



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

CLECIENE NUNES DA SILVA

**ESTUDO DA VIDA ÚTIL DE LINGUIÇA FRESCAL DE
FRANGO E MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS EM CONDIÇÕES
ISÓRTERMICAS**

**Florianópolis/SC
2013**

CLECIENE NUNES DA SILVA

**ESTUDO DA VIDA ÚTIL DE LINGUIÇA FRESCAL DE
FRANGO E MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS EM CONDIÇÕES
ISÓRTERMICAS**

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

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

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Jane Oliveira Perez

Florianópolis/SC
2013

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

Silva, Cleciene Nunes da

S586e Estudo da vida útil de linguiça frescal de frango e modelagem do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isótermicas / Cleciene Nunes da Silva ; orientadora, Gláucia M. Falcão Aragão; co-orientadora, Jane Oliveira Perez. - Florianópolis, SC, 2013.
92 p.

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

Inclui referências

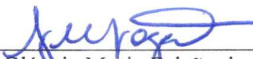
1. Engenharia de Alimentos. 2. linguiça de frango. 3. lactato de sódio. 4. bactérias ácido lácticas. I. Aragão, Gláucia M. Falcão. II. Perez, Jane Oliveira. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**“ESTUDO DA VIDA ÚTIL DE LINGUIÇA
FRESCAL DE FRANGO E MODELAGEM DO
CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDOS
LÁCTICAS EM CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS.”**

Por

Cleciene Nunes da Silva

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.



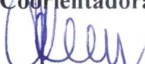
Prof.ª. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Orientadora



Prof.ª. Dra. Jane Oliveira Perez

Coorientadora



Prof. Dr. João Borges Laurindo

Coordenador

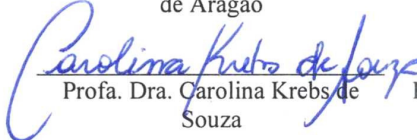
Banca Examinadora:




Prof.ª. Dra. Gláucia Maria Falcão
de Aragão



Prof.ª. Dra. Denise Esteves Moritz



Prof.ª. Dra. Carolina Krebs de
Souza



Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus

Florianópolis, 10 de junho de 2013

*Dedico aos meus filhos
Paulo Henrique e Carlos Eduardo,
na esperança que um dia eles possam
colher os frutos plantados
com este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça da vida e por estar ao meu lado nas minhas quedas, fraquezas, nas minhas alegrias e tristezas, nas decepções, nas lutas e derrotas e também nas vitórias.

Aos meus amados pais, pelo amor, confiança, carinho, apoio e incentivo e por me ensinarem a cada dia uma lição que não se aprende na escola: VIVER!

A minha família, pelo constante estímulo, em especial aos meus filhos Paulo Henrique e Carlos Eduardo pela compreensão e carinho, que se viram privados da minha atenção em diversos momentos e que, tenho certeza, compreenderam minha atitude em prol de uma grande causa.

A Orientadora, Prof.^a Dr. Gláucia Maria Falcão Aragão, que me aceitou como orientanda, mesmo sem me conhecer profissionalmente, o meu agradecimento pela confiança depositada durante todo este período, pela participação em mais uma conquista na minha vida profissional. Muito obrigada!

A minha co-orientadora Prof.^a Dra. Jane Oliveira Perez, pelo tempo e atenção a mim dispensados sempre que necessário.

Sou muito grata ao SENAI-PE. Ao saudoso ex-diretor regional de Pernambuco, Antônio Carlos Maranhão e atual diretor, Sérgio Gaudêncio, assim como ao diretor da Escola de Petrolina, Flávio Luiz Guimarães pela credibilidade depositada em minha pessoa, e sem o qual esse projeto não poderia ser levado a diante.

Aos meus colegas professores da Escola Técnica SENAI Petrolina, pelo apoio e compreensão do meu afastamento para o Mestrado.

Os companheiros do ENGEBIO: Jean, Ana Paula e Morgana, pela ajuda durante a fase experimental, e por não medirem esforços para poderem me ajudar. Pela companhia nas tantas madrugadas. Muito obrigada a todos!

A amiga Ana Paula, pela compreensão, carinho e pelos ótimos

momentos de descontração que passamos juntas.

E ainda, à Aparecida do Laboratório de Análises Microbiológicas do SENAI Petrolina, e sua equipe que contribuíram na coleta e análises das amostras. Agradecimento muito especial.

Finalmente, a todos os demais professores do Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos, pelos ensinamentos, aos colegas de turma, pelo companheirismo, e às demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que esse estudo fosse concluído.

A todos que de alguma forma acreditaram, contribuíram e estiveram presentes durante todo esse meu trabalho, o meu...

Muito obrigada!!!

*De tudo ficam três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...”*

Fernando Pessoa

SILVA, Cleciene Nunes da. **Estudo da vida útil de linguiça frescal de frango e modelagem do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições**. 2013. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

RESUMO

Atualmente, tem-se evidenciado significativo progresso na produção de embutidos pelas indústrias que têm investido cada vez mais na industrialização dos produtos cárneos, apresentando novas formulações visando à melhoria da qualidade e principalmente, a segurança no consumo de produtos alimentares. O presente trabalho teve como objetivo utilizar a microbiologia preditiva para avaliar o crescimento de bactérias ácido lácticas em linguiça frescal de frango, armazenadas a temperatura de 4°C. Para tanto, foi analisada a influência dos fatores cloreto de sódio (NaCl) e lactato de sódio (Na-lactato) no crescimento de *Lactobacillus plantarum* em caldo MRS. Desta forma foram geradas as curvas de crescimento da bactéria estudada expressas pela variação do diâmetro da colônia (mm) em função do tempo (h). Os parâmetros de crescimento, duração da fase de adaptação (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e diâmetro máximo atingido pela colônia (A), foram obtidos através do ajuste dos dados experimentais ao modelo primário de crescimento de Gompertz Modificado. Um planejamento fatorial fracionado completo foi selecionado para estudar os efeitos dos fatores nos parâmetros de crescimento (λ , μ_{\max} e A). O desempenho do modelo foi avaliado pela comparação dos índices estatísticos, coeficiente de regressão (R^2), erro médio quadrático (MSE), levando à escolha do modelo com melhor ajuste aos dados experimentais (Gompertz Modificado). As análises estatísticas foram feitas utilizando o *software Statistica 7.0* com análise de variância de $p < 0,1$ para o cálculo dos efeitos. A avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas na linguiça frescal de frango foi realizada através da elaboração das formulações A (com lactato) e formulação B (sem lactato). Os resultados evidenciaram a importância do lactato de sódio, já que estes atingiram a fase estacionária em 32 dias a 4°C. A partir de então, nota-se que as amostras contendo 1,0% NaCl e 4,0% de Lactato de sódio apresentaram uma inibição no crescimento microbiano, demonstrando a ação inibitória do lactato sobre os microrganismos.

Palavras-chave: Linguiça de Frango. Lactato de Sódio. Bactérias Ácido Lácticas.

ABSTRACT

Currently, we have shown significant progress in sausage production by industries that have increasingly invested in the manufacturing of meat products, with new formulations, aiming at improving the quality and especially the safety of food consumption. This study aimed to use the predictive microbiology to evaluate the growth of lactic acid bacteria in sausage chicken fresh, stored at 4°C. Therefore, we analyzed the influence of sodium chloride (NaCl) and sodium lactate (Na-lactate) on the growth of *Lactobacillus plantarum* in MRS broth. Thus were generated growth curves of the bacteria studied expressed by the variation of the colony diameter (mm) versus time (h). The growth parameters, duration of the adaptation phase (λ), maximum specific growth rate (μ_{\max}) and maximum diameter reached by the colony (A) were obtained by fitting the experimental data to the models primary Modified Gompertz growth. A fractional factorial design was complete selected to study the effects of the factors on growth parameters (λ , μ_{\max} and A). Model performance was assessed by comparing the statistical indices, regression coefficient (R^2), mean square error (MSE), leading to the choice of the model with the best fit to the experimental data (Modified Gompertz). Statistical analyzes were performed using Statistica 7.0 software with analysis of variance $p < 0.1$ for the purpose of calculation. The evaluation of growth of lactic acid bacteria in chicken fresh sausage was made by preparing the formulations A (with lactate) and formulation B (without lactate). The results showed the importance of sodium lactate, as they reached the stationary phase in 32 days at 4° a.i Thereafter, it was noted that the samples containing 1.0% NaCl and 4.0% lactate showed an inhibition in microbial growth, demonstrating the inhibitory action of lactate on microorganisms.

Keywords: Chicken Sausage. Sodium Lactate. Lactic Acid Bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma para elaboração do produto cárneo linguiça tipo frescal.	35
Figura 2. Curva típica de crescimento microbiano.....	47
Figura 3. Esquema da metodologia utilizada para avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas.....	52
Figura 4. Fluxograma de fabricação da linguiça frescal de frango.	58
Figura 5. Avaliação do crescimento de <i>L. plantarum</i> – planejamento fatorial.....	70
Figura 6. Curva de nível e superfície de resposta das concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato), para o parâmetro de crescimento μ_{\max} para a <i>L. plantarum</i>	74
Figura 7. Curva de nível e superfície de resposta das concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato), para o parâmetro de crescimento A para a <i>L. plantarum</i>	75
Figura 8. Curva de nível e superfície de resposta das concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato), para o parâmetro de crescimento λ para a <i>L. plantarum</i>	76
Figura 9. Curva de crescimento de <i>L. plantarum</i> em linguiça frescal de frango, formulada com lactato (A) e sem lactato (B). A linha contínua representa o ajuste do modelo de Gompertz Modificado aos dados experimentais.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis codificadas e variáveis reais em triplicata com ponto central para avaliação do efeito das concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato) nos parâmetros microbiológicos de crescimento.....	54
Tabela 2. Níveis e fatores do planejamento fatorial fracionado.	54
Tabela 3. Formulação de linguças de frango A com adição de lactato e B sem adição de Lactato de sódio.	58
Tabela 4. Valores de índices estatísticos para avaliação de <i>L. plantarum</i> , para o modelo de Gompertz Modificado.	71
Tabela 5. Parâmetros de crescimento de <i>L. plantarum</i> obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz Modificado aos dados das curvas de crescimento obtidas no planejamento experimental.	72
Tabela 6. Análise de variância e estimativa dos efeitos para variáveis respostas calculadas A, μ , λ	73
Tabela 7. Valores dos índices matemáticos e estatísticos para o modelo de Gompertz modificado, do Tratamento A e Tratamento B.	78
Tabela 8. Parâmetros de crescimento obtidos do Modelo de Gompertz Modificado.	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% (v/v)	- Porcentagem volume por volume
°C	- Graus Celsius
λ	- Duração da fase lag
μ	- Velocidade específica máxima de crescimento
A	- Aumento logarítmico da população
Abs	- Absorbância no tempo
Abs ₀	- Absorbância inicial
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAL	- Bactérias ácido lácticas
CDC	- <i>Center Disease Control</i>
DVA	- Doenças Veiculadas por Alimentos
MRS	- Meio de cultivo
MSE	- Erro médio quadrático
Ln	- (abs/abs ₀) Logaritmo neperiano da densidade celular no tempo
MI	- Microlitro
NaCl	- Cloreto de sódio
NBR	- Norma Brasileira
O ₂	- Oxigênio
OMS	- Organização Mundial de Saúde
ph	- Potencial Hidrogeniônico
R ²	- Coeficiente de correlação
RIISPOA	- Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SIF	- Serviço de Inspeção Federal
T	- Tempo
UFC	- Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	30
2.1 EMBUTIDOS	30
2.1.1 Linguiça Frescal	31
2.1.1.1 Processamento tecnológico para elaboração de Linguiça	32
2.1.1.1.1 Obtenção e preparo da matéria-prima	32
2.1.1.1.2 Moagem/ Trituração	32
2.1.1.1.3 Condimentação.....	32
2.1.1.1.4 Cura/Embutimento	33
2.1.1.1.5 Envoltório.....	33
2.1.1.1.6 Amarrio	34
2.1.1.1.7 Pesagem/Embalagem.....	34
2.1.1.1.8 Comercialização	34
2.1.2 Vida útil da linguiça frescal.....	36
2.1.3 Microrganismos patogênicos presentes na linguiça frescal de frango.....	37
2.1.4 Bactéria ácido láctica da linguiça frescal	39
2.2 ADITIVOS EM ALIMENTOS	41
2.2.1 Lactato de sódio	42
2.3 MICROBIOLOGIA PREDITIVA	43
2.3.1 Objetivos e Aplicações da Microbiologia Preditiva	44
2.3.2 Modelos Preditivos.....	44
2.3.3 Comparação dos modelos preditivos.....	49
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS	51
3.1.1 Preparo do inóculo de <i>Lactobacillus plantarum</i>	51
3.1.2 Meios de crescimento.....	51
3.1.3 Produto cárneo.....	51

3.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>L. PLANTARUM</i> EM CALDO MRS, COM A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SAIS.....	52
3.2.1 Medida direta do crescimento por contagem de colônias	52
3.2.2 Medida indireta do crescimento por medida de absorbância	53
3.2.3 Influência da concentração de sais no crescimento de <i>L. plantarum</i> (Planejamento fatorial fracionário).....	53
3.3 OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE <i>L. PLANTARUM</i> PELO AJUSTE DO MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO	55
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO MERCADO.....	55
3.4.1 Análise estatística dos parâmetros de crescimento obtida através de modelagem matemática.....	56
3.4.2 Modelagem primária dos parâmetros de crescimento em função dos fatores de crescimento.....	56
3.5 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS EM LINGUIÇA FRESCAL.....	57
3.5.1 Elaboração das amostras de linguças frescal de frango	57
3.5.2 Acompanhamento da vida útil das linguças frescas.....	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SAIS NO CRESCIMENTO DA BACTÉRIA <i>L. PLANTARUM</i> EM CALDO MRS.....	69
4.1.1 Avaliação do crescimento de <i>L. plantarum</i> – planejamento fatorial fracionado	69
4.1.2 Modelagem matemática do crescimento de <i>L. plantarum</i> em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato).....	71
4.1.3 Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro μ_{\max} no crescimento da <i>L. plantarum</i> em meio MRS.	73
4.1.4 Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro A no crescimento da <i>L. plantarum</i> em meio MRS.	74
4.1.5 Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro λ no crescimento da <i>L. plantarum</i> em meio MRS....	75
4.2 AVALIAÇÃO DA VIDA ÚTIL DA LINGUIÇA FRESCAL DE FRANGO	76

4.2.1 Avaliação do crescimento de bactérias ácido láticas em linguiça frescal de frango.....	77
4.2.2 Modelagem matemática do crescimento de <i>L. plantarum</i> em linguiça frescal de frango com adição de lactato e sem adição de lactato em armazenamento isotérmico	77
5 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

O mercado de carnes e derivados no Brasil está se aperfeiçoando a cada dia. Açougues, casas de carnes e supermercados procuram melhorar a qualidade de seus produtos para satisfazer o consumidor cada vez mais exigente. A crescente demanda do mercado consumidor por produtos frescos e naturais, menos processados e de alta qualidade, aponta para a necessidade da utilização de tecnologias que proporcionem seguridade microbiológica, aumento da vida útil sem que haja alterações na qualidade nutricional e sensorial dos produtos.

