

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA:
HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO
DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

CARLOS ADAM CONTE JÚNIOR

**INFLUÊNCIA DO DIÓXIDO DE CARBONO NA VALIDADE
COMERCIAL DA CARNE DE RÃ, LINGUIÇA FRESVAL DE
FRANGO E CARNE BOVINA MOÍDA RESFRIADAS E
EMBALADAS EM ATMOSFERA MODIFICADA**

**UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE**

NITERÓI / RJ

2011

CARLOS ADAM CONTE JUNIOR

INFLUÊNCIA DO DIÓXIDO DE CARBONO NA VALIDADE COMERCIAL DA
CARNE DE RÃ, LINGUIÇA FRESCAL DE FRANGO E CARNE BOVINA
MOÍDA RESFRIADAS E EMBALADAS EM ATMOSFERA MODIFICADA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Borges Mano

Co-orientadora: Profa. Dra. Eliane Teixeira Mársico

NITERÓI / RJ
2011

C761

Conte Júnior, Carlos Adam

Influência do dióxido de carbono na validade comercial da carne de rã, lingüiça frescal de frango e carne bovina moída resfriadas e embaladas em atmosfera modificada / Carlos Adam Conte Júnior; orientador Sérgio Borges Mano. – 2011.

136f.

Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal)–Universidade Federal Fluminense, 2011.

Orientador: Sérgio Borges Mano

1. Conservação de alimento. 2. Embalagem em atmosfera modificada. 3. Prazo de validade de produtos. 4. Carne de rã. 5. Alimento embutido. 6. Carne bovina moída. I. Título.

CDD 664.028

CARLOS ADAM CONTE JUNIOR

**INFLUÊNCIA DO DIÓXIDO DE CARBONO NA VALIDADE COMERCIAL DA
CARNE DE RÃ, LINGÜIÇA FRESCAL DE FRANGO E CARNE BOVINA MOÍDA
RESFRIADAS E EMBALADAS EM ATMOSFERA MODIFICADA**

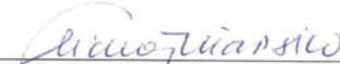
Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária da
Universidade Federal Fluminense, como
requisito parcial para obtenção do Grau de
Doutor - Área de concentração: Higiene
Veterinária e Processamento Tecnológico de
Produtos de Origem Animal

Aprovada em 01 de abril de 2011.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Sérgio Borges Mano – Orientador
Universidade Federal Fluminense – UFF



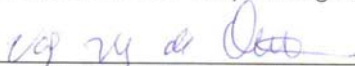
Prof.^a Dr.^a Eliane Teixeira Mársico – Co-orientadora
Universidade Federal Fluminense – UFF



Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot
Universidade Federal do Paraná – UFPR



Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA



Prof.^a Dr.^a Valéria Moura de Oliveira
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

Niterói - RJ
2011

*Dedico este trabalho aos meus
pais e à minha irmã, pelo apoio,
amor e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Sérgio Borges Mano, amigo e orientador, pelos ensinamentos e boa vontade em ensinar, pela paciência e exemplo pessoal e profissional, por todo o apoio e orientação proporcionados durante todos esses anos juntos.

A professora Dra. Eliane Teixeira Mársico, amiga e co-orientadora, por sua presença constante, pelos incentivos no cotidiano desse e de outros trabalhos, pelo apoio durante minha trajetória profissional e pelo exemplo de pessoa e profissional.

A professora Dra. Mônica Queiroz de Freitas e ao professor Dr. Sérgio Carmona de São Clemente, coordenadora e sub-coordenador do Programa de Pós-graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, pela confiança e apoio que viabilizaram essa Tese.

Ao Chefe do Departamento de Tecnologia de Alimentos, professor Henrique Silva Pardi pela atenção e confiança depositada.

À equipe do Laboratório de Controle Físico-químico de POA por participar em cada momento do meu processo de formação e a todos os alunos pelos anos que crescemos juntos.

Ao professor Dr. Robson Maia Franco pelos ensinamentos, auxílio nas realizações das análises bacteriológicas, conveniência e dedicação.

Aos demais professores, colegas, equipe administrativa e auxiliares do Programa de Pós-graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, em especial, ao apoio técnico e amizade do Sr. Drausio Paiva Ferreira.

Aos demais professores, colegas, equipe administrativa e auxiliares do Departamento de Tecnologia de Alimentos desta Faculdade.

Aos diversos alunos deste Programa, pela gentil e imprescindível colaboração em cada etapa deste trabalho.

À minha amada família, em especial aos meus pais, exemplos de vida e principais responsáveis pela minha formação pessoal e moral.

A minha irmã que alternando duras críticas e momentos felizes, e por sempre acreditar em mim.

A minha namorada e companheira Gabriella Ramalho, agradeço pela imensa paciência e carinho dedicados.

À CAPES, ao CNPq, à FAPERJ e todos os outros órgãos que fomentam o ensino e pesquisa no Estado e no Brasil, sem eles, muito pouco teríamos avançado.

Obrigado a TODAS aquelas pessoas que, de algum modo, contribuíram para minha formação e para realização deste trabalho.

“Todos nascemos livres para criar o nosso destino, embora, depois dos nossos atos, estejamos escravizados às consequências.”

Francisco Cândido Xavier

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p. 10

RESUMO, p. 11

ABSTRACT, p. 13

1 INTRODUÇÃO, p. 15

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 19

2.1 CARNE DE RÃ, p. 19

2.2 LINGÜIÇA FRESCAL DE FRANGO, p. 21

2.3 CARNE BOVINA MOÍDA, p. 24

2.4 APLICAÇÃO DA ATMOSFERA MODIFICADA EM ALIMENTOS, p. 25

2.5 GASES, p. 25

2.5.1 Dióxido de carbono, p. 25

2.5.2 Oxigênio, p. 26

2.5.3 Nitrogênio, p. 29

2.5.4 Outros gases, p.29

2.5.5 Embalagem a vácuo, p.30

3 DESENVOLVIMENTO, p. 31

3.1 INFLUENCE OF CARBON DIOXIDE CONCENTRATION FOR SHELF-LIFE EXTENSION OF BULLFROG (*Rana catesbeiana*) MEAT. Enviado para BMC Veterinary Research (Paper I), p. 31

3.2 INFLUÊNCIA DO ÁCIDO LÁTICO E DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA SOBRE A VALIDADE COMERCIAL DA LINGUIÇA FRESCAL DE FRANGO. Publicado na Revista Brasileira de Ciências Veterinárias (Paper II), p. 44

3.3 EFFECT OF MODIFIED ATMOSPHERE PACKAGING ON THE GROWTH/SURVIVAL OF *Yersinia enterocolitica* AND NATURAL FLORA ON FRESH POULTRY SAUSAGE. Publicado no Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology (Paper III), p. 69

3.4 INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DIÓXIDO DE CARBONO E OXIGÊNIO NA VALIDADE COMERCIAL DE CARNE MOÍDA BOVINA. Enviado para Pesquisa Veterinária Brasileira (Paper IV), p. 92

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS, p. 118

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 121

6 APÊNDICES, p. 127

6.1 REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIA VETERINÁRIA, p. 127

6.2 CURRENT RESEARCH, TECHNOLOGY AND EDUCATION TOPICS IN APPLIED MICROBIOLOGY AND MICROBIAL BIOTECHNOLOGY, p. 136

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Solubilidade do CO₂ a distintas temperaturas, p. 26

Figura 02: Efeito do oxigênio do ar atmosférico sobre a atividade dos microrganismos aeróbios nos alimentos, p. 27

RESUMO

A embalagem em atmosfera modificada (EAM) é uma técnica que envolve o uso de misturas de gases incluindo dióxido de carbono (CO_2), nitrogênio (N_2), oxigênio (O_2), entre outros. A EAM promove o controle de diferentes agentes responsáveis pela deterioração de alimentos, e tem sido aplicada com sucesso para diferentes matrizes alimentares. O presente estudo teve como objetivo observar e caracterizar, através de análises microbiológicas, sensoriais e físico-químicas, a influência do dióxido de carbono na validade comercial de carne de rã, linguiça frescal de frango e carne bovina moída. As amostras de coxas de rã e linguiça frescal de frango, adicionada ou não de ácido láctico, inoculada ou não com *Yersinia enterocolitica*, foram embaladas em misturas de CO_2/N_2 e carne bovina moída em misturas de CO_2/O_2 , e estocagem sob refrigeração. Durante a estocagem, amostras de cada matriz alimentar foram avaliadas através de análises microbiológicas, sensorial e físico-química. Os parâmetros de crescimento dos grupos de microrganismos estudados foram determinados mediante a equação de Baranyi. Na determinação da validade comercial, foi levado em consideração o limite da contagem de mesófilos em 10^7 UFC/g. As atmosferas contendo 80% e 100% de CO_2 estenderam efetivamente o tempo de duplicação e diminuíram a capacidade de crescimento da microbiota em carne de rã, aumentando a validade comercial 1,6 e 2,5 vezes (10 e 15 dias) em comparação ao ar atmosférico (6 dias). A EAM 80/20 CO_2/N_2 mostrou-se como método mais eficaz, sob o ponto de vista microbiológico, em termos de conservação da linguiça frescal de frango, atingindo ao final do experimento valores de 6,0; 5,3 e 5,0 Log UFC/g (bactérias mesófilas, psicrotróficas e ácido-láticas, respectivamente). Em relação ao pH, pode-se observar que a adição de 0,15% de ácido láctico provocou uma queda do pH de 5,89 para ~5,50, suficiente para acarretar uma inibição significativa da taxa de multiplicação microbiana nas diferentes atmosferas. Quanto ao comportamento de *Y. enterocolitica*, verificou-se tempo de duplicação negativo nas amostras com 100% CO_2 , 80% CO_2 e 40% CO_2 . Em relação à concentração de gases nas amostras de carne moída bovina, observou-se uma redução do percentual de oxigênio ao longo do tempo, enquanto que o de dióxido de carbono, como era de se esperar, elevou-se. Os resultados de pH, tempo de filtração e bases voláteis totais, em todas as atmosferas modificadas estudadas, foram menores que nas armazenadas em 100% ar durante o tempo de estudo. A validade comercial das amostras de carne moída embaladas em MAP apresentou um aumento de aproximadamente 2,5 vezes quando comparadas com as embalagens armazenadas em ar atmosférico. De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que, sob o ponto de vista físico-químico, sensorial e microbiológico, o dióxido de carbono mostrou ser um eficiente gás

para aumentar a validade comercial de carne de rã, linguiça frescal de frango e carne bovina moída.

