumer Approach. *Food Quality and Preference*.

GIOLO, S. R. 2003. Variáveis Latentes em Análise de Sobrevivência em Curvas de Crescimento. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, *Tese de Doutorado*, Piracicaba-SP.

HOUGH, G.; GÓMEZ, G.; CURIA, A. 2003. Survival Analysis Applied to Sensory Shelf Life of Foods. *Journal of Food Science*, 68 (1): 359 – 362.

KLEINBAUM, D. 1996. Survival Analysis. New York. Springer-Verlag.

MAN, D.; ADRIAN, J. 2000. Shelf Life Evolution of Foods. Gaithersburg, Aspen.

NEW ZEALAND FOOD SAFETY AUTHORITY. 2005. A Guide to Calculating the Shelf Life of Foods. Wellington, New Zealand.

OKOLOCHA, E. C.; ELLERBROECK, L. 2004. The Influence of Acid and Alkaline Treatments on Pathogens and the Shelf Life of Poultry Meat. *Food Control*.

PAGANO, M; GAUVREAU, K. 2004. Princípios da Bioestatística. Editora Pioneira Thompson, São Paulo-SP.

PEREIRA, P. J., VIVANCO, M. J. F. 2003. Viabilidade da Aplicação de Mecanismos de Censura Tipo I e Aleatória em Dados Entomológicos. *Rev. Ciência Agrotéc. Lavras*. 27 (2):: 438-442.

RODRIGUES, L. R. F., ANDO, A. 2002. Caracterização e Avaliação de Três Grupos de Arroz-de-sequeiro de Diferentes Procedências por Meio da Sensitividade à Radiação Gama. *Bragantia*. 61 (1).

SILVA, E. N. 1999. Contaminação e Deterioração de Carne. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Roteiro de Aula TP 161 – Tecnologia Avançada de Carnes e Derivados, São Paulo-SP.

TEIXEIRA, M. T. B., FAERSTEIN, E., LATORRE, M. R. 2002. Técnicas de Análise de Sobrevida. *Cad. Saúde Pública*. 18: 579-594.

THIEMIG, F.; BUHR, H. und WOLF, G. 1998. Charakterisierung der Haltbarkeit und des Verderbsverhaltens Frischer Lebensmittel. *Fleishwirtschaft*. 78 (2): 152-154.

VARELA, P., SALVADOR, A., FISZMAN, S. 2005. Shelf Life Estimation of 'Fuji' Aples: Sensory Characteristics and Consumer Acceptability. *Postharvest Biology and Technology*. 38.

VITALI, A. A.; QUAST, D. G. 1996. Reações de Transformação e Vida de Prateleira de Alimentos Processados. *Manual Técnico Nº 06*, Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, 2ª Edição, Campinas-SP.

6 CONCLUSÕES

Contudo conclui-se que a vida de prateleira das salsichas embaladas a vácuo foi determinada quando a contagem bacteriana chegou a um nível de 10^7 ufc/g em conjunto com a formação de viscosidade, a qual prejudicou visivelmente sua aparência. A contaminação de salsichas pelas bactérias lácticas se deu pela manipulação pós tratamento térmico durante o processo de embalagem e pela resistência térmica do microrganismo.

Com auxílio da análise de sobrevivência foi possível estabelecer que a vida de prateleira, para pelo menos 95% dos pacotes estarem sem alterações, quando expostos a uma temperatura de 2°C, é um valor entre 962,25 e 1112,84 horas. Portanto para uma maior segurança, consideramos 962,25 horas ou aproximadamente 40 dias. Quando expostos a uma temperatura de 6,5°C, é um valor entre 434,44 e 509,53 horas. Portanto para uma maior segurança, consideramos 434,44 horas ou aproximadamente 18 dias. Quando expostos a uma temperatura de 15°C, é um valor entre 109,75 e 130,12 horas. Portanto para uma maior segurança, consideramos 109,75 horas ou aproximadamente 4,57 dias. Quando expostos a uma temperatura de 21°C, é um valor entre 55,77 e 64,32 horas. Portanto para uma maior segurança, consideramos 55,77 horas ou aproximadamente 2,32 dias.

Constatou-se também que a análise de sobrevivência pode ser utilizada não somente para estudos clínicos, epidemiológicos, biológicos, sociológicos e em estudos de reabilitação e sim na vida de prateleira de produtos alimentícios

7 TRABALHOS FUTUROS

- Realizar estudos da capacidade termotolerante das bactérias lácticas;
- Verificar a associação dos resultados obtidos com a análise de sobrevivência com a microbiologia preditiva;
- Aplicar análise de sobrevivência em outros produtos alimentícios;
- Testar a validade do modelo comparando-o com testes realizados em laboratório.