O aumento do consumo desses produtos gera uma preocupação inevitável com a segurança alimentar, uma vez que os alimentos podem ser veiculadores de doenças que representa um risco à saúde pública. Diante da globalização e da crescente conscientização dos consumidores em procurar alimentos com qualidade microbiológica, toda a cadeia produtiva deverá estar preparada para o desafio de produzir alimentos seguros, com excelência de qualidade (BEZZERA e MARTINS, 2008).

Atualmente, tem-se evidenciado um aumento significativo no progresso da produção de embutidos pelas indústrias que têm investido cada vez mais na industrialização dos produtos cárneos, apresentando novas formulações visando à melhoria da qualidade e, principalmente, a segurança no consumo de alimentos.

Os embutidos são definidos pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal- RIISPOA como todo produto elaborado com carne ou órgãos comestíveis curados ou não, condimentado, podendo ou não ser cozido, defumado, dessecado, e contido em envoltório natural ou artificial (BRASIL, 1997).

A linguiça frescal é um produto que, por não sofrer processamento térmico ou dessecação e apresentar alta atividade de água, tem curto prazo comercial e qualidade microbiológica dependente da ausência ou de baixos níveis de contaminação na matéria-prima e demais ingredientes empregados na produção. A carne e os produtos cárneos, devido à sua alta atividade de água (aw), pH e presença de nutrientes, são sensíveis à deterioração microbiana (PEXARA *et al.*, 2002).

As bactérias do ácido láctico (BAL) foram identificadas como a principal população deteriorante de produtos cárneos embalados a vácuo

e em atmosfera modificada, além de outros produtos cárneos processados armazenados sob temperatura de refrigeração (BORCH *et al.*, 1996; HUGAS, 1998; NYCHAS *et al.*, 2008). A deterioração causada por estas bactérias é primordialmente devido à produção de metabólitos que causam mudanças indesejáveis na aparência, textura e flavor do alimento, produzindo odores e sabores desagradáveis, além de formar limo na superfície dos produtos (SAMELIS *et al.*, 2000; CAYRE *et al.*, 2003). Linhagens de BAL geralmente consideradas como naturais em carnes e produtos cárneos são: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus curvatus* e *Leuconostoc mesenteroides* (HUGAS, 1998). Essas bactérias abrangem um grupo complexo de microrganismos microaerófilos associados às plantas, carnes e produtos lácteos, podendo produzir uma diversidade de compostos antagonísticos ao crescimento de outras bactérias, fazendo parte da microflora natural de muitos produtos cárneos armazenados à temperatura de refrigeração e embalados a vácuo.

Para o consumidor, o final da vida útil de um produto se configura quando o alimento não possui segurança e/ou aparência, aroma e sabor aceitáveis. A vida útil, do ponto de vista microbiológico, depende do número de microrganismos, na sua maioria bactérias, inicialmente presentes e de seu subsequente crescimento. Durante o armazenamento, fatores ambientais como: temperatura, atmosfera gasosa, pH e teor de sal (NaCl) irão selecionar uma determinada bactéria e afetar sua velocidade de crescimento e atividade. Na determinação da vida útil de produtos cárneos, é comum o estudo de parâmetros microbiológicos (contagem total, contagem de *Lactobacillus*, enterobactérias, bolores e leveduras), químicos (acidez, índice de oxidação, perda de água) e sensoriais (aroma, sabor, textura, e aparência). Análises sensoriais devem ser realizadas durante a vida útil esperada, enquanto houver qualidade microbiológica (EBURNE & PRENTICE, 1996).

Um estudo realizado por Sarmiento (2006) revelou que alguns fatores podem aumentar a vida útil dos produtos cárneos, fez um levantamento microbiológico com amostras retiradas do processo de produção da linguiça defumada e mortadela, visando estudar a influência dos fatores (concentração de sal, de polifosfato (Pfosfato), de lactato, de nitrito/nitrato e de alho). No entanto o nitrito/nitrato e o alho não foram considerados estatisticamente significativos nas condições avaliadas. A partir dos resultados obtidos para as culturas puras, foram desenvolvidas novas formulações, alterando as porcentagens dos fatores: concentração de sais de lactato, de Pfosfato e de cloreto de

sódio. Entretanto, os resultados dessas pesquisas não foram os mais animadores, porque não foi definida a melhor faixa de concentração destes sais que leva a diminuição da velocidade de crescimento de bactérias ácido lácticas.

Os modelos da microbiologia preditiva são usados na descrição do comportamento de microrganismos a diferentes condições físico-químicas, como também podem ser usados para prever a segurança microbiana e a vida útil de produtos, através da procura por pontos críticos no processo, e para otimizar as cadeias de produção e distribuição (ZWIETERING *et al.*, 1991).

De acordo com Neumeyer *et al.*, (1997), as vantagens dos modelos preditivos na microbiologia de alimentos são inúmeras e incluem: prever a vida útil de produtos alimentícios, avaliar a eficiência da higiene do processamento e distribuição, determinar o efeito de variações nas condições de armazenamento e na determinação da segurança microbiológica de um produto.

Desta forma, este trabalho, teve como objetivo geral avaliar o crescimento de bactérias ácido lácticas, através da obtenção dos parâmetros de crescimento, em diferentes concentrações de cloreto de sódio e lactato de sódio. A partir dos resultados obtidos, elaborar uma nova formulação para linguiça frescal de frango e comparar a vida útil do produto com outra linguiça de formulação tradicional.

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

- Avaliar a influência de diferentes concentrações de cloreto de sódio e lactato de sódio sobre o crescimento de *L. plantarum*, através da obtenção dos parâmetros microbiológicos de crescimento.
- Estabelecer a melhor faixa de concentração dos sais para diminuir o crescimento da *L. plantarum*.
- Fabricar o produto com a concentração de sais resultante da análise de *L. plantarum* e comparar a vida útil do produto utilizando a nova formulação com a de um produto com a formulação tradicional, armazenados a 4°C.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EMBUTIDOS

A origem do processamento de carnes é muito remota e, provavelmente, surgiu a partir do momento em que a humanidade aprendeu a trabalhar com o sal como agente de preservação. Alguns povos da Ásia Menor moíam carnes parcialmente desidratadas e faziam embutidos com adição de condimentos. Mais tarde, de forma independente, esta descoberta foi feita pelos chineses e, então, vários tipos de embutidos foram produzidos 2000 anos antes da Era Cristã (BORGSTRON, 1976). De acordo com a mesma fonte, no Século XIX, a indústria de embutidos começou a adquirir capacitação tecnológica para o desenvolvimento de produtos, tanto artesanais como os de grande escala. O progresso foi acelerado a partir do conhecimento sobre o efeito do tratamento térmico na preservação de alimentos, publicado por Nicolas Appert em 1810, e pela construção dos primeiros compressores de refrigeração em 1874.

Segundo Furtado (2000), os embutidos surgiram no Brasil a partir da emigração de famílias alemãs e italianas, que trouxeram, entre os seus vários costumes, as receitas tradicionais desses produtos. No Brasil, devido às condições climáticas e ao paladar nacional, esses alimentos sofreram algumas adaptações. Na época, os artesãos foram, aos poucos, transformando sua arte em pequenas fábricas, enquanto os donos de açougues começaram a ousar no processamento industrial de carnes, a partir da elaboração do embutido mais simples, a linguiça, que dispensa a preparação de emulsões e equipamentos mais sofisticados. Posteriormente, vieram para o Brasil os grandes frigoríficos multinacionais, aumentando o volume de carne fresca processada.

A legislação brasileira considera como embutido o produto elaborado com carne ou órgãos comestíveis, curado ou não, condimentado, cozido ou não, tendo como envoltório a tripa, bexiga ou outra membrana animal. É permitido o emprego de películas artificiais no preparo de embutidos, desde que aprovadas pelo DIPOA (BRASIL, 1997).

Os embutidos cárneos, considerando-se o volume de produção, enquadraram-se na categoria de maior importância para o segmento de

carnes no Brasil, sendo inúmeras as classes de produtos aí incluídas. Embora os embutidos cárneos sejam constituídos basicamente de tecido muscular, tecido adiposo e água, pode-se constatar que se trata de um alimento complexo. Inclusive no campo da pesquisa científica, vários pontos ainda permanecem pouco conhecidos (LEMOS; YAMADA, 2002).

Acredita-se que a tendência deste mercado de produtos industrializados seja aumentar cada dia mais à medida que a conveniência e variedade se tornam importantes para o consumidor.

2.1.1 Linguiça Frescal

Segundo o Ministério do Planejamento do Brasil, no ano de 2007, a venda de linguiças aumentou em 14% em relação a 2006, totalizando 382 mil toneladas, o maior crescimento dos últimos seis anos. Em reais, o consumo foi igualmente expressivo, representando alta de 15%, para R\$ 2,5 bilhões, tornando a linguiça líder no segmento de embutidos, responsável por 30% do faturamento deste mercado. Na sequência, estão a mortadela (14% das vendas), presunto (12,5%) e salsicha (11%). E, com isso, o mercado de embutidos teve uma alta competitividade na última década, uma vez que o seu consumo se tornou parte do hábito alimentar de uma parcela considerável de consumidores brasileiros, e dentre os embutidos, a linguiça frescal é um dos mais consumidos devido a seu processamento relativamente simples e preço acessível.

Entende-se por linguiça, o produto cárneo industrializado, elaborado a partir de carnes de uma ou mais espécies de animais de açougue, obtido na forma crua ou cozido, dessecado ou não, defumado ou não, curado ou não, adicionado ou não de gorduras, ingredientes, e embutido em tripas naturais ou artificiais. Este produto tem sua classificação variável de acordo com a composição da matéria-prima e a tecnologia utilizada no processo de fabricação (BRASIL, 2000).

A carne é um alimento rico em nutrientes para a alimentação, mas se deteriora facilmente, se não for usado um método conveniente de conservação. A fabricação de linguiças tem sido adotada como forma de conservar melhor a carne, fornecer ao consumidor um produto de paladar variado e adequado, e para a indústria aproveitar melhor a chamada "carne de segunda". Existem muitos tipos de linguiças, variando na sua formulação, processo de fabricação, tipo de tripa utilizado e diferentes métodos de conservação. As linguiças se classificam de acordo com o tratamento térmico em: frescas, cozidas e

defumadas, podendo sofrer outras variações de acordo com a condimentação utilizada, o tipo de matéria-prima (suína, bovina, aves, mista), a granulometria da carne, o tamanho dos gomos, calibre das tripas, etc. Dessa forma, as características devem ser estabelecidas por cada fabricante, dando ao produto especificações próprias (PARDI, 1993).

2.1.1.1 Processamento tecnológico para elaboração de Linguiça

2.1.1.1.1 Obtenção e preparo da matéria-prima

Segundo Bressan e Perez (2001) a carne a ser utilizada no preparo da linguça deve estar livre de nervos, tecidos com hematomas, pequenos pedaços de ossos e objetos estranhos.

2.1.1.1.2 Moagem/ Trituração

A matéria-prima (carne, toucinho ou papada) deve ser reduzida a pedaços menores para facilitar o processo de moagem. Dessa matéria-prima, as carnes duras devem ser finamente moídas, enquanto as carnes mais macias e as gorduras devem ser moídas em discos de maior calibre. A temperatura da carne a ser moída deve ser de 0 a 4°C, pois a moagem provoca um aquecimento indesejável da carne (PARDI *et al.*, 1996).

2.1.1.1.3 Condimentação

Os temperos utilizados na formulação devem ser previamente separados, pesados e dissolvidos em água gelada. Após a moagem, os componentes da formulação (carne, outros ingredientes e os temperos, diluídos ou não em água) devem ser transferidos para um recipiente apropriado e misturados de forma homogênea para que essa massa obtenha boa liga. O uso da água gelada, além de facilitar a diluição dos condimentos e a homogeneização do tempero à massa, contribui para a redução de sua temperatura. A seguir, a massa é submetida ao processo de cura por algumas horas em câmara de resfriamento a temperatura de 0° C. A quantidade dos condimentos utilizados bem como da matéria-prima varia conforme a formulação do produto.

2.1.1.1.4 Cura/Embutimento

A cura de carnes era originalmente usada com a finalidade de preservar a carne por longos períodos durante a escassez. Apesar dos avanços nos meios de frigorificação e a viabilidade desses meios em casa, a cura continua sendo utilizada também como um meio de preservação (PEARSON; GILLET, 1996). Na concepção atual, entende-se por cura o processo de desenvolvimento de cor, sabor e textura característica para cada tipo de produto cárneo, por meio de diferentes tratamentos por sal, aditivos químicos, especiarias, fermentação bacteriana, defumação, etc., tornando-o mais atrativo para o consumidor (TAKAHASHI, 1979).

2.1.1.1.5 Envoltório

Conforme Vannucci (1999), os intestinos mais usados são os de bovinos, suínos e ovinos. Entretanto, ocasionalmente, usam-se também os de cavalo, vitelo e cabra. O aproveitamento dos intestinos e outros órgãos como a bexiga, esôfago e estômago é diferenciado, variando conforme a espécie animal. Como envoltório para se embutir linguiças do tipo frescal e cozida podem ser usadas tripas artificiais ou naturais de suínos, bovinos ou ovinos, com calibre médio de (28-32 mm) previamente umedecidas. Simultaneamente ao enchimento da tripa, são realizadas as torções para posterior amarrão. Normalmente, as torções são feitas a cada 10 cm.

As tripas naturais são os envoltórios tradicionais e apresentam algumas vantagens em relação aos artificiais, tais como a proteção ao sabor puro da linguiça, pois mantém a suculência e permite o sabor característico da defumação na porção interna desse produto.