Palavras chave: carne de rã, linguiça frescal de frango, carne bovina moída, atmosfera modificada, validade comercial.

ABSTRACT

Modified atmosphere packaging (MAP) is a technique that involves the use of gas mixtures including carbon dioxide (CO₂), nitrogen (N₂), oxygen (O₂), among other. MAP provides the control of many of the food spoilage agents, and has been successfully applied to different types of foods. The present work has an objective to observe and to characterize, through microbiological, sensorial and physical-chemical analyses, the influence of the dioxide carbon in shelf life of frog meat, fresh poultry sausage and ground beef. Fresh leg fillets of bullfrog and fresh poultry sausage were packaged in mixtures of CO₂/N₂, and samples of ground beef in mixtures of CO₂/O₂, 100% O₂, and kept under refrigeration. During storage, samples of each kind of food were evaluated by microbiology, sensorial and physical-chemical analyses. Bacterial growth parameters (lag phase and generation time) were assessed using Baranyi equations. In shelf life determination, it was taken 10⁷ UFC/g of mesophylic count limit. The atmospheres containing 80% and 100% CO₂ effectively extended the doubling time of the microbiota capable of growing in the storage conditions of frog legs, increasing the shelf life 1.6 and 2.5-fold (10 and 15 days) in comparison with packaging in air (6 days). In sausage, the MAP 80/20 CO₂/N₂ was the more effective method to conserve fresh poultry sausages, reaching at the end of the experiment values of 6.0; 5,3 and 5.0 Log UFC/g (mesophylic, psychophylic and acid-lactic bacteria, respectively). Analyzing the pH, it can be observed that the addition of 0.15% lactic acid caused a fall of the pH of 5.89 for ~5.50, enough to inhibit the microbial multiplication in the different atmospheres, except in 80/20 CO₂/N₂. In the inoculated samples *Y. enterocolitica* showed negative log phase in 100% CO₂, 80% CO₂, and 40% CO₂. In relation to the gas concentration in ground beef, as expected, a decrease of oxygen and an increase of carbon dioxide were observed. The results of pH, filtration time and TVB, in all studied modified atmospheres, were smaller than in 100% air stored samples. Shelf life of samples packaged in MAP presented an increase of approximately 2.5 times when compared to the ones packaged in air atmospheric. After analyzed this results, it was concluded that, in physical-chemical, sensorial and microbiologic view, MAP was an effective method to increase the shelf life of the frog meat, fresh poultry sausage and ground beef.

Key words: frog meat, fresh poultry sausage, ground beef, atmosphere modified, shelf life.

1 INTRODUÇÃO

A cada ano o consumidor exerce uma influência crescente e seletiva ao preocupar-se com questões como: segurança dos alimentos, dieta, aditivos e embalagens, sendo cada vez mais seletivo com os produtos que consome, buscando qualidade, preço e facilidades (PARRY, 1993; DAY, 1993; MANO et al., 2000).

Assim, com a mudança do ritmo de vida onde o tempo é cada vez mais valioso, associado a crescente oferta de tecnologia das indústrias de carnes e derivados e visando a sobrevivência em um mercado em franca proliferação, as indústrias têm que se adequar cada vez mais aos anseios do consumidor, que deseja encontrar já preparado no mercado varejista, não só cortes de carne, como também produtos elaborados (MALAVOTA et al., 2006; SILVA et al., 2008).

A carne moída bovina assim como a carne de rã e a lingüiça frescal de frango resfriadas são produtos perecíveis, susceptíveis ao crescimento de microrganismos, principalmente as bactérias, devido à alta atividade da água e composição química, sendo os principais fatores de deterioração da carne fresca o desenvolvimento microbiano e a rancificação da gordura (FRAZIER, 1993; PARDI, 1994; AGA, 1997; HARRIGAN, 1998; RAMOS et al., 2004; MALAVOTA et al., 2006). Sabe-se que os microrganismos descritos na carne pertencem a diversos gêneros, destacando os lactobacilos, alguns gêneros da família *Enterobacteriaceae*, entre outros. O crescimento de bactérias mesófilas é inibido de forma considerável, senão totalmente em temperatura de congelamento. Contudo, em temperatura de refrigeração, essas bactérias também apresentam capacidade de crescer. A alteração da carne ocorre quando se alcança a taxa de 10^7 UFC/cm² e se manifesta por odores

desagradáveis e limosidade superficial decorrente de ação microbiana (MANO et al., 1999).

A carne de rã, apesar de ser um produto relativamente novo em nosso país, apresenta um elevado aumento de consumo (TOMPKIN et al., 2001). Contudo, esse tipo de carne resfriada apresenta um curto prazo de validade comercial dificultando sua comercialização tanto no mercado interno como para exportação (RAMOS et al., 2004).

Por outro lado, nos últimos anos verifica-se uma acelerada alteração na forma de consumo da carne de frango no mercado nacional e internacional. Numa primeira fase, o frango inteiro perdeu espaço para o frango em partes e, posteriormente, ambos perderam mercado para os produtos de frango processados. Esse cenário mostra um processo de substituição do produto “in natura” pelo produto elaborado, ao qual é agregado valor e maior conveniência e praticidade para o consumidor (MALAVOTA et al., 2006).

A utilização da atmosfera modificada consiste na eliminação de todo ar da embalagem, substituindo-se por um gás ou mistura gasosa mudando, inicialmente, a atmosfera gasosa em torno do produto. Devido às atividades bioquímicas do produto embalado e das características de difusão dos gases através da embalagem, uma variação contínua dos gases é observada nas embalagens em atmosfera modificada (BRODY, 1996).

Acompanhando as tendências de mercado, as indústrias e pesquisadores têm despertado um grande interesse em avaliar o comportamento de diversos produtos embalados em atmosfera modificada para obtenção de resultados tecnológicos e econômicos satisfatórios (SARANTÓPOULOS, 1998; LOPES et al., 2004; SALGADO et al., 2006; MATILLA et al., 2009).

A conservação de produtos frescos, especialmente a carne embalada em atmosfera modificada (EAM) obteve significativos avanços nos últimos vinte anos. O acondicionamento de um alimento em atmosfera modificada representa uma importante forma de embalar vários produtos alimentícios, pois apresenta vantagens em termos de prolongar a vida de prateleira dos produtos (MANO et al., 2000; MALAVOTA et al., 2006).

Os gases mais utilizados em EAM são oxigênio (O_2), nitrogênio (N_2) e dióxido de carbono (CO_2) (ARASHISAR et al., 2004). O O_2 estabiliza a cor

vermelha da carne devido à manutenção da mioglobina em sua forma oxigenada (oximioglobina), sendo utilizado em embalagens com o intuito de melhorar a aparência dos produtos cárneos (GEYSEN et al., 2005) que possuem baixo teor de mioglobina, como o pescado de uma maneira geral, torna-se desnecessária a presença do oxigênio em embalagens com atmosfera modificada (PARRY, 1993).

O nitrogênio é um gás quimicamente inerte, com baixa solubilidade, tanto em meio aquoso, como lipídico. Não exerce função sobre os microrganismos, sendo utilizado em menores concentrações que o CO₂ (SOCCOL; OETTERER, 2003), para evitar o colapso da embalagem e para substituir o O₂ com o objetivo de evitar a rancidez oxidativa da carne, bem como a inibição do crescimento de microrganismos aeróbicos (KOSTAKI et al., 2009).

O CO₂ constitui o maior fator antimicrobiano da EAM, apresenta propriedades bacteriostáticas e fungistáticas, além de ser solúvel tanto em meio aquoso como lipídico. A ação do CO₂ sobre a microbiota tem sido atribuída a redução de pH, devido a dissolução do CO₂ no meio, as alterações da permeabilidade celular bacteriana e a inibição enzimática, resultando no prolongamento da fase de adaptação e no aumento do tempo de geração dos microrganismos, o que, conseqüentemente, reduz a taxa de crescimento e promove uma mudança na microbiota, levando a predominância de microrganismos de menor potencial de deterioração (SARANTÓPOULOS; SOLER, 1994).

No entanto, a escolha da mistura gasosa usada é influenciada pela microbiota capaz de crescer no produto, pela sensibilidade do alimento ao O₂ e CO₂ e pela estabilização do pigmento requerido (ROSA, 2004). Segundo PATSIAS et al. (2008), a combinação apropriada dos gases (O₂, N₂ e CO₂) no preenchimento das embalagens de alimentos resulta na inibição de microrganismos deteriorantes de alimentos perecíveis, como carne, peixe e produtos relacionados, que se desenvolvem sob condições aeróbicas, e na conservação de sua qualidade sensorial.

Em vista do apreciado, visando a melhoria das condições tecnológicas e higiênicas, e, buscando um favorecimento na logística de comercialização da carne de rã, da lingüiça frescal de frango e da carne moída de bovina, o

presente estudo teve como objetivo geral determinar a influência de diferentes concentrações de dióxido de carbono na validade comercial da carne de rã, da lingüiça frescal de frango e da carne moída bovina resfriadas e embaladas em atmosfera modificada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Em função da crescente preocupação com a sanidade dos produtos cárneos, existe uma tendência no setor de alimentos de substituição dos métodos de preservação que alteram química e fisicamente os alimentos para métodos menos severos (BRODY, 1996; SARANTÓPOULOS, 1998; MANO et al., 2000; SALGADO et al., 2006). A resposta das indústrias de alimentos tem sido investir em novas tecnologias que satisfaçam esta demanda. Por isso, tem sido dada grande atenção ao acondicionamento de alguns gêneros alimentícios em atmosfera modificada, pois atende a exigências dos consumidores por alimentos frescos e de boa qualidade, com maior validade comercial, porém sem conservantes e aditivos.

2.1 CARNE DE RÃ

A carne de rã não só é apreciada por seu sabor e textura requintada, mas também como uma fonte de proteína de alto valor biológico (VIEIRA, 1993). Considerando os aspectos nutricionais, Lindau e Noll (1988) apresentaram dados comparando a carne de rã à de outros animais, entre eles peixes, bovinos, aves e suínos e observaram que a carne de rã possui baixos teores de lipídios (0,3%), calorias (69 Kcal/100g) e sódio (81,9 mg/100g). Do ponto de vista nutricional, a carne de rã pode ser indicada para dietas visando perda de gordura corporal, visto que apresenta um teor baixo em calorias e gorduras. Estudos relativos à determinação do teor de sódio, indicaram que a carne de rã pode, em princípio, ser recomendável para dietas com restrição de sódio. A composição centesimal da carne de rã possui em média: 16,52% de proteína, 0,31% de lipídios, 83,68% de umidade, 0,89% de cinzas (LINDAU; NOLL, 1988; GONÇALVES; OTTA, 2008).

O Brasil é um país pioneiro na criação de rãs, tendo desenvolvido um sistema de ranicultura em uma região onde as rãs eram tradicionalmente explorada como caça (LIMA et al., 1999). A ranicultura nacional firmou-se como uma atividade econômica na década de 80. Desde então, vem passando por aperfeiçoamentos e, gradativamente, pode-se observar uma melhora significativa de produtividade. Atualmente, o país é considerado um dos maiores produtores mundiais, ficando atrás, apenas, da Indonésia e regiões circunvizinhas, locais onde as rãs são criadas de forma extensiva, em campos de arroz, onde não se tem o controle dos fatores de produção, que garantem a qualidade do produto final (FIPERJ, 2011). Mello et al. (2006) relatam que o Brasil é o segundo maior produtor de rãs em cativeiro do mundo, com tecnologia própria de criação e também de processamento.

Praticamente, toda a produção brasileira – cerca de 400 ton./ano – é absorvida pelo mercado interno. Contudo, de acordo com Ferreira (2011), se o País se preparar tecnologicamente, terá condições de conquistar grande espaço no mercado externo. A tendência atual do mercado internacional é a comercialização apenas da coxa da rã, cujo rendimento em relação à carcaça inteira (dorso+coxa) é de aproximadamente 55% (MELLO et al., 2006). No mercado externo, a carne de rã é normalmente comercializada como coxas frescas ou congeladas, com coxas frescas alcançando preços mais elevados do que coxas congeladas (LIMA et al., 1999; PALOV et al., 1994). Além disso, países como os Estados Unidos da América, Canadá e França realizam importação de animais vivos, devido à preferência dos consumidores por carne fresca (LIMA et al., 1999). Na verdade, muitos consumidores preferem a carne fresca, apesar de seu elevado custo e validade comercial menor (RAMOS et al., 2004).

2.2 LINGÜIÇA FRESCAL DE FRANGO

A elaboração de embutidos começou com um simples processo de salga e dessecação da carne. Tal processo se fazia para conservar a carne fresca que não podia ser consumida imediatamente. Nossos antepassados descobriram que esses produtos melhoravam com a adição de especiarias e outros condimentos. O produto se tornava mais fácil de transportar dentro do envoltório realizado com o trato intestinal de animais. Foram sendo

desenvolvidos sabores e texturas específicos, em diferentes áreas geográficas. Atualmente, muitos produtos conhecidos devem seu nome ao seu lugar de procedência. A demanda tem grande influência no desenvolvimento da indústria de embutidos na União Européia (ORDOÑEZ, 1998). A melhora nos métodos de refrigeração, embalagem e distribuição permitiram que pequenos fabricantes locais, com identidade específica, alcançassem vários países. A elaboração dos embutidos, antes tomada como uma arte, hoje é uma ciência altamente sofisticada. Surgem, a cada dia, novos conhecimentos oriundos de pesquisas realizadas nas indústrias, centros de pesquisas e universidades. Hoje, podemos citar a carne de ave como uma fonte importante de matéria prima para embutidos (CONTE-JUNIOR et al., 2010).

Nos Estados Unidos da América, a indústria de produtos de frango processados tem crescido significativamente e já representa um importante segmento do mercado da carne de frango. No entanto, em muitos países, a produção de produtos de frango processados representa somente uma pequena parte do mercado. Apesar desse fato, acredita-se que as tendências desse mercado serão de aumentar cada dia mais à medida que conveniência e variedade se tornam mais importantes para esses países. Um dos segmentos da produção de carne de frango processada é a produção de embutidos. No final da década passada, todos os grandes produtores de produtos de salsicharia já possuíam, no mínimo, um embutido de frango em sua linha de produtos embutidos (MADAVA; HOOGENKAMP, 1999).

Entende-se por embutido todo produto elaborado com carne ou órgãos comestíveis curado ou não, condimentado, cozido ou não, defumado e dessecado ou não, tendo como envoltório tripa, bexiga ou outra membrana animal. É permitido o emprego de películas artificiais no preparo de embutidos, desde que aprovadas pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 1997).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Lingüiça (BRASIL, 1999), entende-se por lingüiça o produto cárneo industrializado elaborado a partir de carnes de uma ou mais espécies de animais de açougue, obtida na forma crua ou cozida, dessecada ou não, curada ou não, adicionada ou não de gorduras, toucinho, adicionado de ingredientes e embutidos em tripas naturais ou artificiais.

Conforme o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Lingüiça (BRASIL, 2000), a classificação da lingüiça pode ser de acordo com a tecnologia de fabricação podendo ser um produto fresco, um produto seco, curado e/ou maturado, um produto cozido e um produto de semi-conserva.

A lingüiça frescal é um embutido de massa crua ou semi-crua frescal, de consumo imediato e de guarda sob refrigeração. Os embutidos crus frescais não são maturados nem dessecados sob qualquer forma e são lançados no mercado ou na mesma forma em que são produzidos ou com os gomos envoltos em material plástico sob vácuo. Os envoltórios plásticos e a conservação destes produtos sob refrigeração prolongam seu prazo de vida comercial (PARDI et al., 2001).

Na composição dos embutidos frescais estão: carnes frescas não curadas, picadas, condimentadas e geralmente embutidas em tripas. Devem ser bem cozidas antes do seu consumo (RUST, 1994). Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Lingüiça (BRASIL, 2000) o produto se constitui de ingredientes obrigatórios, que são as carnes de diferentes espécies de animais de açougue e sal, e de ingredientes opcionais como: gordura, água, proteína vegetal e/ou animal, açúcares, plasma, aromas naturais, especiarias e condimentos. É proibido o uso de carne mecanicamente separada (CMS) em lingüiças frescais (cruas e dessecadas). O uso de CMS em lingüiças cozidas fica limitado em 20%. Em relação aos envoltórios utilizados, estes podem ser naturais ou artificiais.

Embora na fabricação de produtos derivados de carne de aves, como os embutidos frescais, se utilizem inibidores do crescimento bacteriano, as intoxicações alimentares são de comum ocorrência, muitas delas em virtude do tratamento térmico insuficiente no preparo do alimento (GROSSKLAUS, 1979).

A carne vermelha crua e a carne de aves, derivadas de animais homeotérmicos, possuem uma microbiota heterogênea consistindo de bactérias mesófilas e psicotróficas autóctones da microbiota do solo e da água do meio ambiente, além de espécies bacterianas introduzidas pelo homem e equipamentos durante o processamento. Diversos fatores físico-químicos influenciam nos tipos de degradação microbiana que ocorrem na carne de aves e seus produtos derivados. Esses fatores incluem o pH da carne, a adição de sal, nitrito, açúcar etc. Após o processamento, o tipo e a velocidade de

degradação também são influenciados pelo tipo de empacotamento, temperatura de estocagem, composição final do produto e sobrevivência dos microrganismos contaminantes. Esses princípios básicos são aplicados tanto para a carne vermelha e produtos como para a carne de aves e produtos derivados (JOHNSTON; TOMPKIN, 1992).

A contaminação bacteriana inicial em carne de frango crua consiste basicamente de microbiota mesófila onde se incluem: *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Campylobacter* e *Salmonella*. Contagens iniciais encontram-se em torno de 10^1 a 10^4 bactérias/cm². A microbiota, eventualmente predominante durante refrigeração aeróbia, consiste de bactérias psicrófilas Gram negativas dos grupos: *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*. Dados colhidos pelo serviço de inspeção federal americano em amostras de carne de frango crua moída relatam a presença de *C. perfringens* 50,6%, *S. aureus* 90%, *L. monocytogenes* 41,1%, *C. jejuni/coli* 59,8%, e *Salmonella* 44,6% (TOMPKIN et al., 2001).

Segundo o mesmo autor, a presença de patógenos em carne de frango crua continua a ser uma preocupação em saúde pública. O real significado da carne bovina, suína e de frango como veículos na transmissão de enfermidade transmitida por alimento com *C. jejuni/coli*, *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Arcobacter* e *E. coli* enteropatogênica continua a ser investigado.

2.3 CARNE BOVINA MOÍDA

O sistema de comercialização e distribuição de carne bovina no Brasil passa por importantes transformações às quais vêm alterando principalmente a estrutura de toda a cadeia produtiva e a conduta de seus agentes. Estudos realizados por Bliska (1997), demonstraram que essas transformações, vêm se consolidando desde da década passada se baseando na crescente demanda de carne embalada e desossada, oferecida para o consumidor através do sistema de auto serviço nas gôndolas de supermercados.

A carne é inicialmente uma “substância estéril” mas, quando cortada, as superfícies expostas em contato com o ar ambiente, são um ótimo local de crescimento para a maioria das bactérias e, obviamente a carne quando picada

fica ainda mais exposta. Por isso, a higiene é um fator de vital importância nas etapas de pré-processamento e embalagem para minimizar a introdução de microrganismos no produto (AGA, 1997; RÖNNER, 1997; KASNOWSKI et al., 2008).

A carne bovina é um alimento que devido a fatores intrínsecos como pH, atividade de água e sua composição centesimal favorece o desenvolvimento de microrganismos. Segundo Franco (1992), a composição centesimal do filé bovino cru rico em proteína, lipídios, glicídios e minerais oferece .