O preparo da tripa natural envolve as fases de: desorelhamento, esvaziamento do intestino, viragem da tripa, exposição da mucosa, raspagem, insuflação, medição, calibração e salga seca. Deve ser iniciada imediatamente após ser recepcionada na triparia (área suja) por compressão da mesma entre os dedos, num único sentido em toda a sua extensão. Após, procede-se a lavagem interna e externa das tripas com água corrente e a raspagem da mucosa. Uma vez terminado esse processo, as tripas devem ser lavadas com vinagre para eliminar o cheiro desagradável. Depois de inspecionada a tripa, quanto às condições de limpeza, cor, odor, presença de parasitas ou manchas de sangue, ulcerações ou cortes, ela é levada para a mensuração e a calibragem feita

após a insuflação. As tripas, assim beneficiadas, são levadas para a salgação ou para dessecação. A salga a seco é realizada esfregando-se o sal diretamente nas tripas. Essas peças devem ser colocadas sobre uma superfície inclinada por 24 horas com a finalidade de intensificar os sabores e aroma, além da preservação do produto. O sal atua como um agente desidratante e bacteriostático. Após esse período, as tripas são esfregadas com sal refinado e podem então ser armazenadas até o momento do uso. Existem no mercado tripas naturais processadas. Entretanto, para o emprego dessas tripas, são necessários cuidados, tais como: retirada do excesso de sal fino com água corrente, e reidratação das tripas por imersão em água fresca por 1 hora (tendo o cuidado de massagear e separar as mesmas para evitar possíveis manchas). No momento de embutir, as tripas devem ser colocadas em água aquecida, pois este procedimento facilitará o embutimento e amoldamento da massa ao envoltório.

2.1.1.1.6 Amarrio

Pardi *et al.*, (2006) escreveram que as extremidades dos envoltórios e regiões de torção devem ser amarradas com fio de algodão (barbante). A pressão dos nós não deve ser excessiva para não causar corte na tripa e extravasamento da massa. Entretanto, em alguns tipos de linguiça, os gomos podem ficar soltos sem amarrio.

2.1.1.1.7 Pesagem/Embalagem

As linguiças são pesadas (peso líquido de 1 kg, 5 kg, 10 kg, 20 kg ou 30 kg) e embaladas em máquinas a vácuo (filme de polietileno). Faz-se a termossoldagem e depois são submersas rapidamente em tanques contendo água quente para promover a retração da embalagem. São acondicionadas em caixas de papelão, previamente identificadas para o tipo de linguiça, e transferidas para câmaras de estocagem para produtos resfriados (1°C) até a sua expedição (BRESSAN; PEREZ, 2001).

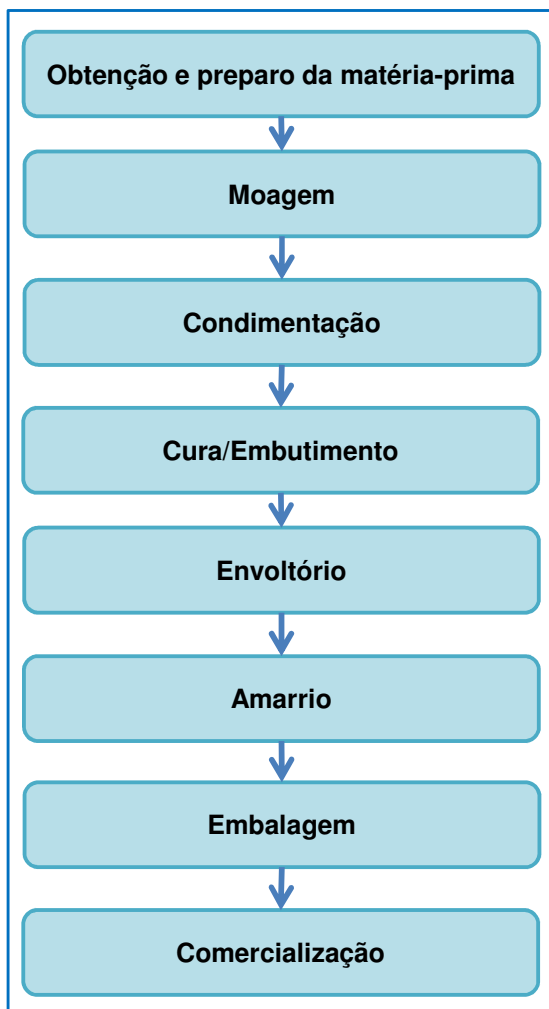
2.1.1.1.8 Comercialização

A linguiça tipo frescal é comercializada embalada a vácuo ou em bandejas com filme plástico. O prazo de validade da linguiça tipo frescal

é de sete dias mantida sob resfriamento de 4 a 7°C (PARDI *et al.*, 1996).

Para se ter uma idéia global das operações tecnológicas básicas do processamento de linguiças, será seguido o esquema a seguir, que, em linhas gerais, se adapta ao processamento destinado ao fabrico de linguiça tipo frescal.

Figura 1. Fluxograma para elaboração do produto cárneo linguiça tipo frescal.



Fonte: Bressan e Perez (2001).

2.1.2 Vida útil da linguiça frescal

Em geral, os produtos cárneos embutidos não cozidos apresentam uma alta incidência de contaminantes, incluindo os microrganismos patogênicos, e são de qualidade microbiológica inferior comparativamente aos cortes cárneos (VARNAM; SUTHERLAND, 1995). De acordo com os autores, este fato deve-se a três fatores principais: a) uso de ingredientes de qualidade inferior, que são sujeitos a altos níveis de manipulação e, possivelmente, ao abuso da temperatura; b) mistura de vários ingredientes leva ao espalhamento dos contaminantes por todo o produto, e; c) constituintes celulares são liberados durante a cominuição e operações subsequentes, fornecendo uma fonte disponível de nutrientes. Ao mesmo tempo, a área superficial disponível para o crescimento microbiano é intensamente aumentada e os microrganismos, inicialmente na superfície do produto, são distribuídos por toda a carne.

Pelas razões expostas acima, já é esperado uma microbiota inicial na linguiça. Em função disso, A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001), aprovou o regulamento técnico sobre padrões microbiológico para alimentos, estabelecendo para linguiças frescas o limite máximo de 5×10^3 UFC/g para coliformes termotolerantes, 5×10^3 UFC/g para *Staphylococcus* coagulase positiva, 3×10^3 UFC/g para *Clostridium* sulfito redutor e ausência de *Salmonella* sp. em 25g de alimento.

Sob o aspecto físico-químico a linguiça frescal deve possuir como características, no máximo 70% de umidade, 30% de gordura e no mínimo 12% de proteína. Sendo proibida a adição de Carne Mecanicamente Separada (CMS), assim como a adição de amido (BRASIL, 2000). Os produtos da oxidação lipídica são indesejáveis, não somente pela produção de odores e “flavours” ofensivos como resultado da decomposição de lipídios e produção de compostos voláteis, mas também pela destruição de constituintes essenciais, ocasionando o decréscimo do valor nutricional dos alimentos e a formação de compostos tóxicos durante o processamento (FRANKEL, 1996).

Outros parâmetros físico-químicos importantes na avaliação da qualidade do produto segundo Miyasaki *et al.*, (2009) é o fato da linguiça frescal apresentar pH por volta de 6,0 e Atividade de água (Aa) alta, maior que 0,98, sendo considerados fatores importantes para o desenvolvimento microbiano. Além disso, esse produto deve ser comercializado sobre temperatura de refrigeração sendo necessário o tratamento térmico antes do consumo.

As características sensoriais da linguiça frescal são definidas conforme o processo de obtenção do produto, sendo a cor, o sabor, a textura e o odor, característicos da matéria-prima e dos ingredientes utilizados (BRASIL, 2000).

2.1.3 Microrganismos patogênicos presentes na linguiça frescal de frango

As linguiças são alimentos muito expostos à contaminação e representam um excelente meio para a multiplicação de microrganismos. As prováveis fontes de contaminação compreendem as carnes, as tripas ou envoltórios, os temperos ou condimentos, bem como a água utilizada em todas as aplicações de limpeza e manutenção. (MANHOSO, 1996).

A fabricação de linguiças tipo Frescal requer uma série de etapas de manipulação, o que eleva as possibilidades de contaminação por diversas espécies de microrganismos, patogênicos ou deterioradores, podendo comprometer a qualidade microbiológica do produto final (MARQUES et al, 2006). Desta forma, a qualidade do produto elaborado reflete as condições da matéria-prima e ingredientes empregados em sua produção (MOROT-BIZOT *et al.*, 2006). Além disso, o manipulador envolvido no processamento bem como os equipamentos e utensílios inadequadamente higienizados, podem ser importantes fontes de contaminação (CHEVALLIER *et al.*, 2006). Dentre os microrganismos patogênicos que potencialmente podem estar presentes em derivados cárneos como a linguiça, destacam-se *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (HOFFMANN *et al.*, 1996). Em função da presença destes agentes, os produtos cárneos podem constituir sérios problemas para a saúde pública, uma vez que estas bactérias são causas comuns de toxinfecções alimentares (MARQUES *et al.*, 2006). Os coliformes fecais indicam contaminação de origem fecal recente do produto sendo que a detecção de elevado número destas bactérias em um alimento, inclusive em processados, é interpretada como possível presença de patógenos intestinais (MOTTA; BELMONT, 2000). No Brasil, a partir de janeiro de 2001, passou a vigorar nova resolução que modificou os padrões microbiológicos previstos anteriormente, como forma de compatibilizar a legislação nacional com regulamentos acordados no Mercosul (BRASIL, 2001). Assim, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece a enumeração de coliformes fecais e de

estafilococos coagulase positiva (ECP) por grama do produto, bem como ausência de *Salmonella* spp. em 25 gramas como indicadores de qualidade microbiológica para linguiça frescal.

Os cuidados, portanto, devem ter início ainda na produção primária, já que vários dos microrganismos causadores de DTA (doenças transmitidas por alimentos) são originários desta fase inicial e conseguem permanecer ao longo de todo o processo de produção, especialmente no caso dos produtos frescais. No entanto, pouco se sabe sobre a ecologia desses agentes nas unidades primárias de produção, principalmente naquelas em que existe uma grande concentração de animais, os chamados sistemas de criação intensiva, uma importante fonte de matéria-prima para a produção de carne *in natura* e derivados (SMITH *et al.*, 1997; BARKOCYGALLAGHER *et al.*, 2002).

Silva *et al.*, (2004) afirmaram que alimentos com muita manipulação como as linguiças do tipo frescal são frequentemente responsáveis pela veiculação de agentes de enfermidades transmitidas por alimentos. Além disso, a alta atividade de água que esses produtos apresentam e a ausência de processamento térmico durante sua fabricação, elas criam condições propícias para que os mesmos se tornem um veículo para microrganismos.

A demanda por produtos avícolas tem crescido a cada ano (YUSTE *et al.*, 2000) e vários trabalhos têm identificado contaminações microbiológicas na carne e produtos derivados de frango (MILANI *et al.*, 2003; CANSIAN *et al.*, 2005). Sabioni *et al.*, (1999), analisando 30 amostras de linguiça frescal, por exemplo, identificaram que 3,0% delas encontravam-se impróprias ao consumo.

Souza, Faria e Neves (2003) avaliaram a adequação das temperaturas de armazenamento e exposição de embutidos em Belém-PA, e detectaram que as câmaras frias apresentavam temperaturas adequadas, porém os balcões refrigerados apresentaram temperaturas acima da máxima permitida (10°C), evidenciando a necessidade de monitoramento e de regulação dos mesmos para manutenção da segurança microbiológica e prazo de validade do produto. Há evidências de que o controle apresenta-se totalmente falho no trajeto entre o mercado e residências, no armazenamento em domicílio, e também durante o preparo até o consumo, demonstrando a necessidade de ações educativas direcionadas aos consumidores (NYCHAS *et al.*, 2008). Isto foi comprovado em pesquisa realizada por Patron (2006), em Trindade, onde os consumidores afirmaram que após a compra, os alimentos perecíveis eram frequentemente transportados em carros de passeio sem embalagens isotérmicas ou refrigerados, e permaneciam em média 4,2

horas fora de refrigeração. Quando questionados sobre a temperatura ideal de refrigeração e de congelamento, a maioria dos entrevistados não soube responder ou respondeu incorretamente. Nestas condições o crescimento de muitos microrganismos se torna seletivo, mas as bactérias lácticas se apresentam como o componente principal da microflora de deterioração (KORKEALA; BJÖRKROTH, 1997).

As bactérias ácido lácticas foram identificadas como a maior população deteriorante em produtos embalados à vácuo, e em atmosfera modificada, além de outros produtos cárneos processados armazenados sob temperatura de refrigeração (SAMELIS *et al.*, 2000). As bactérias ácido lácticas influenciam significativamente na qualidade da carne e produtos cárneos e estão associadas com a deterioração destes produtos.

2.1.4 Bactéria ácido láctica da linguiça frescal

Bactérias ácido lácticas englobam um diverso grupo de bactérias Gram-positivas não formadoras de esporos. Essas bactérias existem nas formas de cocos ou bacilos (WOOD; HOLZAPFEL, 1995). As bactérias lácticas são um grupo de bactérias que produzem ácido láctico como produto metabólico. As BAL têm a propriedade de produzir ácido láctico através da fermentação de carboidratos e têm sido utilizadas para fermentar alimentos há pelo menos 4.000 anos. Os *Lactobacillus* são estritamente fermentativos, aero-tolerantes ou anaeróbicos, acidófilos e com complexas exigências nutricionais como carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ésteres de ácidos graxos, sais, vitaminas e derivados de ácidos nucléicos (LEITE, 2006).

As bactérias ácido lácticas têm importância na preservação dos alimentos, interferindo na multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas por meio de mecanismo como: competição por oxigênio, produção de substâncias antagonicas, especialmente bacteriocinas, entre outros (AMMOR *et al.*, 2006). Entretanto, o crescimento incontrolável de algumas espécies de bactérias ácido lácticas pode causar deterioração em carnes e produtos cárneos. A deterioração causada é primordialmente devido à produção de metabolitos que causam mudanças indesejáveis na aparência, textura e flavor do alimento, produzindo odores e sabores desagradáveis, além de formar limo na superfície dos produtos (BORCH *et al.*, 1996; SAMELIS *et al.*, 2000; CAYRÉ *et al.*, 2003; NYCHAS *et al.*, 2008).

Elas são pertencentes à família *Lactobacillaceae* são classificadas em diferentes gêneros baseado em características morfológicas, tipo de

fermentação da glicose, crescimento em diferentes temperaturas, configuração do ácido láctico reduzido, capacidade de crescer em altas concentrações de sal, e tolerância a substâncias ácidas e alcalinas (STAINER et al, 1995).

As bactérias lácticas são microrganismos microaerófilos que apresentam melhor desenvolvimento em meios com baixas tensões de oxigênio. Apresentam-se sob a forma de cocos ou bacilos, não redutores de nitrato e nitrito. Classificam-se como mesófilas ou termófilas, com temperaturas ótimas de crescimento variando de 30 a 37°C e 45 a 50°C, respectivamente. São produtoras de ácido láctico como produto do metabolismo primário e ineficiente quanto à produção de energia, necessitando de grande quantidade de açúcar, vitaminas do complexo B e alguns aminoácidos, em determinadas espécies, para obtenção de energia suficiente para a biossíntese e reprodução (FERREIRA, 1987, KLEIN *et al.*, 1998; CARR; CHILL; MAIDA, 2002; FERREIRA, 2003).