Conforme alguns autores (FRAZIER, 1993; HARRIGAN, 1998), são muitos os gêneros de microrganismos que podem ser encontrados na carne, principalmente as bactérias Gram-negativas e psicotróficas, destacando-se os lactobacilos, alguns gêneros da família Enterobacteriaceae, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* entre outros. O crescimento de bactérias mesófilas é inibido de forma considerável, senão em temperatura de refrigeração. Quando a carne é mantida acima de 20° C as bactérias mesófilas estão em condições ideais de temperatura para se multiplicar, já em baixas temperaturas os psicotróficos, que são microrganismos capazes de crescer entre 0 e 7° C e produzir colônias visíveis em um período de 7 a 10 dias, se tornam um grupo de maior importância na avaliação da conservação da carne (JAY, 1994). A alteração da carne ocorre quando se alcança a taxa de 10⁷ UFC/ cm² (unidades formadoras de colônias por centímetro quadrado) e se manifesta por odores desagradáveis. Quando atinge uma taxa de aproximadamente 10⁸ UFC/ cm² apresenta concomitantemente uma limosidade superficial decorrente de ação microbiana e enzimática (DAINTY, 1986; LAMBERT 1991).

2.4 APLICAÇÃO DA ATMOSFERA MODIFICADA EM ALIMENTOS

A aplicação de gases para preservação de carnes resfriadas é uma idéia antiga. No final do século XIX já se sabia que o gás carbônico poderia preservar a qualidade de carnes vermelhas. Na década de 30 era comum o transporte marítimo de carnes bovinas e ovinas sob atmosferas contendo gás carbônico, onde era observada a velocidade do crescimento microbiano e que o gás ampliava a validade comercial do produto (DIXON, 1989; BRODY, 1996).

De acordo com Sarantópoulos, (1995), a substituição do ar atmosférico ao redor do produto por uma mistura otimizada de CO₂, N₂ e O₂ pode propiciar um aumento de validade comercial, pois a degradação de alimentos devido à oxidação, crescimento de fungos, bactérias e enzimas pode ser retardada.

2.5 GASES

A eleição das misturas de gases empregados em um produto fundamenta-se nas características físicas, bioquímicas e microbiológicas do alimento; englobando principalmente a microbiota capaz de crescer, a sensibilidade do produto aos gases e a necessidade da estabilização das características sensoriais.

2.5.1 Dióxido de carbono (CO₂)

Apesar do dióxido de carbono estar presente na atmosfera em níveis baixos ($\cong 0,03\%$), ele é fácil de produzir através da combustão (MANSUR, 1997).

O gás carbônico é um gás incolor, altamente solúvel em água e lipídeos, desta forma, a embalagem flexível tende a colapsar sobre o alimento à medida que o CO₂ é absorvido pelo alimento. Numa concentração superior a 10% de atmosfera é o gás mais importante relacionado à tecnologia de preservação em embalagens com atmosfera modificada devido seu efeito bacteriostático e fungistático sobre muitos tipos de microrganismos, agindo como conservadores de alimentos (MANO, 1997).

O CO₂ inibe a multiplicação de bactérias deteriorantes Gram-negativas e aumenta a fase lag proporcionalmente ao aumento da concentração da taxa de CO₂ que influenciam a perda de cor e o surgimento de odores desagradáveis em carnes, entretanto, não retarda o crescimento de todos microrganismos, sendo os microrganismos Gram positivos mais resistentes. Por exemplo, o crescimento de bactérias ácido lácticas é favorecido na presença de CO₂ acompanhado de baixos níveis de O₂ (DIXON, 1989; PARRY, 1993; CHURCH, 1995). O efeito inibidor do CO₂ aumenta em baixas temperaturas devido ao aumento de sua solubilidade (Figura 1).

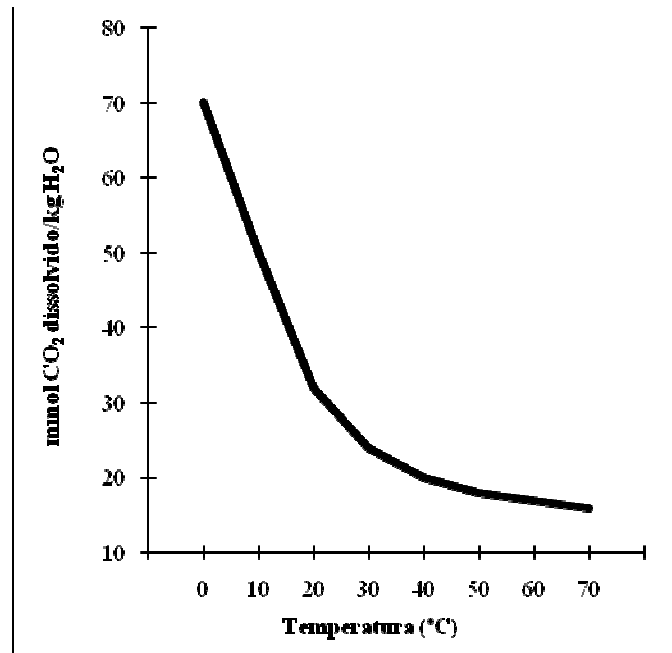


Figura 1: Solubilidade do CO₂ a distintas temperaturas (RÖNNER, 1994).

PARRY (1993) cita também, que a absorção do dióxido de carbono pelo produto depende do percentual de lipídeos e umidade que é alta em carnes resfriadas, influenciando o colapso de embalagens que ocorre quando não possuem outros tipos de gases associados.

2.5.2 Oxigênio (O₂)

De acordo com PARRY (1993), a deterioração dos alimentos pode ser devido a fatores físicos, químicos e microbiológicos. Provavelmente o oxigênio é o gás mais importante neste contexto, pois é utilizado tanto pelos microrganismos aeróbios que provocam alterações (Figura 2), como participam várias reações bioquímicas nos alimentos, incluindo oxidação de lipídios e compostos sensíveis como vitaminas e substâncias aromáticas.

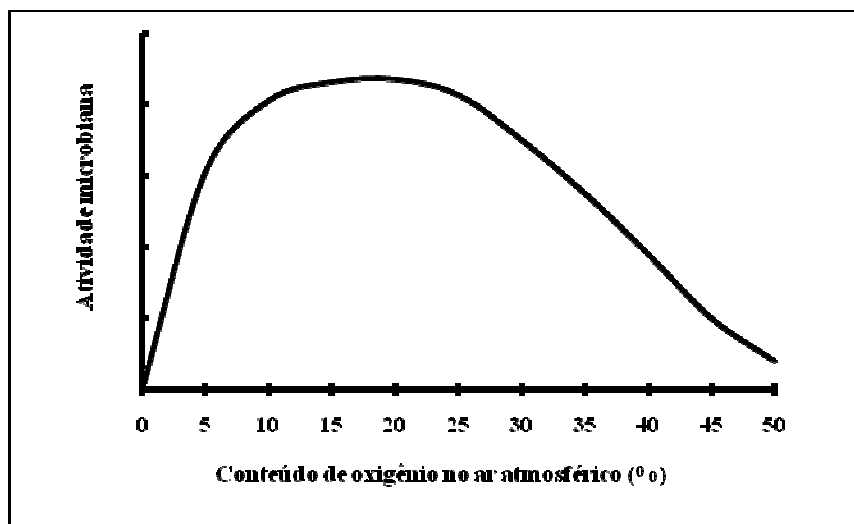


Figura 2: Efeito do oxigênio do ar atmosférico sobre a atividade dos microrganismos aeróbios nos alimentos.

O O_2 é usado comercialmente em atmosfera modificada principalmente para a embalagem de carne vermelha, embora tenha sido recomendado para o acondicionamento de certos peixes como o atum (LÓPEZ-GÁLVEZ et al., 1995; GUEDES et al, 2006), que contêm quantidades significativas de mioglobina. Um ambiente típico é composto por 80% de O_2 e 20% de CO_2 . Nestas condições, quando a temperatura de armazenamento não exceder $4^\circ C$, a validade comercial pode ser entre 7 e 16 dias, ou até mais, mantendo a cor vermelha brilhante que é interpretado como um sinal de frescor (ORDÓÑEZ; LEDWARD, 1977; ASENSIO et al, 1988; HASTINGS, 1993).

O oxigênio compõe o ar atmosférico em um percentual aproximado de 16%. A maioria das reações com alimentos envolvendo o oxigênio são reações de degradação resultando da quebra oxidativa dos alimentos em suas partes constituintes. O oxigênio combina rapidamente com gorduras e óleos causando rancidez e muitos microrganismos formadores de esporos requerem o oxigênio para seu metabolismo, o que causa odores indesejados (MANSUR, 1997).

A cor vermelha da carne é devido, sobretudo, à apresentação da mioglobina, variando a quantidade nos animais de acordo com a espécie, a idade, o sexo, o músculo e sua atividade física. O grupo heme da mioglobina é o verdadeiro responsável pela cor vermelha quando combinado com o oxigênio, requerendo a participação da globina para fixar o oxigênio. A mioglobina quando associada ao oxigênio forma a cor vermelho brilhante

denominada oximioglobina que é a coloração desejada pelos consumidores em carne fresca. A coloração com baixa quantidade de oxigênio transforma o pigmento em amarronzado, a qual a maioria dos consumidores associa a baixa qualidade (PARDI, 1994).

A deterioração microbiológica e a oxidação de gorduras da carne moída podem ser minimizadas com a utilização de embalagem a vácuo, contudo, a embalagem a vácuo acarreta uma coloração vermelho púrpura na carne (mioglobina reduzida) e um aspecto pouco atrativo no formato final da embalagem o que não é valorizado pelo mercado consumidor, sendo a validade comercial do produto resfriado e embalado a vácuo armazenado a uma temperatura de 8°C de no máximo 3 dias, depois de aberto (SOBREIRO; SOUZA, 1996).

Carnes vermelhas como os fatiados precisam de atenção especial no que diz respeito à mudança de cores devido à oxidação do pigmento mioglobina. Por isso, a atmosfera para carnes frescas contém altas concentrações de oxigênio, a fim de manter a coloração vermelha viva garantindo altos níveis de oxigênio na mioglobina da carne. Assim, carnes altamente pigmentadas necessitam de concentrações mais altas de oxigênio do que as carnes com menos pigmentação, como a de suínos e de aves (RÖNNER, 1997).

Segundo PARRY (1993), a aplicação de oxigênio em altos níveis deve se restringir a produtos não curados devido à oxidação dos lipídeos. A carne resfriada deve receber níveis superiores a 40% de atmosfera de oxigênio, para formar a oximioglobina que apresenta uma coloração agradável aos olhos do consumidor, evitando o uso de aditivos naturais ou artificiais com essa finalidade. O nível de oxigênio pode diminuir numa embalagem como resultado do metabolismo da carne e dos microrganismos, como pela difusão gasosa.