Sobre condições anaeróbias ou microaerófilas, as bactérias ácido lácticas, podem provocar modificações nos produtos cárneos com o aumento da acidez, com exudados leitosos, viscosos, podem promover a perda da coloração e, com a produção de gás, podem ainda provocar inchamento na embalagem. A temperatura é o principal fator responsável pelas reações de deterioração, mas o desenvolvimento bacteriano em produtos embalados, além da temperatura, também é influenciado pela atividade de água e a disponibilidade de oxigênio, que vai determinar a quantidade e o tipo de microrganismos que poderá se desenvolver naquelas condições, nas carnes e produtos cárneos (DEVLIEGHERÉ *et al.*, 1998a; LABADIE, 1999; CAYRÊ *et al.*, 2003).

O esverdeamento de produtos cárneos curados é um problema muito bem conhecido pelas indústrias de carnes, e uma destas causas se deve ao microrganismo *Lactobacillus viridescens*, o qual pode ser isolado de quase todas as indústrias de processamento de carnes (MILBOURNE, 1983).

Para controlar o desenvolvimento microbiano e as consequências dos microrganismos nos alimentos, são utilizados os mais diversos métodos de preservação de alimentos. A embalagem a vácuo tem se mostrado muito eficaz para estender a vida útil de alimentos perecíveis tais como produtos cárneos (CHURCH; PARSONS, 1995). A fonte do oxigênio será restrita em produtos embalados a vácuo, assim sendo, apresenta efeito seletivo na população microbiana (FARBER, 1991; LABADIE, 1999). A microbiota deteriorante dos produtos cárneos embalados a vácuo ou com atmosfera modificada, consiste

principalmente de *Lactobacillus plantarum* spp., predominante *L. sakey* e *L. curvatus*, seguido de *Brochothrix thermosphacta*, *Leuconostoc* spp., *Weisella* spp. e de *Carnobacterium* spp. (BORCH *et al.*, 1996; SAMELIS *et al.*, 2000).

2.2 ADITIVOS EM ALIMENTOS

Segundo Silva (2000), a adição de produtos químicos aos alimentos não é um processo moderno de conservação. O homem pré-histórico, com a descoberta do fogo, criou o processo de defumação, utilizado até os dias atuais na preservação de alguns alimentos. Posteriormente, ele aprendeu a utilizar o sal na conservação das carnes, condimentos para melhorar a palatabilidade, além de realizar a fermentação de produtos de origem animal e vegetal. Ainda segundo o autor, com o avanço da indústria química, a indústria de alimentos tem sido beneficiada pelo surgimento de novas substâncias que podem ser adicionadas aos alimentos com o objetivo de melhorar a cor, o aroma, a textura, o sabor, bem como seu valor nutritivo.

A demanda dos consumidores por alimentos seguros à saúde tem aumentado consideravelmente, desencadeando a busca por novos ingredientes e aditivos que tenham ação antimicrobiana e que possam reduzir a contaminação garantindo a segurança dos produtos cárneos.

Em relação às definições de ingredientes e aditivos, a ANVISA, por meio de Brasil (2000b), definiu ingrediente como “qualquer substância, empregada na fabricação ou preparação de um alimento e que permanece no produto final, ainda que de forma modificada” e aditivo alimentar como,

[...] qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento.

Segundo Zimber (1985), os aditivos usados na indústria de carnes são classificados em: acidulantes, antioxidantes, conservadores, corantes e estabilizantes. Dentre estes aditivos, realizar-se-á uma revisão mais aprofundada da utilização do lactato de sódio, pois se tratou do aditivo empregado neste estudo.

2.2.1 Lactato de sódio

O lactato de sódio é um sal natural sendo utilizado na indústria cárnea como flavorizante e extensor de validade comercial para produtos de carne bovina e de aves (PAPADOPOULOS *et al.*, 1991). Comercialmente, o lactato de sódio tem a fórmula molecular $\text{CH}_3\text{CHOHCOONa}$ e peso molecular 112,07, comercializado em solução aquosa à 60% com pH neutro (SHELEF, 1994).

A primeira lei usada para regulamentar o uso do lactato de sódio no Brasil foi a Resolução CNS/MS, de 24 de novembro de 1988 (BRASIL, 1988), permitindo a utilização do mesmo como umectante para balas, bombons, dentre outros. Em seguida, em 15 de janeiro de 1990 foi autorizada pela Secretaria de Inspeção de Produto Animal, através da SIPA-AUP nº 235/90 o emprego de lactato de sódio como coadjuvante tecnológico, na fabricação de produtos cárneos na proporção de 2% sobre o produto final (BRASIL, 1990). Em 1995 ocorreu autorização pela Secretaria de Vigilância Sanitária, através da Portaria nº 35, de 28 de abril de 1995, a utilização do lactato de sódio com função umectante em embutidos de carne, sem limite máximo de aplicação (BRASIL, 1995).

Já a ANVISA, através da RDC nº 386, de 5 de agosto de 1999, o lactato de sódio é classificado como regulador da acidez e como antioxidante, não exigindo limite de aplicação (BRASIL, 1999).

O efeito inibitório dos sais do ácido láctico no crescimento de bactérias ácido lácticas, estudado por muitos pesquisadores (DEBEVERE *et al.*, 1989; DE WIT; ROMBOUTS, 1990; HOUTSMA *et al.*, 1996; SARMENTO, 2006) que concluíram que a adição de lactato de sódio em produtos cárneos cozidos embalados a vácuo resultou na extensão da vida útil destes produtos.

Vasavada *et al.*, (2003) concluíram que a concentração de lactato de sódio a 2,7% foi a que apresentou maior eficácia no controle de bactérias aeróbias. Sallam e Samejima (2004) demonstraram também que o uso do lactato de sódio foi eficaz sobre bactérias aeróbias, aumentando a validade comercial em produto alimentício apresentando, no entanto, como fator limitante à sua utilização, a obtenção de um produto final mais salgado.

Kitakawa (2002), investigou a influência da utilização de lactato de sódio isoladamente, em combinação com nitrito de sódio, na vida útil de linguiça mista frescal. Em geral, foi observado que a adição de 1,2% de lactato de sódio promoveu o retardamento do crescimento de bactérias psicrotróficas totais e lácticas em até 3 dias, a estabilidade do

pH e a redução da atividade de água, quando comparada com as formulações sem lactato.

2.3 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A ocorrência de doenças veiculadas por alimentos (DVA) é cada vez mais frequente, atingindo um número cada vez maior de indivíduos, o que pode ser observado pela ocorrência de surtos relatados em todo o mundo.

Segundo dados de 2011 do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Center Disease Control* - CDC), 48 milhões de pessoas são acometidas por DVA's nos Estados Unidos da América a cada ano, resultando em mais de 128.000 hospitalizações e aproximadamente 3.000 mortes ao ano (CDC, 2011).

No Brasil, 8.663 surtos foram notificados entre 2000 e 2011, atingindo 163.425 pessoas, das quais 112 vieram a óbito (BRASIL, 2012). Por esta razão, a microbiologia preditiva tem sido estudada e utilizada no sentido de favorecer a qualidade e a segurança microbiológica dos alimentos, permitindo prever a resposta de crescimento do microrganismo frente a variações de fatores como exemplo temperatura, condições de armazenamento, umidade e pH. O que permite analisar riscos, avaliar a vida útil, desenvolver novos produtos e processos, aliando ações na tomada de decisão.

Tradicionalmente, os microbiologistas de alimentos explicam as diferenças entre as microbiotas do produto fresco e do produto deteriorado através de análises de contagem de microrganismos. Como esta metodologia é demorada, não é possível uma medida preventiva da contaminação do produto antes que o mesmo seja distribuído. É evidente a impossibilidade da realização de uma análise microbiológica precisa da ampla variedade dos produtos, processos e condições de armazenamento a partir dos métodos tradicionais. Além disso, os resultados não proporcionam uma base de dados que seja significativa e aplicável a produtos e circunstâncias futuras. Deste modo, foi proposta a microbiologia preditiva, na qual as respostas do crescimento dos microrganismos nos alimentos seriam modeladas em relação aos principais parâmetros de controle (ROBERTS, 1992).

2.3.1 Objetivos e Aplicações da Microbiologia Preditiva

A utilização da microbiologia preditiva pela indústria de alimentos é importante para prever o comportamento dos microrganismos nos alimentos, fornecendo ferramentas importantes para determinar as consequências do processamento e manuseamento crescente dos alimentos, em termos de crescimento, sobrevivência e até inativação dos microrganismos. A microbiologia preditiva descreve, de forma quantitativa, os efeitos dos fatores (intrínsecos e extrínsecos) no crescimento ou inativação dos microrganismos nos alimentos. Para tanto, são construídos modelos matemáticos derivados de estudos quantitativos dos microrganismos sob dadas condições experimentais, gerando curvas de crescimento/inativação microbiana (DANNENHAUER, 2010).

Diante disso, a metodologia preditiva utiliza estas etapas principalmente para fornecer maiores informações sobre o comportamento microbiano em diferentes situações, dando subsídio à segurança e qualidade dos alimentos (NAKASHIMA *et al.*, 2000). Os modelos preditivos podem ser definidos como equações matemáticas que descrevem o crescimento, sobrevivência, inativação ou processo bioquímico de um dado microrganismo, sobre determinadas condições (McDONALD; SUN, 1999).

2.3.2 Modelos Preditivos

Poder-se-ia pensar, há muitos anos, que os modelos a serem utilizados para a microbiologia preditiva poderiam ser simplesmente copiados daqueles elaborados para a biotecnologia e a engenharia química, mas Baranyi e Roberts (1994) ressaltam que são muitos os motivos que para que a microbiologia preditiva construa seus próprios modelos estatístico-matemáticos. Alguns destes motivos são listados a seguir:

- Contrariamente do que ocorre na biotecnologia, que visa à otimização, o objetivo dos microbiologistas de alimentos é minimizar ou prevenir o crescimento microbiano, investigando profundamente os fatores inibitórios;
- A concentração de células de interesse é muito menor do que na biotecnologia (maior que 10^6 ou 10^7 células/mL). Consequentemente, alguns métodos que são validados a altas

concentrações celulares, como a turbidimetria e as medidas de condutância, não podem ser aplicados diretamente; sendo necessário estabelecer a relação entre o número de células e a medida na menor concentração celular;

- A fase lag do crescimento microbiano é menos importante em um biorreator do que na microbiologia de alimentos;
- A quantidade de informações sobre a composição físico-química do alimento é menor e menos exata quando comparada a de um biorreator, conseqüentemente, os métodos estatístico-matemáticos aplicados envolvem várias simplificações e elementos empíricos.

O emprego de modelos matemáticos na microbiologia preditiva, para a previsão e explicação do crescimento biológico contribui de forma significativa para o estudo e desenvolvimento de novos testes e teorias a respeito do fenômeno envolvido. Ou seja, pode-se avaliar o efeito dos principais parâmetros envolvidos no fenômeno e assim buscar equacionar tais comportamentos, com o objetivo de estabelecer projeções futuras e seguras em relação ao fenômeno quanto à variação dos parâmetros envolvidos. O desenvolvimento de um modelo microbiológico deve incluir as seguintes etapas (STRINGER; DENNIS, 2000):

- Seleção cautelosa e preparação apropriada do microrganismo alvo;
- Inoculação do microrganismo alvo num meio de cultura (meio microbiológico ou alimento) com características definidas;
- Armazenamento do meio de cultura em condições controladas;
- Amostragem do meio de crescimento para o microrganismo alvo em determinados intervalos de tempo;
- Construção de um modelo que descreva as respostas do microrganismo alvo;
- Validação das predições do modelo, tendo como preferência a validação do modelo em um alimento para assegurar que são significativas;
- Reparametrização ou melhoramento do modelo.

Os modelos são obtidos a partir de estudos, onde são realizados a determinação do crescimento microbiano, ao longo de um tempo delimitado sob condições como, temperatura, pH e meio, são conhecidas e controladas. O tratamento destes dados permite obter uma equação

matemática que poderá prever o tempo de ajuste ao meio (fase lag) e/ou a velocidade específica máxima de crescimento (ANASTÁCIO, 2009). Podendo ser, então, extrapolados para os alimentos, baseado na premissa de que as quatro respostas das populações de microrganismos aos fatores ambientais que afetam seu crescimento e sobrevivência são reprodutíveis, tornando possível a partir de observações anteriores, prever as respostas microbianas em outros ambientes semelhantes (FAKRUDDIN *et al.*, 2011).

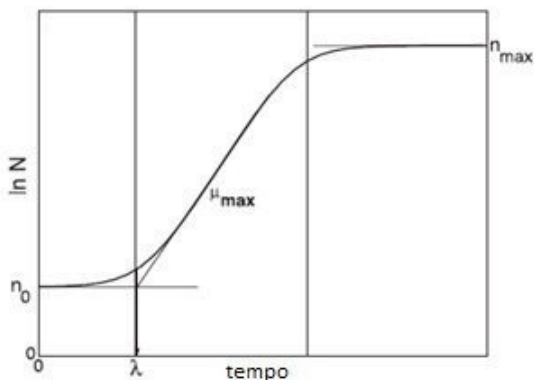
De modo geral, os modelos preditivos avaliam parâmetros cinéticos de crescimento, dentre eles: (λ) duração da fase lag; (μ) velocidade específica máxima de crescimento (velocidade que a população duplica dentro da fase exponencial) e (A) densidade populacional máxima de crescimento final (maior contagem microbiana, na fase estacionária) (BATY; DELIGNETTE-MULLER, 2004). Sabe-se que o processo de deterioração dos alimentos, decorrente da multiplicação de microrganismos ocorre durante as fases lag e exponencial.

Whiting e Buchanan (1993) propuseram a classificação dos modelos em primários, secundários e terciários.

Como exemplo de aplicação, os modelos de nível primário podem ser utilizados para descrever a redução da contagem de UFC durante um processamento térmico e a formação de toxina microbiana ao longo do tempo (NAKASHIMA *et al.*, 2000). Utilizam-se, de maneira clássica, três parâmetros na caracterização de uma curva de crescimento microbiano: a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), a duração da fase lag (λ) e a população máxima atingida (N_{\max}) ou aumento logarítmico da população ($N_{\max} - N_0$). Estes parâmetros de crescimento podem ser observados na Figura 2.

Os modelos primários de crescimento mais utilizados na literatura são o modelo de Gompertz ou Gompertz modificado, modelo Logístico, modelo Logístico modificado, modelo de Baranyi e Roberts, e modelo linear de três fases, também conhecido como modelo de Buchanan.

O modelo de Gompertz tem sido utilizado com sucesso para descrever o comportamento microbiano em diferentes alimentos (MASSON *et al.*, 2002). Este modelo foi introduzido na microbiologia de alimentos por Gibson *et al.*, (1987), onde estes autores compararam a equação logística e a de Gompertz na parametrização de uma curva de crescimento de *Clostridium botulinum* (ROSS; McMEEKIN, 1994; GIANNUZZI *et al.*, 1998; LABUZA; FU, 1993). O Modelo de Gompertz, representado na Equação 2.1 (ERKMEN; ALBEN, 2002).

Figura 2. Curva típica de crescimento microbiano.

Fonte: (VAN IMPE *et al.*, 1995; SWINNEN *et al.*, 2004).

$$y = a \cdot \exp \{-e^{x p (b-c \cdot t)}\} \quad (2.1)$$

Onde y é a densidade da população (logaritmo do número de unidades formadoras de colônias/ml) num dado tempo t (h). Os parâmetros a , b , e c , são estimados pelo modelo. Estes parâmetros estão relacionados com os parâmetros microbiológicos de crescimento pelas seguintes equações:

$$a = A \quad (2.2)$$

$$b = 1 + \frac{\mu_{\max} \cdot \lambda}{A} \quad (2.3)$$

$$c = \frac{\mu_{\max}}{A} \quad (2.4)$$

A função ou Modelo de Gompertz foi modificado por Zwietering *et al.*, (1990). A reparametrização do modelo foi feita para que os parâmetros estimados pudessem ter um significado biológico. Os parâmetros de crescimento foram então introduzidos no modelo. Isto facilitou o encontro de valores iniciais e o cálculo de intervalos de confiança durante o ajuste da curva (LABUZA; FU, 1993; VAN IMPE *et al.*, 1995).

O Modelo de Gompertz Modificado está representado na Equação 2.5.

$$N_{t,y} = A \exp \left\{ - \exp \left\{ \left(\frac{\mu_{\max} X_0}{A} \right) (\lambda - t) \right\} + 1 \right\} \quad (2.5)$$

Onde:

A = população máxima atingida;

μ = velocidade específica máxima de crescimento;

λ = duração da fase lag (h);

t = tempo (h).

Os modelos que descrevem a variação dos parâmetros cinéticos em função da variação de uma condição ambiental são conhecidos como modelos secundários (WHITING, 1995; SCHAFFNER; LABUZA, 1997; McDONALD; SUN, 1999; NAKASHIMA *et al.*, 2000; McMEEKIN; ROSS, 2002; MARKS, 2008).

Os principais modelos secundários são: Modelo Belehradek, Modelo Ratkowsky, Modelo Arrhenius, Modelo Modificado de Arrhenius, Modelos probabilísticos, Valores Z, Polinomiais ou resposta, Modelos de superfície, Modelo Williams-Landel Ferry, Modelo log-logístico, Modelo Weibullde, Modelo de Ding (McDONALD; SUN, 1999; CHENG *et al.*, 2007; DING *et al.*, 2012).

Os modelos secundários envolvem equações que descrevem como as respostas dos modelos primários (duração da fase lag, velocidade específica de crescimento e densidade máxima de população) mudam com alterações nos fatores ambientais. Quando um grupo específico de alimentos está sendo modelado, particularmente quando a temperatura for o fator primário de interesse, como é frequentemente o caso, estas equações podem ser baseadas nas Equações de Arrhenius ou de Bélerádek (Modelo da Raiz Quadrada) (McMEEKIN *et al.*, 1993; SKINNER *et al.*, 1994).

Os modelos terciários são constituídos por programas computacionais que combinam o uso de modelos primários e secundários. Estes programas podem calcular respostas microbianas em diferentes condições, comparar o efeito destas variações ou ainda contrastar o comportamento de vários microrganismos. Estes aplicativos facilitam a modelagem das curvas de crescimento microbiano sob diferentes condições (WHITING, 1995; SCHAFFNER; LABUZA, 1997; McDONALD; SUN, 1999; McMEEKIN *et al.*, 2002; KAJAK;

KRAJEWSKA, 2006). É importante ressaltar que este recurso permite o acúmulo contínuo de conhecimento e, como consequência, pode levar ao desenvolvimento de modelos melhores e maior margem para a sua aplicação (McMEEKIN *et al.*, 2002).

2.3.3 Comparação dos modelos preditivos

A maioria dos modelos desenvolvidos foi baseada em condições estáticas de temperatura, pH e atividade água. No entanto, estas condições não são verificadas na maioria dos processos alimentares. Para tanto, modelos dinâmicos que considerem a variação destes fatores têm sido estudados e desenvolvidos com sucesso.

Para comparação de modelos preditivos, devem-se considerar sete critérios básicos:

1. Ajuste da função aos dados: Critério que estabelece a capacidade de um determinado modelo de descrever o comportamento dos microrganismos em situações reais;
2. Parcimônia: avaliação dos modelos em função do número de parâmetros de ajuste, quando dois modelos se ajustam igualmente, o que necessitar de um menor número de parâmetros será o escolhido;
3. Propriedades dos estimadores dos parâmetros: avaliação quanto à reparametrização (alterar a forma original dos parâmetros), pois o fato de um modelo se ajustar bem aos dados coletados, não garante que as propriedades estatísticas dos estimadores sejam adequadas;
4. Faixa de aplicação: é importante que o conjunto de dados ao qual o modelo está ajustado abranja toda a faixa em que o modelo se aplica;
5. Especificação estocástica: é importante que o comportamento do erro seja investigado e especificado corretamente;
6. Interpretação dos parâmetros: parâmetros interpretáveis podem simplificar o processo de ajuste de um modelo não linear;
7. Facilidade de uso: este critério deve ser levado em conta quando os anteriores falharam no fornecimento das diferenças entre os modelos comparados. Neste item, deve-se considerar a facilidade de compreender como o modelo funciona, a quantidade e a complexidade dos dados necessários para processar o modelo, bem como os softwares necessários (NAKASHIMA *et al.*, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

Nos ensaios com culturas puras, foi avaliado o crescimento da bactéria ácido láctica *Lactobacillus plantarum*, (CCT 0580 ATCC 8014), adquirida na Fundação Tropical de Culturas André Tosello (Campinas, Brasil) e estocada no laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.1.1 Preparo do inóculo de *Lactobacillus plantarum*

A reativação das culturas puras de *Lactobacillus plantarum*, para o preparo do inóculo foi reativada em caldo MRS Agar de Man, Rogosa & Sharpe (DIFCO) 30°C por 18 horas, seguido. Após este período de incubação, foi realizada a contagem da população, que ficou em 107 UFC/mL. Esta cultura foi utilizada como inóculo para o estudo do crescimento.

3.1.2 Meios de crescimento

As células de *Lactobacillus plantarum* foram cultivadas em caldo MRS Agar de Man, Rogosa & Sharpe (DIFCO). O crescimento desta bactéria ácido-láctica foi avaliado no próprio caldo MRS e também na linguiça frescal de frango.

3.1.3 Produto cárneo

A matéria-prima utilizada para a fabricação das linguiças foi obtida a partir da carne de frango (coxa, sobrecoxa, peito), adquirida de um matadouro local em Petrolina, com Serviço de Inspeção Federal, processada e analisada no laboratório de produto cárneos da escola Técnica do SENAI, Petrolina, PE.

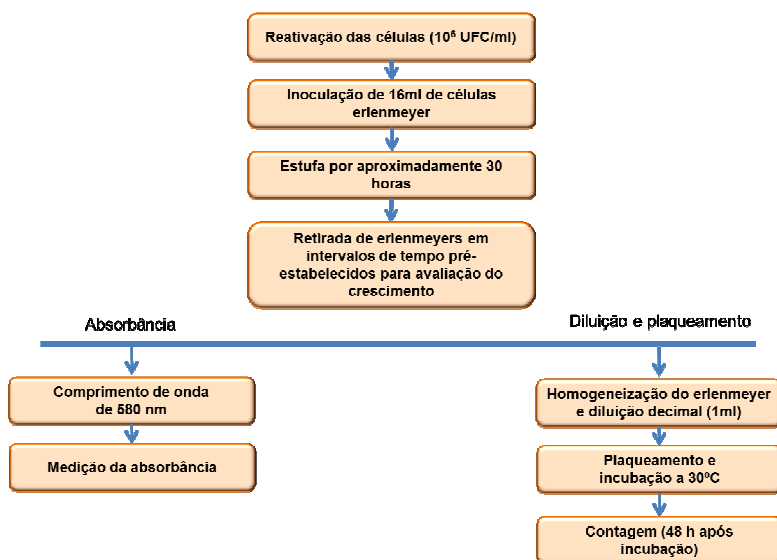
3.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *L. plantarum* EM CALDO MRS, COM A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SAIS

O crescimento da bactéria ácido láctica foi avaliado em meio MRS com diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato), em Erlenmeyers de 250 ml, contendo 160 ml de caldo, e inoculados 10% (v/v) ml de células de *L. plantarum*, foram adicionados diferentes quantidade de NaCl e lactato, de acordo com o planejamento fatorial estabelecido.

3.2.1 Medida direta do crescimento por contagem de colônias

As curvas de crescimento foram acompanhadas por aproximadamente 40 e 30 horas, até que a cultura atingisse a fase exponencial de crescimento. Após esta fase, é possível utilizar uma correlação entre a medida de absorbância e a contagem de colônias, fazendo alguns pontos de plaqueamento ao longo da curva, para confirmação da correlação.

Figura 3. Esquema da metodologia utilizada para avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas.



Em intervalos pré-estabelecidos, em Erlenmeyer contendo: caldo MRS, NaCl, lactato de sódio e células, em diferentes concentrações, a partir deste Erlenmeyer, foram realizadas diluições decimais sucessivas em tubos com tampa rosqueável contendo 9,3ml de água peptonada. As diluições a serem plaqueadas foram definidas segundo a fase de crescimento da bactéria ácido láctica. O plaqueamento foi feito por profundidade, em duplicata, com o meio Agar MRS. As placas foram incubadas em estufa a 30°C e as contagens feitas 48 h após a incubação.

3.2.2 Medida indireta do crescimento por medida de absorvância

As avaliações do crescimento por medidas de absorvância foram realizadas paralelamente à avaliação por contagem de colônias. Foi retirado 2 ml a mais de cada Erlenmeyer e colocado em um tubo de ensaio. Os mesmos 2 ml retirados foram utilizados para a avaliação do crescimento de *L. plantarum* por absorvância em espectrofotômetro (GENESYS 10vis). Para isto, o mesmo volume foi colocado em uma cubeta, e a leitura feita em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 580nm, contra um branco com água destilada.

3.2.3 Influência da concentração de sais no crescimento de *L. plantarum* (Planejamento fatorial fracionário)

O crescimento da cultura de *L. plantarum* foi avaliado em caldo Agar de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) para o estudo da influência de dois fatores: cloreto de sódio (NaCl) e lactato de sódio (Na-lactato). Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 250 ml, contendo 160 ml de caldo, e inoculados 10% (v/v) ml de células de *L. plantarum*. Os ensaios foram realizados com as células de *L. plantarum*, conforme planejamento fatorial fracionário de resolução cinco, com triplicata no ponto central. Na Tabela 1, estão apresentados os ensaios realizados com as respectivas concentrações dos fatores avaliados e seus níveis.

Tabela 1. Variáveis codificadas e variáveis reais em triplicata com ponto central para avaliação do efeito das concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato) nos parâmetros microbiológicos de crescimento.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais	
	Conc. NaCl	Conc. Lactato	Conc. NaCl	Conc. Lactato
E1	-1	-1	0,5	3,0
E2	1	-1	1,5	3,0
E3	-1	1	0,5	5,0
E4	1	1	1,5	5,0
E5	-1,41	0	0,3	4,0
E6	1,41	0	1,7	4,0
E7	0	-1,41	1	5,4
E8	0	1,41	1	4,0
E9	0	0	1	4,0
E10	0	0	1	4,0
E11	0	0	1	4,0

Na Tabela 2, estão descritos os níveis e os fatores do planejamento fatorial fracionário de resolução cinco dos ensaios realizados. Os níveis de cada fator, foram selecionados em função das concentrações adotadas pela indústria, para a linguiça frescal, considerando também a concentração máxima permitida, conforme Portaria n°1004/1998.

Tabela 2. Níveis e fatores do planejamento fatorial fracionado.

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Lactato (%)	2,5	3,0	4,0	5,0	5,5
NaCl (%)	0,25	0,5	1,0	1,5	1,75

Todos os ensaios, foram encubados em estufa, para o acompanhamento do crescimento de culturas de *L. plantarum*, mantidas à temperatura de 30°C, por um tempo de aproximadamente 48 horas. As curvas de crescimento foram acompanhadas até a fase estacionária. O efeito dos fatores envolvidos foi avaliado através dos parâmetros de crescimento microbiológico obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz modificado (item 3.3).

3.3 OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE *L. plantarum* PELO AJUSTE DO MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO

O modelo foi ajustado aos dados experimentais de log. (N/N₀) versus tempo para obtenção dos parâmetros microbiológicos de crescimento duração da fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ) e aumento logarítmico da população (A), utilizando o *Software Statistica 7.0*. Com os parâmetros obtidos, foi realizada a avaliação da influência dos fatores envolvidos no crescimento microbiano com os dados submetidos à análise de variância e estimativa dos efeitos.

O modelo de Gompertz Modificado foi ajustado às curvas de crescimento obtidas para obtenção dos parâmetros cinéticos de crescimento:

- Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) em milímetros/hora;
- Diâmetro máximo atingido pela colônia (A) assíntota superior, em milímetros;
- Duração da fase de adaptação (λ) em horas.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO MERCADO

Para comparação dos modelos foram calculados os parâmetros estatísticos: coeficiente de correlação (R^2), Erro Médio Quadrático (MSE), Fator Bias e Fator de Exatidão (SAMAPUNDO *et al.*, 2005).

O coeficiente de correlação (R^2) descreve o ajuste do modelo em toda a extensão da curva. Quanto mais próximo de 1, melhor o ajuste do modelo.

O Erro Médio Quadrático (MSE) é dado pela Equação 3.1 e apresenta o erro do modelo em relação aos dados, ou seja, o quanto os valores preditos são próximos dos valores observados. Portanto, quanto mais próximo de zero, melhor o ajuste.

$$MSE = \frac{RSS}{n} = \frac{\sum V_{(observado)} - V_{(predito)}^2}{n} \quad (3.1)$$

Sendo, valor observado o valor experimental; o valor predito pelo modelo; e n o número de dados menos os parâmetros do modelo. Para o

Fator Bias, que está apresentado na Equação 3.2, quanto mais próximo de 1, melhor o modelo.

$$\text{Bias} = 10^{\frac{\sum(v_{\text{observado}} - v_{\text{predito}})}{n}} \quad (3.2)$$

O fator bias procura dar o mesmo peso na média dos valores que sobreestimam e subestimam a média, ou seja, é um desvio relativo médio. Se bias = 1, a resposta observada é igual à resposta predita. No entanto, quando bias > 1, significa que o modelo falha na zona de perigo e o predito é maior que o observado. Quando bias < 1 significam que o modelo falha na zona segura, ou seja, o predito é menor que o observado. O fator de exatidão (eq. 3.3) é uma medida para a diferença média absoluta entre os valores preditos e observados.

$$\text{Exatidão} = 10^{2 \log(v_{\text{observado}}/v_{\text{predito}})/n} \quad (3.3)$$

Conforme aumenta o valor deste fator, o modelo é menos exato na média, ou seja, no cálculo do fator bias como se calcula uma média dos valores com os seus valores com sinais opostos, tendem a se cancelar; já no cálculo do fator de exatidão, por se tratar de valores absolutos será sempre maior que 1. Quanto maior seu valor, menor a exatidão da estimativa da média.