Assim, para a combinação dos efeitos desejáveis da coloração vermelho vivo da carne bovina com a inibição microbiana utiliza-se o acondicionamento da carne moída em embalagens com atmosfera modificada para que o desenvolvimento microbiano seja retardado pela ação do gás carbônico (SARANTÓPOULOS, 1998; RÖNNER, 1997).

2.5.3 Nitrogênio (N₂)

A principal função do nitrogênio na mistura gasosa utilizada é agir como gás inerte, preenchendo a embalagem e prevenindo o colapso da mesma quando o CO₂ dissolve-se na carne. O nitrogênio não tem propriedade antibacteriana e não afeta a coloração das carnes (LAMBERT et al., 1991).

O N₂ é um gás inerte, inodoro, insípido e com baixa solubilidade em água e gordura. É utilizado para substituir o O₂ em embalagens, para retardar o ranço oxidativo e inibir o crescimento de microrganismos aeróbios (CHURCH, 1994).

2.5.4 Outros gases

O monóxido de carbono (CO) é um gás incolor, inodoro e insípido. Trata-se de um gás muito tóxico, sendo capaz de inibir o escurecimento e o crescimento microbiano. Em concentrações em torno de 1% é capaz de inibir o crescimento de muitas bactérias, mofo e leveduras. Também é capaz de retardar o escurecimento oxidativo de frutas e vegetais quando combinado com baixas concentrações de O₂ (2-5%). Devido à sua toxicidade e à sua característica inflamável a 12,5-74,2% no ar, o gás CO deve ser manuseado cuidadosamente utilizando-se devidas precauções (ZAGORY, 1997).

O dióxido de enxofre (SO₂) também pode ser utilizado nas embalagens em atmosfera modificada. Este gás tem sido utilizado para controlar o crescimento de fungos e bactérias em alguns tipos de frutas, em particular uvas e frutas secas. Também pode ser utilizado para controlar o desenvolvimento bacteriano em sucos de fruta, vinhos, camarões, conservas e em alguns tipos de lingüiça. O dióxido de enxofre é bastante reativo em soluções aquosas formando sulfitos capazes de inibir bactérias em meio ácido (pH<4). No entanto, uma minoria de pessoas pode desenvolver reação de hipersensibilidade aos sulfitos presentes em alimentos, sendo assim, nos últimos anos, seu uso tem sido regulado pelas autoridades sanitárias (ZAGORY, 1997).

2.5.5 Embalagem a vácuo

A embalagem a vácuo é o método mais utilizado pelas indústrias para conservação e estocagem da carne. Consiste na retirada do ar em sua

totalidade da embalagem onde o produto encontra-se acondicionado com um filme com baixa taxa de permeabilidade ao oxigênio. Os dois maiores agentes deteriorantes que são as bactérias aeróbicas e as reações de oxidação requerem o oxigênio. O atraso dessas duas formas primárias de deterioração através da embalagem a vácuo pode aumentar significativamente a validade comercial do produto (CHURCH, 1995; MANSUR, 1997).

No entanto, como o pigmento da carne se apresenta vermelho púrpura, pela dexoxigenação da mioglobina, restringiu-se o consumo da carne embalada a vácuo pelos consumidores, que associam a coloração vermelho brilhante aos frescor do produto. Outra desvantagem desse tipo de embalagem é a apresentação do corte que perde suas características na apresentação e o acúmulo e exudato (LAMBERT, 1991).

3 DESENVOLIMENTO

3.1 INFLUENCE OF CARBON DIOXIDE CONCENTRATION FOR SHELF-LIFE EXTENSION OF BULLFROG (*Rana catesbeiana*) MEAT. Enviado para BMC Veterinary Research (Paper I).

Influence of carbon dioxide concentration for shelf-life extension of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) meat

Carlos A Conte Junior^{1,2§}, Eliane T Mársico¹, Henrique S Pardi¹, Manuela Fernández², Sérgio B Mano¹

¹Department of Food Technology, Faculty of Veterinary Science, Fluminense Federal University, Vital Brazil Filho, 64, CEP: 24230-340, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil.

² Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

[§]Corresponding author

Email addresses:

CACJ: conte@vet.ucm.es

ETM: elianee@vm.uff.br

HSP: mtahsp@vm.uff.br

MF: manuela@vet.ucm.es

SBM: mtasbm@vm.uff.br

Abstract

Background

Modified atmosphere packaging (MAP) is a technique that involves the use of gas mixtures including carbon dioxide (CO₂), nitrogen (N₂), oxygen (O₂) and argon (Ar) in different concentrations. MAP provides the control of many of the food spoilage agents, and has been successfully applied to different types of foods.

Results

The atmospheres containing 80% and 100% CO₂ effectively extended the doubling time of the microbiota capable of growing in the storage conditions of frog legs, increasing the shelf life 1.6 and 2.5-fold (10 and 15 days) in comparison with packaging in air (6 days). CO₂ concentrations lower than 80% do not appear effective for MAP of frog meat, since they did not show any inhibitory effect on the natural microbiota.

Conclusions

In microbiologic view, MAP with high CO₂ concentration was the best conservation method. Although other parameters should also be considered when evaluate the commercial life of the frog meat.

Background

Frog meat is not only appreciated for its exquisite flavor and texture but also as a source of protein of high biological value [1]. Brazil is a pioneer country in frog rearing, having developed and disseminated a frog farming system in a region where frogs were traditionally obtained by hunting [2]. In the international market, frog meat is usually commercialized as fresh or frozen legs with the fresh legs reaching higher prices than the frozen pieces [2, 3]. Furthermore, countries such as the United States, Canada and France import live animals, due to consumer preference for fresh meat [2]. In fact, many consumers prefer fresh meat despite its higher cost and lower shelf life [4].

Modified atmosphere packaging (MAP) technology provides a method of offering consumers fresh products with longer shelf life [5, 6]. This technology can be used by the food industry as an efficient tool to launch new products, providing convenience and practicability to consumers [7, 8]. At the present time, the food sector demands less severe technologies that can replace preservation methods, which can alter food chemically and physically. This is the case of MAP technology [9,10].

The aim of the present study was to evaluate the growth/survival of the aerobic mesophilic population in leg fillets of bullfrog (*Rana catesbeiana*) packaged in MAP with different concentrations of CO₂ (20/80 CO₂/N₂, 40/60 CO₂/N₂, 80/20 CO₂/N₂ and 100% CO₂), 100% N₂ and 100% air, by assessing the conditions and velocity of growth of those microorganisms in MAP environment and in aerobiosis, at 5±1°C.

Methods

Sample preparation and modified atmosphere packaging

Fresh leg fillets of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) (supplied by a local slaughtering house in Rio de Janeiro) were used in this study. Seventy samples of approximately 70g were packaged in multilayer high barrier plastic bags ('Cryovac' BB4L) filled with approximately 1L of the following atmospheres: 100% air, 100% CO₂, 100% N₂ and three mixtures of CO₂/N₂ (20/80, 40/60 and 80/20). The atmospheres containing 100% air and 100% N₂ were used as controls. Once filled, the bags were immediately sealed and kept under refrigeration at 5±1°C, during 17 days.

Microbiological analysis

Samples were analyzed for periodic counts of aerobic mesophiles and pH. A homogenate of 25g of frog meat was prepared in 225mL of a sterile physiological saline solution (0.85% NaCl). This homogenate was used for the microbiological analyses and

to measure pH; this parameter was measured with a 'Horiba` mod M-13 automatic pH meter.

The growth of aerobic mesophiles was observed during 17 consecutive days. Counts were determined by the pour plate technique [11], in Plate Count Agar (PCA) (Merck), incubated at 35°C for 48h. Microbial analyses were performed in duplicate using two slices from different bags.

Bacterial growth parameters (lag phase and doubling time) were assessed using the Baranyi and Roberts's equation [12] and the shelf life of meat was defined as the number of days needed to reach 10^7 cfu g⁻¹.

Results and Discussion

pH changes

The changes in the pH of the samples are reported in Figure 1. The leg fillets presented an initial pH of 6.38, which showed an initial decrease in all the samples to 5.8-6.1 at day 2.

In the samples packaged in air, the pH stabilized around 5.8 until day 12, when a remarkable increase was observed, coinciding with microbial counts above 10^7 cfu g⁻¹, and, therefore, spoilage. This increase may be attributed to the accumulation of basic compounds derived from the growth of *Pseudomonas* spp. and related microorganisms [13].

In the CO₂ enriched atmospheres, pH remained stable throughout the experience in values ranging from 5.5 to 6.1. Some authors have reported decreases in the pH of meat packaged with CO₂ as a consequence of the solubility of this gas in the food [14, 15], while other studies have shown no modifications in these values due to the effect of CO₂ [16-20].

Natural microbiota

The initial counts were low (10^4 cfu g⁻¹) (Figure 2), which reflects that the samples were obtained in good hygienic conditions, much better than the ones usually found in the slaughtering houses.

Counts remained below 10^6 cfu g⁻¹ and 10^5 cfu g⁻¹ until days 8 and 12 in the samples packaged in 80% and 100% CO₂, respectively, while by day 6, the other atmospheres studied showed counts ranging from 5×10^6 – 5×10^8 cfu g⁻¹.

In the present work, the lag phase was calculated by the Baranyi and Roberts's equation. This parameter indicates the time needed for a microbial population to start to grow actively. Unfortunately, the lag phase is not constant, even in model systems, since it does not only depend on the species, but also on the origin of the microorganism or microbial group [21]. On the contrary, the doubling time is always constant in the same conditions (strain, substrate, temperature, atmosphere, etc).

In this study, as expected, the total microbiota needed more time to grow in the most selective atmospheres (Table 1), although noticeable differences were found among the CO₂ enriched atmospheres. The longest lag phase (8.6 days) was observed in the atmosphere containing 100% CO₂. The samples packaged in 80% and 100% CO₂ showed doubling times of 23.1 and 17.6 hours respectively, much higher than the doubling time observed in the atmospheres containing 20% and 40% CO₂, which was approximately 8 hours. The differences observed among the atmosphere containing CO₂, and also with the samples packaged in air, might be explained by the different dominant microbiota growing in each environment. As the purpose of this study was an initial approach to the shelf-life of frog meat packaged in MAP, no selective counts (lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae, psychrotrophic bacteria, etc) were performed, although these studies are further needed to develop the most adequate MAP system for frog meat.