3.4.1 Análise estatística dos parâmetros de crescimento obtida através de modelagem matemática

Uma vez definido o modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais, os parâmetros de crescimento obtidos através da modelagem matemática foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e à estimativa dos efeitos. A análise estatística foi realizada com o auxílio do *software Statistica 7.0*.

3.4.2 Modelagem primária dos parâmetros de crescimento em função dos fatores de crescimento

Os parâmetros de crescimento (λ , μ_{max} e A) de um microrganismo, em linguiça frescal de frango, foram submetidos à modelagem primária em função dos fatores de cloreto de sódio (NaCl) e

concentração de lactato de sódio (Na-lactato). Através do modelo de Gompertz Modificado (GM) e com o auxílio do *software Excel* foi obtidas curvas e equações matemáticas que descreviam a relação entre os parâmetros e os fatores analisados.

3.5 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS EM LINGUIÇA FRESCAL

3.5.1 Elaboração das amostras de linguiças frescal de frango

Na fabricação da linguiça, a matéria-prima utilizada foi carne de frango (coxa, sobrecoxa, peito), adquirida de um matadouro frigorífico em Petrolina- PE, com inspeção federal. A matéria-prima foi submetida à moagem em disco de 8 mm. A massa cárnea resultante foi adicionada os condimentos conforme a tabela 3. Foi feita a divisão da massa ainda não embutida, em dois tipos de tratamentos: Tratamento A: linguiça de frango com adição de lactato de sódio; Tratamento B: linguiça de frango sem adição de lactato de sódio. A paramentação e higiene dos manipuladores também foram levadas em consideração visando minimizar os riscos de contaminação do produto. Os ingredientes foram misturados à massa, obtida a partir da moagem. Após a mistura de todos os ingredientes, a massa obtida foi mantida em geladeira por aproximadamente quatro horas para fixação dos condimentos. Após este período, procedeu-se ao embutimento. Este processo foi realizado em embutideira, utilizando-se tripa natural de ovino. Posteriormente ao processo de embutimento, as amostras foram embaladas a vácuo em embalagens (15cm x 20cm) com aproximadamente 500g e armazenadas em geladeira, mantendo-se refrigeradas a 4°C, durante o período de realização do experimento.

O experimento baseou-se em duas formulações, tratamento A: linguiça de frango com adição de lactato de sódio; tratamento B: linguiça de frango sem adição de lactato de sódio. As diferenças entre as formulações consistem no tipo de aditivo adicionado em cada amostra, conforme tabela 3.

Após definida a formulação as amostras começaram a ser elaboradas separadamente. Para uma melhor visualização do processo, evidencia-se na (Figura 4) o fluxograma de preparação das amostras de linguiça toscana elaboradas no Laboratório de Tecnologia de Carne da Escola Técnica Senai Petrolina.

Tabela 3. Formulação de linguças de frango A com adição de lactato e B sem adição de Lactato de sódio.

Ingredientes	Formulação A	Formulação B
Carne Vermelha	54,0%	54,0%
Carne Branca	40,0%	40,0%
Lactato	4,0%	-
Polisfostato	0,50%	0,50%
Eritorbato	0,10%	0,10%
Nacl	1,0%	1,0%
Nitrato e nitrito	0,40%	0,40%

Figura 4. Fluxograma de fabricação da linguça fresca de frango.



3.5.2 Acompanhamento da vida útil das linguças frescais

As unidades de linguça frescal com os Tratamentos A: Com adição de lactato de sódio, e tratamento B: sem adição de lactato de sódio. Todas as formulações foram embaladas a vácuo e mantidas sob refrigeração a temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

A cada três dias, uma unidade de cada formulação era retirada do armazenamento e preparadas para análise microbiológica de contagem de bactérias ácido lácticas. De cada embalagem de linguça frescal, retirou-se, de forma asséptica, 25g, que foram colocadas em saco de procedimento estéril e acrescidas de 225 ml de solução salina 0,9%. Homogeneizou-se a amostra por 60 segundos em *stomacher*, (*ITR*, modelo *1204*), realizando, na sequência, diluição e plaqueamento, seguido de incubação a 30°C por 48 horas, de acordo com Cayré *et al.*, (2003) e Giannuzzi *et al.*, (1998). Todas as análises dos produtos foram realizadas em câmara de fluxo (VECO – modelo CFL V09).

A contagem de BAL foi realizada em duplicata a cada três dias. A partir das diluições realizadas, foi inoculado 1 mL em placas de Petri e, em seguida, adicionado o meio. “*To De Man Rogosa e Sharpe*” (MRS) da marca DIFCO, previamente fundido. O meio Ágar MRS contém polisorbato, acetato, magnésio e manganês que agem como fatores de crescimento e nutriente base para as bactérias ácido lácticas (MERCK, 1996). Para distribuição uniforme do crescimento das colônias, homogeneizou-se o inóculo com o meio formando uma primeira camada e, após a solidificação, foi vertido aproximadamente mais 10 mL do mesmo meio para formar uma segunda camada, propício para o desenvolvimento destas bactérias, sendo posteriormente incubados a 30°C por 48 horas.

Após a incubação, foi realizada a seleção e a contagem das placas com crescimento entre 30 e 300 UFC. Para o cálculo do resultado final foi multiplicado o número de UFC contadas pela diluição da placa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SAIS NO CRESCIMENTO DA BACTÉRIA *L. plantarum* EM CALDO MRS

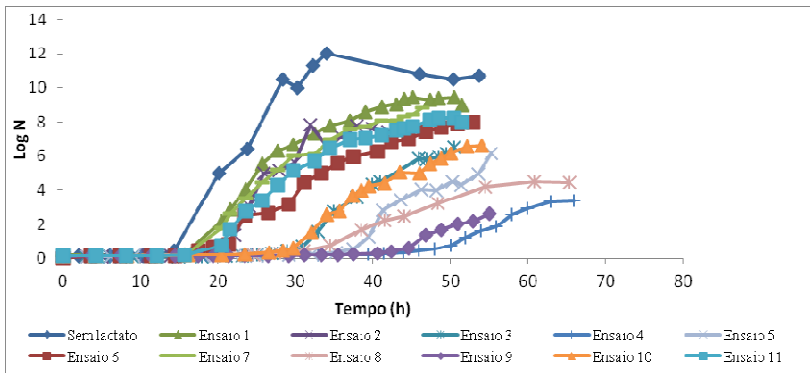
Para o estudo da influência da concentração de cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato) sobre o crescimento de bactérias lácticas, fez-se, inicialmente, o estudo destes parâmetros sobre o crescimento de *L. plantarum*, bactéria ácido láctica normalmente encontrada como deteriorante de produtos cárneos, em meio de cultura (caldo MRS -Man, Rogosa, Sharpe). Para a análise dos fatores que tiveram maior influência nos parâmetros microbiológicos de crescimento, fez-se o uso do planejamento fatorial fracionado, onde os resultados estão apresentados na forma de superfície resposta e curvas de níveis. O efeito das concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato) foi também avaliado em bactérias lácticas naturalmente presentes em linguiça de frango frescal, que foram formuladas em laboratório e os resultados do acompanhamento da vida-de-prateleira destes produtos são apresentados neste item.

4.1.1 Avaliação do crescimento de *L. plantarum* – planejamento fatorial fracionado

Foi realizada uma análise completa do crescimento de *L. plantarum* em meio de cultura (caldo MRS -Man, Rogosa, Sharpe). Avaliou-se em função de diferentes fatores cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato). Para cada ensaio, foram testadas uma concentração diferente. Foram realizadas oito ensaios e três repetições totalizando onze curvas de crescimento para cada ensaio, sendo realizadas duas a duas em datas diferentes. Para análise, foram escolhidas as duas curvas que apresentaram o maior e menor tempo de duração da fase lag e o maior μ_{max} , sendo estas de maior risco para a

indústria e para o consumidor. As curvas de crescimento resultantes do planejamento experimental descrito na Tabela 2, são apresentadas na Figura 5.

Figura 5. Avaliação do crescimento de *L. plantarum* – planejamento fatorial.



Ensaio 1: 0,5% NaCl e 3,0% Lactato, Ensaio 2: 1,5% NaCl e 3,0% Lactato, Ensaio 3: 0,5% NaCl e 5,0% Lactato, Ensaio 4: 1,5% NaCl e 5,0% Lactato, Ensaio 5: 0,3% NaCl e 4,0% Lactato, Ensaio 6: 1,7% NaCl e 4,0% Lactato, Ensaio 7: 1,0% NaCl e 2,6% Lactato, Ensaio 8: 1,0% NaCl e 5,4 Lactato, Ensaio 9: 1,0% NaCl e 4,0% Lactato, Ensaio 10: 1,0% NaCl e 4,0% Lactato, Ensaio 11: 1,0% NaCl e 4,0% Lactato.

Ao analisar a figura 5, é possível observar no ensaio quatro a concentração máxima 1,5% de NaCl e 5,0% de lactato de sódio, a curva apresentou baixa velocidade máxima de crescimento, e em geral, alta duração da fase lag. No ensaio sete com a concentração mínima de 1,0% NaCl e 2,6%, observou-se a maior velocidade máxima de crescimento, e uma baixa duração da fase lag. O acompanhamento microbiológico da linguiça frescal sem lactato de sódio, verificou-se uma rápida evolução destas bactérias. Este fator indica que as combinações destes ingredientes influenciaram efetivamente nos parâmetros de crescimento, durante o período de avaliação a duração da fase lag, com o fim da curva a partir de 50 horas, que foi o tempo máximo dos ensaios avaliados.

4.1.2 Modelagem matemática do crescimento de *L. plantarum* em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato)

O modelo de Gompertz Modificado foi ajustado aos dados experimentais de crescimento ao longo do tempo, obtidos através da medida de diâmetro da colônia de *L. plantarum* em meio MRS, para cada experimento estabelecido no planejamento experimental, conforme Tabela 1.

Os seguintes índices foram utilizados para comparação dos modelos: erro médio quadrático (MSE) e coeficiente de regressão (R^2), o primeiro indicador sobre a confiabilidade de um modelo é o R^2 , este índice mede a fração de variação sobre a média que é explicada pelo modelo. O valor mais baixo deste índice significa a melhor capacidade do modelo descrever os dados (SUTHERLAND *et al.*, 1994).

Na Tabela 4 estão apresentados os índices estatísticos para as amostras dos ensaios para diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e concentrações de lactato de sódio (Na-lactato), confirmando que ambos descreveram bem os dados experimentais avaliados. Neste trabalho foi selecionado o Modelo de Gompertz Modificado para obtenção dos parâmetros de crescimento microbiológico.

Tabela 4. Valores de índices estatísticos para avaliação de *L. plantarum*, para o modelo de Gompertz Modificado.

Ensaio	MSE	R^2
E1	0,0210	0.9951
E2	0,0609	0.9894
E3	0,0363	0.9931
E4	0,0281	0.9959
E5	0,0514	0.9895
E6	0,0184	0.9960
E7	0,0215	0.9945
E8	0,0174	0.9743
E9	0,0578	0.9872
E10	0,0396	0.9918
E11	0,0574	0.9880

MSE=erro médio quadrático R^2 =coeficiente de regressão.

Analisando a Tabela 4, pode-se concluir que os ensaios apresentou bom ajuste aos dados experimentais, uma vez que o MSE foi

próximo de 0 e o R^2 próximo de 1. De acordo com os parâmetros estatísticos, o modelo de Gompertz Modificado (GM) apresentou melhor ajuste através da análise de R^2 (dados em negrito na Tabela 4).

Na Tabela 5 observam-se os parâmetros de crescimento microbiológicos, velocidade específica máxima de crescimento, aumento logarítmico da população e duração da fase *lag*, estimados utilizando o Modelo de Gompertz Modificado, através do *Software* Statística 7.0 para ambas os ensaios realizados.

Tabela 5. Parâmetros de crescimento de *L. plantarum* obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz Modificado aos dados das curvas de crescimento obtidas no planejamento experimental.

Ensaio	Fatores		Variáveis respostas		
	Cloreto de Sódio	Lactato de Sódio	A(mm)	μ (mm/h)	λ (h)
E1	-1	-1	6.23	5.02	0.36
E2	1	-1	6.04	6.81	0.33
E3	-1	1	6.61	7.52	0.22
E4	1	1	6.65	5.97	0.21
E5	-1,41	0	6.24	4.95	0.39
E6	1,41	0	6.19	4.95	0.31
E7	0	-1,41	6.24	2.99	0.32
E8	0	1,41	5.92	4.57	0.24
E9	0	0	6.27	4.03	0.35
E10	0	0	6.31	9.08	0.23
E11	0	0	6.27	5.30	0.35

Analisando a Tabela 5, observa-se através dos valores em destaque, para o parâmetro A (diâmetro máximo atingido pela colônia), em todos os ensaios tiveram crescimento microbiano.

Para o λ , o menor valor foi observado no ensaio quatro (0.21 mm/h) sendo nas condições máxima de 1,5% de NaCl e 5,0% de Lactato, o maior valor foi para o ensaio hum (0.36 mm/h) sendo nas condições de 1,0% NaCl e 3,0% de lactato.

Os resultados da Tabela 5 foram submetidos à análise estatística com a finalidade de esclarecer quais dos fatores estudados, cloreto de sódio (NaCl) e lactato de sódio (Na-lactato), afetaram significativamente os parâmetros de crescimento de *L. plantarum* em meio MRS. Os fatores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,1$. A análise de variância e de estimativa dos efeitos foi calculada

através do *software Statistica 7.0*.

4.1.3 Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro μ_{\max} no crescimento da *L. plantarum* em meio MRS.

Na Tabela 6 estão apresentados os fatores que influenciaram nas variáveis respostas A, μ , λ , assim como, os efeitos significativos.

Os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes, lineares e quadráticos, em μ_{\max} são apresentados na Tabela 6. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,1$.

Tabela 6. Análise de variância e estimativa dos efeitos para variáveis respostas calculadas A, μ , λ .

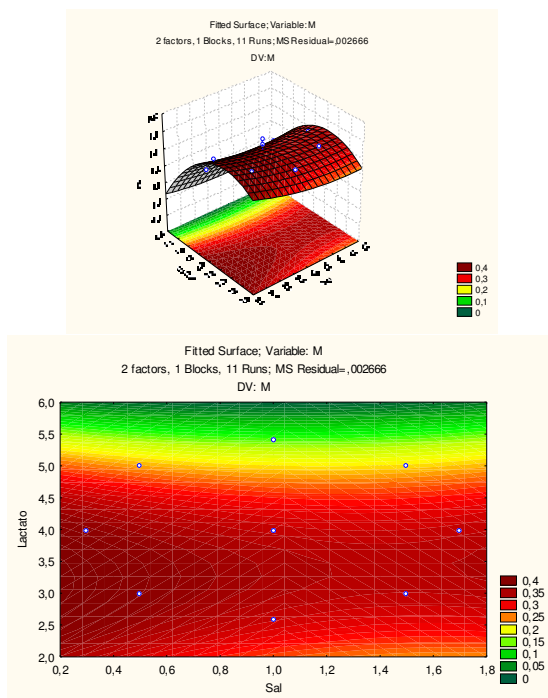
Fatores	A (mm)		μ_{\max} (mm/h)		λ (h)	
	Efeito	Valor P	Efeito	Valor p	Efeito	Valor p
NaCl (L)	-0,056	0,194	-0,034	0,388	-0,390	0,788
NaCl (Q)	0,052	0,234	0,024	0,601	-0,398	0,819
Lactato (L)	0,136	0,194	-0,131	0,015	1,431	0,348
Lactato (Q)	-0,086	0,234	-0,097	0,078	-1,592	0,381

A= aumento logarítmico da população; μ = velocidade máxima de crescimento (h); λ = duração da fase lag (h).

Observando a variável resposta μ_{\max} (velocidade específica máxima de crescimento), nota-se que o fator lactato de sódio teve efeito significativo dentro da faixa estudada.

A Tabela 6 apresenta a ANOVA com a significância dos fatores NaCl e Lactato de sódio ao nível de 90% de confiança.

Figura 6. Curva de nível e superfície de resposta das concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato), para o parâmetro de crescimento μ_{\max} para a *L. plantarum*.

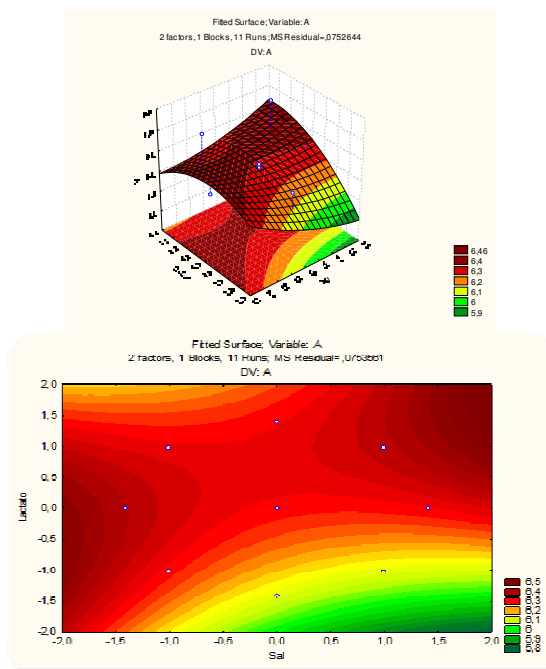


4.1.4 Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro A no crescimento da *L. plantarum* em meio MRS.

A Tabela 6 apresenta os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes, lineares e quadráticos, em A (diâmetro máximo atingido pela colônia). Os valores foram considerados estatisticamente significativos, o $p > 0,1$. Tais resultados são mais facilmente visualizados através das superfícies de resposta e curvas de nível construídas para cada uma das variáveis respondidas.

A Figura 7 mostra a curva de nível e a superfície de resposta obtida para os fatores de lactato de sódio para o parâmetro de crescimento.

Figura 7. Curva de nível e superfície de resposta das concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato), para o parâmetro de crescimento A para a *L. plantarum*.

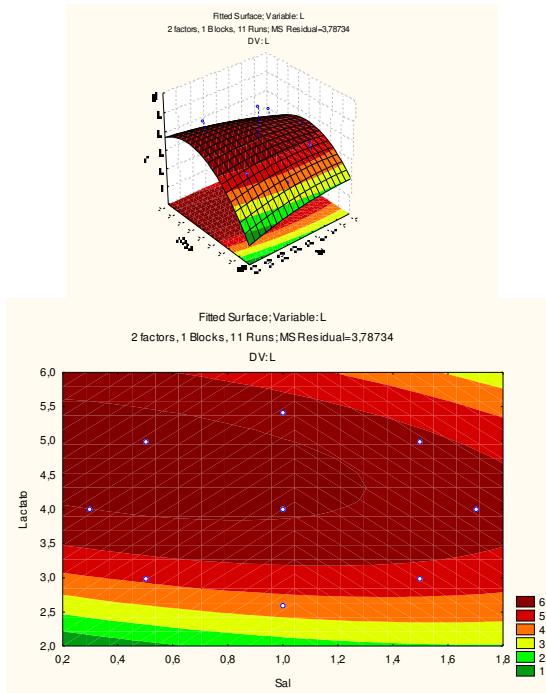


4.1.5 Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro λ no crescimento da *L. plantarum* em meio MRS

A Figura 8 apresenta a curva de nível e a superfície de resposta obtida para os fatores concentração de cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato) para o parâmetro de crescimento *L. Plantarum*.

Os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes, lineares e quadráticos, em λ são mostrados na Tabela 6. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,1$.

Figura 8. Curva de nível e superfície de resposta das concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato), para o parâmetro de crescimento λ para a *L. plantarum*.



4.2 AVALIAÇÃO DA VIDA ÚTIL DA LINGUIÇA FRESCAL DE FRANGO

A partir dos níveis selecionados para os fatores cloreto de sódio e lactato de sódio, foram produzidas as linguiças de frango com a mesma formulação proposta pela indústria, com as mesmas matérias-primas cárneas e os mesmos ingredientes usados rotineiramente, variando apenas as concentrações de lactato de sódio (Tratamento A) e sem lactato (Tratamento B), conforme tabela 2. Em seguida, as linguiças foram armazenadas à temperatura de 4°C.

4.2.1 Avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas em linguiça frescal de frango

As amostras de linguiça de frango foram coletadas para o acompanhamento do crescimento microbiano a 30°C até atingir 10^7 UFC/g alcançando o final da vida útil.

De cada embalagem de linguiça de frango, retirou-se, de forma asséptica, 25g, que foram colocadas em saco de procedimento estéril e acrescidas de 225ml de solução salina 0,9%. Homogeneizou-se a amostra por 60 segundos em *stomacher*, (ITR, modelo 1204), realizando, na sequência, diluição e plaqueamento, seguido de incubação a 30°C por 48 horas, de acordo com Cayré *et al.*, (2003), Giannuzzi *et al.*, (1998), Kotzekidou e Bloukas (1996) e Milbourne (1983).

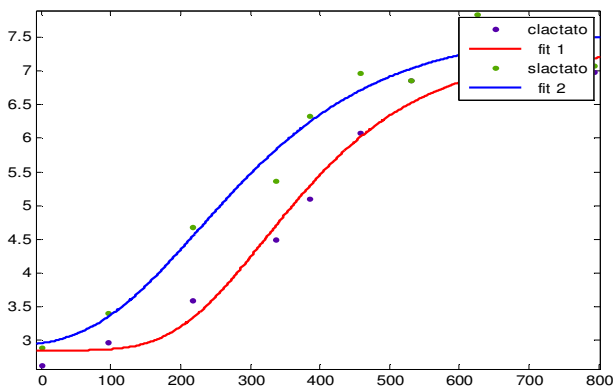
As amostras eram retiradas a cada três dias, tiveram a vida útil avaliada durante 35 dias. A partir de 16º dia para o tratamento B - Sem lactato, a contagem microbiana evoluiu rapidamente, atingindo 10^5 UFC, enquanto que, o tratamento A - com lactato só atingiu a contagem microbiana próxima de 10^7 UFC/g com 35 dias. A partir de então, nota-se na figura 9 as amostras contendo 1,0% NaCl e 4,0% de Lactato de sódio apresentaram uma inibição no crescimento microbiano, demonstrando a ação inibitória do lactato de sódio sobre os microrganismos. Conforme indicado pela indústria, a vida útil da linguiça frescal é de 15 dias armazenada a 4°C, por ser um produto frescal.

4.2.2 Modelagem matemática do crescimento de *L. plantarum* em linguiça frescal de frango com adição de lactato e sem adição de lactato em armazenamento isotérmico

Quanto menor a concentração dos sais de cura em um produto, mais rápido o crescimento microbiano, já que estes agentes retardam o desenvolvimento dos microrganismos. Este fato está comprovado na Figura 9, onde mostra que, ao reduzir o valor da concentração de sal e não adicionar o lactato de sódio, ocorre um favorecimento do crescimento, ou seja, aumenta a velocidade específica máxima.

O modelo de Gompertz Modificado foi ajustado aos dados experimentais de crescimento ao longo do tempo, obtidos através da medida de diâmetro da colônia de *L. plantarum* em linguiça frescal para cada experimento estabelecido. Exemplos dos ajustes obtidos na curva de crescimento são apresentados na Figura 9.

Figura 9. Curva de crescimento de *L. plantarum* em linguiça frescal de frango, formulada com lactato (A) e sem lactato (B). A linha contínua representa o ajuste do modelo de Gompertz Modificado aos dados experimentais.



As condições de crescimento representadas na Figura 9 mostrou que o modelo de Gompertz Modificado ajustou-se bem aos dados experimentais. Contudo, o modelo de Gompertz Modificado apresentou melhor ajuste aos dados experimentais na transição da fase lag para a fase exponencial.

O modelo de Gompertz modificado foi utilizado para a obtenção do ajuste das curvas de crescimento, do Tratamento A e Tratamento B, e os mesmos foram comparados estatisticamente, através dos índices estatísticos: coeficiente de determinação (R^2), erro médio quadrático (MSE), fator bias e fator de exatidão. Na tabela 6 estão apresentados os índices estatísticos para os dois tratamentos, armazenada a temperatura de 4°C, para avaliação do modelo de Gompertz modificado.

Tabela 7. Valores dos índices matemáticos e estatísticos para o modelo de Gompertz modificado, do Tratamento A e Tratamento B.

Índices	Formulação A	Formulação B
MSE	0,0760	0,1653
R^2	0,9844	0,9658

Analisando a Tabela 7, pode-se concluir que o tratamento A apresentou bom ajuste aos dados experimentais, uma vez que o MSE foi próximo de 0 e o R^2 ficou mais próximo de 1.

Os parâmetros microbiológicos de crescimento: A - aumento logarítmico da população, μ - velocidade específica máxima de crescimento e, λ - duração da fase lag para o crescimento de bactéria ácido láctica em linguiça frescal, obtidos pelo Modelo de Gompertz Modificado, são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros de crescimento obtidos do Modelo de Gompertz Modificado.

	Formulação A	Formulação B
μ	0.012	0.011
λ	191.7	74.60
A	4.461	4.715

A - aumento logarítmico da população, μ - velocidade específica máxima de crescimento e, λ - duração da fase lag obtidos do Modelo de Gompertz Modificado.

Observou-se que a velocidade de crescimento (μ) da formulação A foi maior que a da formulação B, este fato poderá contribuir para que a formulação A apresente melhor qualidade microbiológica até final da sua vida útil.

Com a avaliação do modelo, através das curvas preditas foram obtidas as equações do Modelo de Gompertz Modificado, para as mostras com a formulação A e a formulação B, mostradas na Figura 9. Com estas equações, que envolvem os parâmetros de crescimento é possível prever a contagem microbiana durante a vida de prateleira das amostras de linguiça de frango frescal das formulação A e B. Concluindo-se que o lactato tem uma forte influência sobre os parâmetros microbiológicos de crescimento. Entretanto, Modelo de Gompertz Modificado foi escolhido por fornecer os melhores resultados na análise estatística.

5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados mostram que o modelo desenvolvido a partir do crescimento das culturas BAL em MRS, usando medidas de absorbância, puderam prever adequadamente o crescimento de *L. plantarum* em diferentes composições.

As análises da influência das concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato) sobre o crescimento de *L. plantarum*, utilizando-se o planejamento experimental, verificou-se que o fator que mais influenciou os parâmetros microbiológicos de crescimento, nas faixas testadas, de *L. plantarum* foi a concentração de lactato de sódio. Através do acompanhamento microbiológico semanal com a contagem de bactérias lácticas, no início verificou-se pouca evolução destas bactérias, indicando que as duas formulações avaliadas (A e B), estariam em boas condições de consumo até o final da vida útil proposta pela indústria. A linguiça frescal de frango da formulação B, após 16 dias, apresentavam limosidade, exsudado leitoso e odor ácido, características de bactérias lácticas. Dos produtos avaliados, concluiu-se que a amostra A a linguiça frescal de frango com lactato de sódio apresentou qualidade superior, comparado as amostras B da linguiça frescal de frango sem lactato de sódio, portanto a utilização do lactato de sódio retarda o crescimento de microrganismos deteriorantes da linguiça frescal de frango, favorecendo o aumento da vida útil de 35 dias quando comparadas a linguiça sem adição de lactato de sódio, principalmente, em condições isotérmicas. O Modelo de Gompertz Modificado descreveu bem os dados avaliados e foi selecionado para obtenção dos parâmetros de crescimento.

REFERÊNCIAS

AMMOR, S.; *et al.* Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. Screening and characterization of the antibacterial compounds. ***Food. Control.***, v. 17, n. 6, p. 454-61, 2006.

ANASTÁCIO, A. Microbiologia preditiva alimentar: as sinergias entre a microbiologia, a matemática e as tecnologias da informação. ***Seg. Qual. Alim. [online]***, n. 7, p. 56-9, 2009. Disponível em: <http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-Sequali-07/Page%2056-59.pdf>. Acesso em: 04 out. 2012.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Mathematics of predictive food microbiology. ***Int. J. Food Microbiol. [online]***, v. 26, n. 2, p. 199-218, 1995.

BARKOCY-GALLAGHER, G. A.; *et al.* Development of methods for the recovery of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* from beef carcass sponge samples and bovine fecal and hide samples. ***J. Food Prot.***, v. 65, n. 10, p. 1527-34, 2002.

BATY, F.; DELIGNETTE-MULLER, M. L. Estimating the bacterial lag time: wich model, which precision. ***Int. J. Food Microbiol. [online]***, v. 91, n. 3, p. 261-77, 2004. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/S016816050300429X/1-s2.0-S016816050300429X-main.pdf?_tid=d577bdd2-2875-11e2-9b4a-00000aacb35d&acdnat=1352249913_8311f936051d0c147418a73e37ba f5d6. Acesso em: 01 Nov. 2012.

BEZZERA, W. I; MARTINS, T. D. D. Análise dos pontos críticos em uma unidade frigorífica de abate de suínos em Igarassu-PE. In: 3ª JORNADA NACIONAL DA AGROINDÚSTRIA. ***Anais...***, Bananeiras, Paraíba, 2008.