Finally, as it can be seen in Table 1, the values reached by the total microbiota during the lag phase were 0.7-1.1 logarithmic units lower in the CO₂ enriched atmospheres, in comparison with the samples packaged in air, which confirmed the selective effect of CO₂ on microbial growth, especially when 100% was used.

Shelf life

As reported in Table 1, packaging in 80% and 100% CO₂ significantly increased the shelf life of frog meat (1.6 and 2.5-fold, respectively). In these samples, counts of 10⁷ cfu g⁻¹ were reached in approximately 10 days with 80% CO₂, and 15 days in 100% CO₂ (Figure 2). No favourable effect of the atmospheres containing a lower concentration of CO₂ and the one containing 100% N₂ was observed (Table 1, Figure 2). These results could be explained by the presence among the natural microbiota of frog meat of low numbers of psychrotrophic bacteria tolerant to medium levels of CO₂. These bacteria would have grown and caused spoilage in a short period of time in those samples stored in 20% and 40 % CO₂, but they could have been inhibited by higher CO₂ concentrations.

The resulting shelf life of 10-15 days when packaging frog meat in 80% and 100% CO₂ atmospheres is solely based on a microbiological point of view. However, for establishing shelf life, the sensory properties of the product must also be taken into account. In our study a change in the colour (slightly paler than the normal colour) of the samples was noticed at day 10 in the 80/20 CO₂/N₂ atmosphere and at day 15 in the 100% CO₂ atmosphere, while odour did not significantly change.

Conclusions

In view of our results, it can be concluded that the atmospheres containing 80% and 100% CO₂ appear to be effective for extending the shelf life of frog meat stored under refrigeration. These atmospheres controlled the growth of aerobic mesophiles which, in

those conditions, showed a low growth rate and moderate counts, although other coexisting factors may also have influence in these parameters. In contrast, packaging in 20% and in 40% CO₂ did not appear to be useful for MAP of frog meat. Moreover, these atmospheres even enhanced the growth of the natural microbiota capable to grow in these conditions. Further research is still necessary for the development of MAP of different animal origin products, such as frog meat (i.e. selective counting of individual/groups of microorganisms) [22]. It is likely that the effectiveness of the technique shall be optimized so that ideal concentrations of gases in MAP can be established for this product.

Authors' contributions

CACJ carried out the microbiological analysis and drafted the manuscript. ETM participated in the design of the study and performed the statistical analysis. HSP conceived of the study and participated in its design and coordination. MF participated in the microbiological analysis and helped to draft the manuscript. SBM conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)', Brazil. The authors thank David Bailey for his careful and critical reading of the manuscript.

References

1. Vieira MI: *Ra-touro gigante: características e reprodução*. Sao Paulo, Infotec Press 1993
2. Lima SL, Cruz TA, Moura ON: *Ranicultura: análise da cadeia produtiva*. Viçosa, Folha de Viçosa Press 1999

3. Palov A, Garcia de Fernando GD, Ordoñez JA, Hoz L: **β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH) activity of unfrozen and frozen-thawed frog (*Rana esculenta*) legs.** *J Sci Food Agric* 1994, **64**:141-143
4. Ramos EM, Gomide LAM, Ramos ALS, Peternelli LA: **Effect of stunning methods on the differentiation of frozen-thawed bullfrog meat based on the assay of β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase.** *Food Chem* 2004, **87**:607-611
5. Conte Junior CA, Macedo BT, Lopes MM, Franco RM, Freitas MQ, Fernández M, Mano SB: **Effect of modified atmosphere packaging on the growth/survival of *Yersinia enterocolitica* and natural flora on fresh poultry sausage.** In: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Edited by Méndez Vilas A. Badajoz, Formatex Books 2010, 1217-1223
6. Mano SB, García de Fernando, GD, López Gálvez D, Selgas, MD, García, ML, Cambero MI, Ordoñez JA: **Growth/survival of natural flora and *Listeria monocytogenes* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged under modified atmosphere.** *J Food Safety* 1995, **15**:305-319
7. Garcia de Fernando GD, Nychas GJE, Peck MW, Ordoñez JA: **Growth/survival of psychrotrophic pathogens on meat packaged under modified atmospheres.** *Int J Food Microbiol* 1995, **28**:221-231
8. Brody AL, Marsh KS: *The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology*. New York, Wiley Interscience Press 1997
9. Sarantópoulos CIGL, Alves RMV, Contreras CJC, Galvão MTEL, Gomes TC: **Use of a modified atmosphere masterpack for extending the shelf life of chicken cuts.** *Packag Technol Sci* 1998, **11**:217-229

10. Mano SB, Ordóñez JA, Garcia de Fernando GD: **Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres.** *Food Microbiol* 2000, **17**:657-669
11. Vanderzant C, Splittstoesser DF: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods.* Washington, American Public Health Association Press 1992
12. Baranyi J, Roberts TA: **A dynamic to predicting bacterial growth in food.** *Int J Food Microbiol* 1994, **23**:277-294
13. Mano SB, Ordóñez JA, Garcia de Fernando GD: **Aumento de la vida útil y microbiología de la carne de pavo envasada en atmósferas modificadas.** *Revista Brasileira de Ciência Veterinária* 1999, **6**:55-65
14. Daniels JA, Krishnamurthi R, Rizvi SSH: **A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality.** *J Food Prot* 1985, **48**:532-537
15. McMullen LM, Stiles ME: **Changes in microbial parameters and gas composition during modified atmosphere storage of fresh pork loin chops.** *J Food Prot* 1991, **54**:778-783
16. López Gálvez D, Hoz L, Ordóñez JA: **Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on microbiological and chemical changes in refrigerated tuna (*Thunnus alalunga*) steaks.** *J Agric Food Chem* 1995, **43**:483-490
17. Doherty A, Sheridan JJ, Allen P, McDowell DA, Blair YS, Harrington D: **Growth of *Yersinia enterocolitica* O:3 on modified atmosphere packaged lamb.** *Food Microbiol* 1995, **12**:251-257

18. Sheridan JJ, Doherty A, Allen P, Mcdowell DA, Blair YS, Harrington D: **Investigations on the growth of *Listeria monocytogenes* on lamb packaged under modified atmospheres.** *Food Microbiol* 1995, **12**:259-266
19. Doherty A, Sheridan JJ, Allen P, Mcdowell DA, Blair YS, Harrington D: **Survival and growth of *Aeromonas hydrophyla* on modified atmosphere packaged normal and high pH lamb.** *Int J Food Microbiol* 1996, **28**:379-392
20. Avery SM, Rogers AR, Bell G: **Continued inhibitory effect of carbon dioxide packaging on *Listeria monocytogenes* and other microorganisms on normal pH beef during abusive retail display.** *Int J Food Sci Technol* 1995, **30**:725-735
21. Mano SB, Ordóñez JÁ, Garcia de Fernando GD: **Aumento da vida útil e microbiologia da carne suína embalada em atmosfera modificada.** *Ciênc Tecnol Aliment* 2002, **22**(1), 1-10
22. Voordouw MJ, Adama D, Houston B, Govindarajulu P, Robinson J: **Prevalence of the pathogenic chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, in an endangered population of northern leopard frogs, *Rana pipiens*.** *BMC Ecology* 2010 10:6.

Figures

Figure 1 - pH of the samples of frog meat packaged in: (-□-) 100% air, (-◇-) 100% N₂, (-△-) 20/80 CO₂/N₂, (-○-) 40/60 CO₂/N₂, (-×-) 80/20 CO₂/N₂, and (-*-) 100% CO₂, stored at 5±1°C.

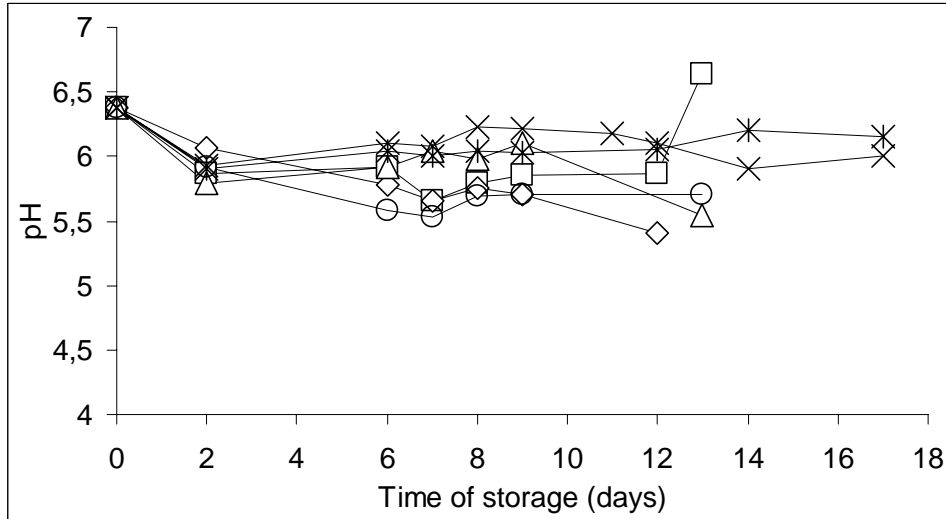
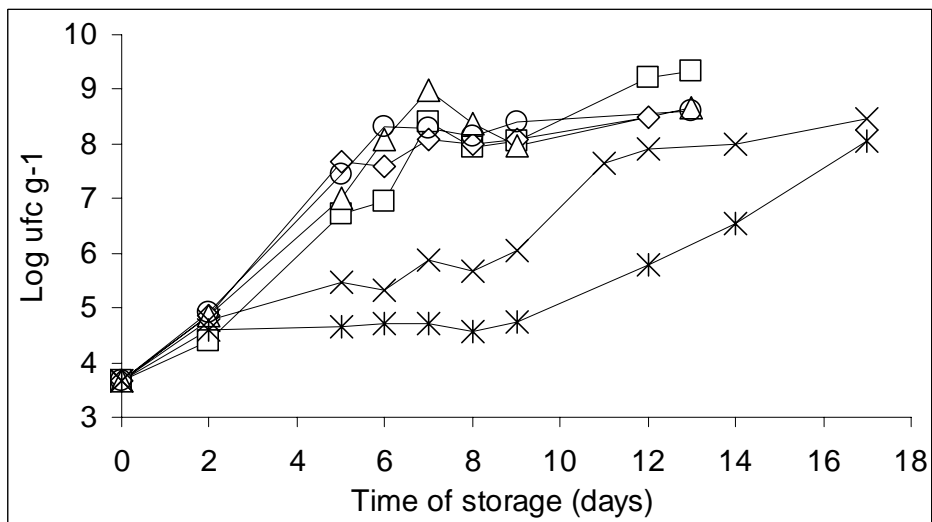


Figure 2 - Aerobic mesophiles growth curves in the samples of frog meat packaged in: (-□-) 100% air, (-◇-) 100% N₂, (-△-) 20/80 CO₂/N₂, (-○-) 40/60 CO₂/N₂, (-×-) 80/20 CO₂/N₂, and (-*-) 100% CO₂, stored at 5±1°C.



Tables

Table 1 - Shelf life and growth parameters of micro-organisms of leg fillets of bullfrog (*Rana catesbeiana*) packaged in several gas mixtures and stored at 5°C for 17 days.

Atmospheres	SL	LP	DT	NC
Air	6	0.4	11.9	9.2
N₂ (100%)	5	0.6	8.0	8.1
20/80 CO₂/N₂	5	0.8	8.4	8.5
40/60 CO₂/N₂	5	0.6	8.0	8.4
80/20 CO₂/N₂	10	—	23.1	8.4
CO₂ (100%)	15	8.6	17.6	8.1

SL – Shelf life (days to reach 10^7 cfu g⁻¹).

LP – Lag phase (days).

DT – Doubling time (hours)

NC – Number of cells at the stationary phase (log cfu g⁻¹)

3.2 INFLUÊNCIA DO ÁCIDO LÁTICO E DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA SOBRE A VALIDADE COMERCIAL DA LINGUIÇA FRESCAL DE FRANGO. Publicado na Revista Brasileira de Ciências Veterinárias (Paper II).

Influência do ácido láctico e da embalagem em atmosfera modificada sobre a validade comercial da lingüiça frescal de frango

Influence of lactic acid and modified atmosphere packing in shelf life of fresh poultry sausage

Carlos Adam Conte Junior^{1,2}, Valéria Garrido de Souza¹, Rami Fanticelli Batista¹, Eliane Teixeira Mársico², Sergio Borges Mano^{2*}

Resumo

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a influência da embalagem em atmosfera modificada (EAM) e do ácido láctico (AL) na validade comercial da lingüiça frescal de frango. Para tanto, foram processadas duas massas de lingüiça, sendo uma delas adicionado ácido láctico (0,15%). As lingüiças foram então embaladas nas seguintes atmosferas: 100%ar atmosférico, 100%N₂, 100%CO₂, 80%CO₂/20%N₂, 40%CO₂/60%N₂ e 20%CO₂/80%N₂, e armazenadas durante 16 dias a 4±2°C. Foram realizadas, nos dias 0, 1, 9 e 16, análises bacteriológicas: contagem em placa de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas, bactérias ácido-láticas, enterobactérias e *Pseudomonas*; e determinação do pH. A EAM a 80/20 CO₂/N₂ mostrou-se como método mais eficaz, sob o ponto de vista microbiológico, em termos de conservação da lingüiça frescal de frango, atingindo ao final do experimento valores de 6,0; 5,3 e 5,0 Log UFC/g (bactérias mesófilas, psicrotróficas e ácido-láticas, respectivamente). Em relação à adição do AL, tal tratamento foi eficaz sob o aspecto de inibição

microbiológica em quase todas as atmosferas, com exceção da 80/20 CO₂/N₂. Durante o experimento, não foi observado crescimento de enterobactérias e *Pseudomonas*. Em relação ao pH, pode-se observar que a adição de 0,15% de AL provocou uma queda do pH de 5,89 para ~5,50, suficiente para acarretar uma inibição significativa da taxa de multiplicação microbiana nas diferentes atmosferas, exceto na 80/20 CO₂/N₂. Pôde se concluir que a EAM com 80/20 CO₂/N₂, mostrou-se como o método de conservação mais eficaz quanto ao aumento da vida útil da lingüiça de frango e a adição de 0,15% de AL demonstrou ser uma alternativa eficaz para conservação deste produto.

Palavras-chave: ácido láctico, embalagem em atmosfera modificada, embutidos

Abstract

The present work has an objective to observe and to characterize, through microbiological analyses and pH determination, the influence of the Modified Atmosphere Packaging (MAP) and the lactic acid additive in shelf life of fresh poultry sausage. Two sausage batches were made under laboratory control. One of them was added of lactic acid (0.15%). The samples were processed, and packaged in plastic bags (four sausages per bag). Finally, the bags were filled with different atmospheres: 100% air, 100% N₂, 100% CO₂, 80/20 CO₂/N₂, 40/60 CO₂/N₂ and 20/80 CO₂/N₂. Samples were stored in walk-in cold rooms at 4±2°C. Samples were taken at different days of storage (zero, 1, 9 and 16). Both added and not added with lactic acid samples were subjected to total viable aerobic counts (mesophylic and psychrophylic), lactic acid bacteria, *Enterobacteriaceae*, and *Pseudomonas* sp. in specific media plates. Also, it was determinate the pH of all the samples. The results were arranged in tables and

graphs for the descriptive statistical analyses. The MAP 80/20 CO₂/N₂ was the more effective method to conserve fresh poultry sausages, reaching at the end of the experiment values of 6.0; 5,3 and 5.0 Log UFC/g (mesophylic, psycrophylic and acid-lactic bacteria, respectively), comparing to the conventional package (100% air) and 100% N₂ that reached at the end of the experiment maximum values of 8.8 and 9.4 Log UFC/g, respectively. The addition of the acid lactic was effective about the aspect of microbiological inhibition, reaching inferior values in almost all the atmospheres comparing to the samples without addition of the acid, except to 80/20 CO₂/N₂, that the values of the microbial count in both treatments (with and without acid) they were very close. During the experiment, it was not observed the growth of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas*. Analyzing the pH, it can be observed that the addition of 0.15% lactic acid caused a fall of the pH of 5.89 for ~5.50, enough to inhibit the microbial multiplication in the different atmospheres, except in 80/20 CO₂/N₂. After analyzed this results, it was concluded that MAP to 80/20% of CO₂/N₂ was the more effective method to increase the shelf life of the fresh poultry sausage, added or not added with lactic acid; the addition of 0.15% of lactic acid was an effective alternative for conservation of fresh poultry sausage chicken, wrapped or not in modified atmosphere.

Key words: lactic acid; modified atmosphere packaging; fresh poultry sausage

Introdução

O avanço da avicultura brasileira nas últimas três décadas permitiu um grande aumento no consumo *per capita* da carne de aves, proporcionando também o desenvolvimento dos mais variados tipos de produtos derivados, isto é,

produtos mais elaborados como, por exemplo, a lingüiça de frango, aos quais são agregados valor, maior conveniência e praticidade para o consumidor (Malavota et al., 2006).

Apesar de todos estes avanços científicos e tecnológicos da avicultura, a validade comercial dos produtos mantidos em atmosfera normal ou sem a presença de conservantes em sua composição é limitada. A refrigeração pode retardar as alterações indesejáveis, mas não aumenta a validade comercial suficientemente para atender as exigências de distribuição e comercialização, quando se necessita de transporte a zonas mais distantes dos centros de produção, ou quando se embalam para venda nas seções de refrigerados dos mercados (Lopes et al., 2004).

Em virtude disto, há um crescente interesse por parte das indústrias e pesquisadores em desenvolver novas tecnologias que permitam um prolongamento da validade comercial de produtos alimentícios. Logo, acredita-se que estudos devam ser conduzidos, no sentido de avaliar o comportamento de diversos produtos embalados em atmosfera modificada ou adicionados de aditivos saudáveis com características conservantes, frente às exigências atuais do mercado consumidor (Conte-Junior et al., 2006).

Em função do exposto, o presente trabalho tem como objetivo geral, observar e caracterizar, através de análises bacteriológicas e determinação do pH, a influência da embalagem em atmosfera modificada (EAM) e do aditivo conservante ácido láctico na validade comercial da lingüiça de frango.

Material e métodos

A lingüiça frescal de frango foi elaborada no Laboratório de Tecnologia de Carnes da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense. Utilizou-se uma formulação cuja constituição era: filé de frango (85,0%), toucinho (10%), sal (1,5%), alho (0,25%), pimenta branca (0,25%) e água destilada esterilizada (3%). Foram processadas duas massas de lingüiça, sendo a uma delas adicionado o ácido láctico (0,15%) de acordo com os objetivos do experimento.

No processo de fabricação, inicialmente, moeu-se o filé de frango descongelado juntamente com o toucinho em um moedor de carne da marca C.A.F. Picadores de Carne, utilizando-se para isso o disco com de 5mm de diâmetro. A seguir, procedeu-se a mistura manual com os demais ingredientes. Durante esta etapa, foram acrescentados os condimentos e a água destilada, misturando-os até que se obtivesse a liga desejada. A massa, então, foi dividida igualmente em duas bandejas, sendo que em uma delas foi adicionado o ácido láctico. A massa controle (sem o ácido láctico) foi embutida anteriormente à massa com o conservante. Para tanto, foi utilizada uma embutideira da marca Picelli, com embutidor de 5mm de diâmetro. Utilizou-se para o embutimento uma tripa artificial de colágeno da marca Coria FSC, com tamanho de 21 x 40mm.

As amostras foram constituídas, tanto as controle como as adicionadas de ácido láctico, por cerca de quatro gomos de lingüiça, acondicionados em embalagens plásticas barreira, de baixa permeabilidade aos gases, próprias para embalagem em atmosfera modificada. Tais embalagens mediam 25x35cm, sendo este tamanho de embalagem escolhido por propiciar uma boa capacidade volumétrica de armazenamento dos gases.

Os cilindros de gases utilizados no experimento foram adquiridos da empresa White Martins LTDA. Foram aplicados os seguintes gases ou mistura de gases: 100% ar atmosférico, 100% nitrogênio, 100% gás carbônico, 80% gás carbônico com 20% nitrogênio (80/20), 40% gás carbônico com 60% nitrogênio (40/60) e 20% gás carbônico com 80% de nitrogênio (20/80)

Todos os gomos de lingüiça já embalados foram estocados em geladeira com temperatura oscilando entre $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. As técnicas utilizadas para as análises bacteriológicas basearam-se nas metodologias citadas por Vanderzant e Splittstoesser (1992).