BORCH, E.; KANT-MUEMANSB M. L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat products and cured meat. ***Int. J. Food Microbiol. [online]***, v.

33, n. 1, p.103-20, 1996.

BORGSTRON, G. *Principles of food science*. Westport Connecticut, USA: Food T & Nutricion Press, Inc, 1976. V. 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Regulamento técnico de identidade e qualidade de linguiça*. Brasília: MS, 2000. (Aprovado pela Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000).

_____. *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)*. Brasília: MAASD, 1997. (Aprovado pelo Decreto n. 30.691, 29/03/52, alterado pelos Decretos nº 1255 de 25/06/62, 1236 de 02/09/94, 1812 de 08/02/96 e 2244 de 04/06/97).

_____. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Requerimento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *DOU*, Seção 1, 10/01/2001, p. 45, Col; 1, Brasília, 2001.

_____. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde/UHA/CGDT. *Dados epidemiológicos – DTA*: período de 2000-2011, Brasília: MS, 2012.

_____. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *DOU*, Brasília, n. 7–E, 10 jan. 2001.

BRESSAN, M. C.; PEREZ, J. R. O. *Tecnologia de carnes e pescado*. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. (Textos acadêmicos).

BREWER, M. S.; *et al.* Sodium lactate effects on shelf life, sensory and physical characteristics of fresh pork sausage. *J. Food Sci.*, v. 56, n. 5, p. 1176-8, 1991.

BUCHANAN, R. L.; WHITING, R. C.; DAMERT, W. C. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiol.*, v. 14, n. 4, p. 313-26, 1997.

CANSIAN, R. L.; FLORIANI, S. T. R.; VALDUGA, E. Microbiological analysis of critical points in the chicken industry. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 48, n. 3, p. 403-6, 2005.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 28, nº 4, p. 281-370, 2002.

CAYRÉ, M. E.; VIGNOLO, G.; GARRO, O. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsion stored at three temperatures. **Int. J. Food Microbiol. [online]**, v. 20, n. 5, p. 561-6, 2003.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Vision, mission, core values, and pledge. 2007. Disponível em: <http://www.cdc.gov/about/organization/mission.htm>. Acesso em: 12 Out 2012.

CHEVALLIER, I.; *et al.* Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. **Food Control.**, v. 17, n. 6, p. 446-53, 2006.

CHURCH, I. J.; PARSONS, A. L. Modified atmosphere packaging technology: a review. **J. Sci. Food Agric.**, v. 67, n. 2, p. 143-52, 1995.

DANNENHAUER, C. E. **Desenvolvimento de um aplicativo computacional para microbiologia preditiva**. 2010. 147f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimento) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DE WIT, J. C.; ROMBOUTS, F. M. Antimicrobial activity of sodium lactate. **Food Microbiol.**, v. 7, n. 2, p.113-20, 1990.

DEVLIEGHERE, F.; *et al.* Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. **Int. J. Food Microbiol. [online]**, v. 58, n. 1-2 , p. 93-106, 2000.

DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J. Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. **Int. J. Food Microbiol. [online]**, v. 41, n. 3, p. 231-8, 1998.

EBURNE, R. C.; PRENTICE, G. Modified atmosphere packed ready to cook and ready to eat meat products. In: MAN, C. M. D.; JONES, A. A. *Shelf life evaluation of foods*. London: Chapman & Hall, 1996. p. 156-78,

FAKRUDDIN, M.; MAZUMDER, R. M.; MANNAN, K. S. B. Predictive microbiology: modeling microbial responses in food. *Ceylon J. Sci. Biol. Sci. [online]*, v. 40, n. 2, p.121-31, 2011. Disponível em: <http://www.sljol.info/index.php/CJSBS/article/view/3928> Acesso em: 08 nov. 2012.

FAO (Food and Agriculture Organization on the United Nations). Aditivos que podem ser utilizados nos gêneros alimentícios. Directiva 95/2/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Fevereiro de 1995. Rome: FAO/WHO, 1995.

FARBER, J. M., Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology (review). *J. Food Prot.*, v. 54, n. 1 p. 58-70, 1991.

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de bactérias lácticas: caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: *Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção*. Viçosa: Célia L. L. F. Ferreira, 2003. 206 p.

_____. *Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos*. Viçosa: Ed. da UFV, 1987.

FURTADO, F. G. *Embutidos*. APROTEC tecnologia apropriada, USP, São Paulo. 2000. Disponível em: <<http://www.cecae.usp.br/Aprotec/respostas/RESP70.htm>>. Acesso em 29 Set. 2004.

GIANNUZZI, L.; PINOTTI, A.; ZARITZKY, N. Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef at different temperature. *Int. J. Food Microbiol. [online]*, v. 39, n. 1-2, p. 101-10, 1998.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Sci.*, v. 49, n. 1, p. S 139- S150, 1998.

_____ ; MONFORT, J. M. Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chem.*, v. 59, n. 4, p. 547-554, 1997.

KITAKAWA, J. H. A. *Efeito do lactato de sódio na vida de prateleira de linguiça mista frescal*. 2002. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas/SP, 2002.

KORKEALA, H.; BJÖRKROTH, K. J. Spoilage and contamination of vacuum packaged cooked sausages. *J. Food Prot.*, v. 60, n. 6, p. 724-31, 1997.

LABADIE, J. Consequences of packaging on bacterial growth: meat is an ecological niche. *Meat Sci.*, v. 52, n. 3, p. 299-305, 1999.

LABUZA, T. P.; FU, B. Growth kinetics for shelf-life prediction: theory and practice. *J. Ind. Microbiol.*, v. 12, n. 3-5, p. 309-23, 1993.

LEBERT, I.; *et al.* Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units. *Meat Sci.*, v. 76, n. 1, p. 112-22, 2007.

LEITE, M. T. *Otimização da produção do ácido láctico através da fermentação do soro de queijo por lactobacillus helveticus*. 2006. 169 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, 2006.

LEMOS, A. L. S. C.; YAMADA, E. A. *Princípios do processamento de embutidos cárneos*. Campinas: CTC/ITAL, 2002. 164p.

LUIZ, A. F.; *et al.* Monitoring of the dissemination of *Salmonella* in the chicken Frankfurt-sausage production line of a sausage factory in the state of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 5, p. 477-80, 2004.

MANCINI, R. A.; *et al.* Effects of lactate and modified atmospheric packaging on premature browning in cooked ground beef patties. *Meat Sci.*, v. 85, n. 2, p. 339-46, 2010.

MANHOSO, F. F. R. Aspectos químicos e microbiológicos das linguiças tipo frescal no Brasil. *Rev. Nac. Carne*, v. 230, p. 90-2, 1996.

MARQUES, S.; *et al.* Avaliação higiênico-sanitária de linguiças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras, MG. *Ciênc. Agrotecnicas*, v. 30, n. 6, p. 1120-3, 2006.

MASSON, Y.; *et al.*, Growth of pseudomonas fluorescens and candida sake in homogeneized mushrooms under modified atmosphere. *J. Food Eng.*, v.54, n. 2, p. 125-31, 2002.

McCLURE, P. J.; *et al.* Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach. *Int. J. Food Microbiol. [online]*, v. 23, n. 3-4, p. 265-75, 1994. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/0168160594901562/1-s2.0-0168160594901562-main.pdf?_tid=68b796f2-2886-11e2-80e3-000aab0f6c&acdnat=1352257032_270e59eb9e399d262ff697382b0d09c. Acesso em: 01 Nov. 2012.

McDONALD, K.; SUN, D. W. Predictive food microbiology for the meat industry (a review). *Int. J. Food Microbiol. [online]*, v. 52, n. 1-2, p. 1-27, 1999. Disponível em: http://smas.chemeng.ntua.gr/miram/files/publ_239_10_2_2005.pdf. Acesso em: 30 out. 2012.

McMEEKIN, T. A.; *et al.* Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerging Infect. Dis.*, v. 3, n. 4, p.541-549, 1997.

McMEEKIN, T. A.; *et al.* *Predictive microbiology*: theory and application. Tauton : Research Studies Press; New York [etc.]: J. Wiley & Sons, 1993. (Innovation in microbiology series, v. 5).

MILANI, L. I. G.; *et al.* Bioproteção de linguiça de frango. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 23, n. 2, p. 161-6, 2003.

MILBOURNE, K. Thermal tolerance of *Lactobacillus viridescens* in ham. *Meat Sci.*, v. 9, n. 2, p. 113-9, 1983.

MOROT-BIZOT, S. C.; LEROY, S.; TALON, R. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol. [online]*, v. 108, n. 2, p. 210, Apr. 2006.

MURIANA, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *J.*

Food Prot., v. 59, n. 3, p. 54-63, 1996.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRE, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: aspectos básicos da microbiologia preditiva. *Braz. J. Food Technol.*, v. 3, p.41- 51, 2000.

NEUMEYER, K.; ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Development of a predictive model to describe the effects of temperature and, water activity on the growth of spoilage pseudomonas. *Int. J. Food Microbiol. [online]*, v.1, n. 38, p. 45-54, 1997.

NYCHAS, G. J. E.; *et al.* Meat spoilage during distribution. *Meat Sci.*, v. 78, n. 1-2, p. 77-89, 2008.

PARDI, M. C.; *et al.* *Ciência, higiene e tecnologia da carne*: tecnologia da sua obtenção e transformação. Goiânia: CEGRAF-UFG; Niterói: EDUFF, 1993. v. 1.

_____. *Ciência, higiene e tecnologia da carne*: tecnologia da carne e de subprodutos - processamento tecnológico. Goiânia: CEGRAF-UFG; Niterói, RJ: EDUFF, 2000. v. 2.

PATTRON, D. An observational study of the awareness of food safety practices in Households in Trinidad. *J. Food Saf. [online]*, v. 8, n. 1, p. 14-18, 2006. Disponível em: <http://www.internetjfs.org/articles/ijfsv8-4.pdf>> Acesso em: 12 Out 2012.

PEARSON, A. M.; GILLET, T. A. *Processed meats*. New York: Chapman & Hall, 1996. 448p.

PEXARA, E. S.; METAXOPOULOS, J.; DROSINOS, E. H. Evaluation of shelf life of cured, cooked, sliced turkey fillets and cooked pork sausages - piroški - stored under vacuum and modified atmospheres at +4 and +10°C. *Meat Sci.*, v. 62, n. 1, p. 33-43, 2002.

ROBERTS, T. A. Control microbiológico de la producción de alimentos. In: ELEY, R. *Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana*. Zaragoza: Acribia, 1992. Cap. 9, p. 165-82.

RONDINI, G.; MAIFRENI, M.; MARINO, M. Use of sodium lactate at

different pH for preservation of fresh sausages. *Ingegneria Alimentare le Conserve Animali*, v. 13, n. 2, p. 9-16, 1997.

ROSS, T.; McMEEKIN, T. A. Predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol. [online]*, v. 23, p. 241-64, 1994.

SALLAM, K. I. Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. *Food Chem.*, v. 101, n. 2, 592-600, 2007.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiol.*, v. 17, n. 3, p. 329-40, 2000.

SARANTÓPOULOS, C. G. L.; *et al.* Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis. Campinas: CETEA, 2001. 213 p.

SARMENTO, C. M. P. *Modelagem do crescimento microbiano e avaliação sensorial no estudo da vida de prateleira de mortadela e linguiça defumada em armazenamento isotérmico e não isotérmico.* 2006. 146 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

SCANNELL, A. G.; *et al.* An effective lacticin bio preservative in fresh pork sausage. *J. Food Prot.*, v. 63, n. 3, p. 370-5, 2000.

SILVA, W. P.; *et al.* Listeria spp. in the processing of fresh sausages in slaughterhouses from Pelotas, RS, Brazil. *Ciênc. Rural*, v. 34, n. 3, p. 911-6, 2004.

SIMÃO, A. M. *Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico.* São Paulo: Nobel, 1985.

SKINNER, G. E.; LARKIN, J. W.; RHODEHAMEL, E. J. Mathematical modeling of microbial growth: a review. *J. Food Saf.*, v. 14, n. 3, p. 175-217, 1994.

SMITH, R. A.; GRIFFIN, D. D.; DARGATZ, D. A. The risks and prevention of contamination of beef feedlot cattle: the perspective of the United States of America. *Rev. Sci. Tech.*, v. 16, n. 2, p. 359-68, 1997.

SOUSA, C.; FARIA, C.; NEVES, E. Avaliação da temperatura de balcões e câmaras frias de armazenamento de queijos e embutidos em supermercados da cidade de Belem –PA (Brasil). *Boletim do CEPPA*. v. 21, n. 1, 2003. p. 181-92.

STAINER, R. Y.; *et al.* *General microbiology*. 5 ed., Hong Kong: Macmillan Press Ltd., 1995. p. 495-504.

TAKAHASHI, G. Ingredientes e suas funções em produtos cárneos. In: CURSO INTERNACIONAL SOBRE TECNOLOGIA DA CARNE. *Anais...* Campinas: ITAL, 1979.

UBABEF (União Brasileira de Avicultura). Disponível em: <http://www.abef.com.br>. Acesso em: 29 Mar. 2012.

UBABEF (União Brasileira de Avicultura). Protocolo de bem-estar para frangos de corte, 2008. Disponível em: <http://www.uba.org.br>. Acesso em: 05 Dez. 2011.

VAN IMPE, J. F.; *et al.* Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. *Int. J. Food Microbiol. [online]*, v. 25, n. 3, p. 227-49, 1995.

VANNUCCI, R. H. M. *Influência dos tipos de envoltórios, embalagens e temperatura de estocagem na estabilidade da mortadela*. 1999. 104f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Meat and meat products technology, chemistry and microbiology. *Meat Sci.*, v. 43, n. 1, p. 78-9, 1995.

WHITING, R. C. Microbial modelling in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 35, n. 6, p. 467-94, 1995.

_____; BUCHANAN, R. L. A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiol.* v. 10, p. 175, 1993.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. *The genera of lactic acid bacteria*. Glasgow: Chapman & Hall, 1995.

YUSTE, J.; PLA, R.; MOR-MUR, M. *Salmonella* enteritides and aerobic mesophiles in inoculated poultry sausages manufactured with high-pressure processing. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 31, n. 5, p. 374-7, 2000.

ZHOU, G. H.; XU, X. L.; LIU, Y. Preservation technologies for fresh meat (a review). *Meat Sci.*, v. 86, n. 1, p.119-28, 2010.

ZIMBER, K. Importância do uso correto dos aditivos na indústria da carne. *Rev. Nac. Carne*, ano X, n. 8, p. 15-26, Ago. 1985.

ZWIETERING, M. H.; *et al.*, Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 57, n. 4, 1094-101, 1991.

_____; *et al.* Modeling of bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 56, n. 6, p. 1875-81, 1990.