Durante o preparo da lingüiça, ou seja, no dia zero do experimento, várias amostras controles foram colhidas para a realização das contagens iniciais de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, bactérias heterotróficas aeróbias psicotróficas, bactérias ácido-láticas, enterobactérias e *Pseudomonas*. Através dessas contagens, obtinham-se informações com relação à qualidade da matéria prima, à qualidade dos condimentos, à higienização e à condição sanitária dos equipamentos. Com estes dados foi possível realizar também um rastreamento de alguma possível contaminação, durante a confecção e manipulação do produto.

Inicialmente, colheu-se uma amostra de aproximadamente 10g da matéria prima (filé de frango) já descongelada, "over night" em geladeira. Após a moagem da matéria prima, colheu-se também uma outra amostra de aproximadamente 10g. Em seguida a etapa da mistura, colheu-se outra amostra de aproximadamente 10g da massa já acrescida dos condimentos, do sal e da água. Após a divisão da massa em duas bandejas, colheu-se uma amostra de aproximadamente 10g desta massa misturada e adicionada do

conservante ácido láctico. Estas quatro subamostras foram colhidas em embalagem plástica esterilizada para “Stomacher” e depois pesadas asepticamente (10g). Após o embutimento da massa controle, foram colhidas mais duas amostras, constituindo uma amostragem da lingüiça controle e outra com ácido láctico previamente preparada. A colheita e pesagem foram realizadas da mesma forma que as anteriores.

Para a realização da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas utilizou-se à técnica “Pour Plate”. Após a solidificação do meio de cultura, incubavam-se as placas semeadas em posição invertida em estufa à 35-37°C durante 24 a 48h (mesófilas) e na geladeira com temperatura em torno de 7-10°C durante 7 a 10 dias (psicrotróficas). O meio de cultura utilizado para esta contagem foi o Ágar Padrão para contagem. A cada contagem de mesófilas e psicrotróficas foram semeadas três placas referentes às três últimas diluições consecutivas. Foram realizadas contagens totais de mesófilas e psicrotróficas em todas as seis amostras colhidas no dia zero.

A contagem em placa de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas viáveis foi realizada em todas as amostras colhidas durante o experimento. Realizou-se um acompanhamento do crescimento dessas bactérias no decorrer de 16 dias, realizando-se a contagem nos dias um, nove e 16 em todos os gomos de lingüiça, tanto controle quanto adicionados de ácido láctico, embalados nas diferentes atmosferas modificadas (100% ar atmosférico, 100% N₂, 100% CO₂, 80/20, 40/60 e 20/80 CO₂/N₂) utilizadas no experimento, os quais foram estocados em geladeira. Portanto, somou-se um total de três dias de análise, e ainda o

resultado das contagens iniciais, havendo então, no decorrer de todo o experimento, três contagens de mesófilas e psicrotróficas em cada gomo de lingüiça controle e adicionada de ácido láctico de acordo com cada atmosfera modificada: a) três contagens (um, nove e 16) de mesófilas e psicrotróficas na amostra controle embalada em 100% ar; b) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra com ácido láctico embalada em 100% ar; c) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra controle embalada em 100%N₂; d) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra com ácido láctico embalada em 100% N₂; e) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra controle embalada em 100% CO₂; f) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra com ácido láctico embalada em 100% CO₂; g) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra controle embalada em 80/20 CO₂/N₂; h) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra com ácido láctico embalada em 80/20 CO₂/N₂; i) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra controle embalada em 40/60 CO₂/N₂; j) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra com ácido láctico embalada em 40/60 CO₂/N₂; k) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra controle embalada em 20/80 CO₂/N₂; l) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra com ácido láctico embalada em 20/80 CO₂/N₂.

Para a realização da contagem em placa de enterobactérias também se utilizou a técnica já descrita de "Pour Plate". As placas foram incubadas em posição invertida em estufa à 35-37°C por 24 a 48 horas. O meio de cultura utilizado para esta contagem foi o VRBD-ágar cristal violeta vermelho-bile-glucosa, segundo Mossel. O total de dias de contagens, assim como, o número total de

contagens para enterobactérias seguiu a mesma seqüência das contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas.

Para a realização da contagem de bactérias ácido-láticas em placa também se utilizou a técnica já descrita de "Pour Plate" (com dupla camada). As placas foram incubadas em posição invertida à 35-37°C por 24 a 48 horas. O meio de cultura utilizado para esta contagem foi o ágar MRS, segundo De Man, Rogosa e Sharpe. O total de dias de contagens, assim como, o número total de contagens para bactérias ácido-láticas seguiu o mesmo esquema das contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas.

Para a realização da contagem de *Pseudomonas* em placa, foi utilizada a técnica de espalhamento superficial. A placa foi incubada invertida em estufa a 35-37°C por 24 a 48 horas. A leitura da placa foi realizada com o auxílio de uma lâmpada ultravioleta, evidenciando as UFC através da fluorescência. O meio de cultura utilizado para esta contagem foi o ágar Cetrimide. O total de dias de contagens, assim como, o número total de contagens para *Pseudomonas* seguiu o mesmo esquema das contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas.

Após o período de incubação correspondente das placas semeadas em APC, VRBD, MRS e ágar Cetrimide, realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) presentes nas placas, considerando sempre as placas que continham entre 25 e 250 UFC. Para tanto, utilizou-se o contador de colônias do tipo Quebec. O valor final da contagem era resultante da multiplicação do número de UFC pelo inverso da diluição da placa escolhida. Os resultados das contagens foram anotados em tabelas previamente preparadas para melhor organização dos dados.

Realizou-se determinação do pH. Para tanto, introduziu-se o eletrodo do pHmetro na própria embalagem plástica para “Stomacher”, onde se homogeneizou a amostra de lingüiça (diluição 10^{-1}). Determinou-se o pH em todas as amostras analisadas bacteriologicamente. Os dados das determinações de pH também foram postos em tabelas para melhor organização dos mesmos.

A análise estatística constou de uma análise descritiva simples, através da qual se realizou a média e proporção dos diversos dados estudados, procedendo-se um estudo comparativo, com utilização de tabelas e gráficos. Para a realização da referida análise estatística descritiva e confecção dos gráficos utilizou-se o programa Microsoft® Excel 2002.

Resultados e discussão

Os valores obtidos ao longo do experimento foram dispostos em tabelas e gráficos para realização da análise estatística descritiva. Entretanto, antes da apresentação desses resultados, é importante salientar que os diferentes tratamentos aos quais as amostras foram submetidas serão avaliados, neste trabalho, quanto à capacidade de inibição da multiplicação dos microrganismos analisados, fator relevante para aumentar a validade comercial de um alimento. Analisando as Figuras 1, 2, 3 e 4, observar-se que os valores das contagens do dia zero dos microrganismos mesófilos e bactérias ácido-láticas do tratamento com ácido foram menores do que das amostras-controle. Além disso, nas amostras adicionadas de ácido láctico, tanto os mesófilos, como os psicrotórficos tiveram os valores das contagens do dia um (01) inferiores aos valores do dia zero. Tais resultados poderiam sugerir uma ação bactericida do

ácido láctico, pois segundo Ferreira (1999), este ácido pode ter um efeito bacteriostático, como também bactericida devido a sua capacidade de provocar um desequilíbrio intracelular, retardando o crescimento celular e, em alguns casos, provocando até a morte do microrganismo.

Em relação ao comportamento dos mesófilos frente aos diferentes tratamentos, através da Figura 1 e 2, pode-se observar que, no nono (9º) dia, em praticamente todas as atmosferas (exceto a 100% CO₂) do tratamento com ácido, houve uma inibição da multiplicação microbiana em relação às amostras-controle (sem ácido). Inibição esta significativa principalmente na atmosfera 20/80% de CO₂/N₂, onde a contagem da amostra-controle (8,5) ultrapassa o dobro da contagem da amostra adicionada do ácido (4,0). Na atmosfera 100% de N₂, observou-se quase o dobro da multiplicação microbiana na amostra-controle (8,5) em relação à amostra adicionada do ácido láctico (4,3). Tais resultados comprovam a ação bacteriostática do ácido láctico. Já a EAM a 100% CO₂ teve uma ação diferenciada no comportamento dos microrganismos mesófilos, onde se observa uma menor contagem no tratamento sem adição do ácido láctico (5,0) em relação ao tratamento com adição do mesmo (6,0).

No décimo sexto (16º) dia, a ação bacteriostática do ácido láctico continua efetiva, fato este demonstrado através dos menores valores atingidos nas amostras submetidas ao ácido láctico em relação às controle, exceto na atmosfera a 80/20% de CO₂/N₂, onde o valores da contagem microbiana em ambos os tratamentos (com e sem ácido) foram idênticos (6,0), demonstrando que, nesta concentração gasosa, a adição do ácido láctico não foi significativa do ponto de vista de inibição do crescimento microbiano.

Com relação aos microrganismos mesófilos, o tratamento com a adição do ácido láctico foi muito eficaz, acarretando de modo geral uma diminuição da taxa de multiplicação microbiana quando comparado ao tratamento sem o ácido. Quanto às atmosferas, a melhor foi a 80/20 CO₂/N₂ com ou sem ácido e a pior a 100% de N₂ sem ácido.

Em relação às bactérias ácido-láticas (Figura 3 e 4), em função de problemas de contaminação durante o desenvolvimento das análises bacteriológicas, algumas contagens não puderam ser realizadas. Entretanto, pelos resultados obtidos, pode-se perceber que o ácido láctico também teve uma ação inibitória sobre os microrganismos. Analisando os dados do tratamento sem o ácido, observa-se que, semelhantemente ao comportamento dos microrganismos mesófilos, a melhor atmosfera foi a 80/20 CO₂/N₂ e a pior a 100% de N₂ sem ácido. Além disso, a ação da EAM a 100% CO₂ também foi semelhante aos mesófilos, onde encontrou-se contagem de 5,0 Log UFC/g no tratamento sem o ácido e 5,8 no tratamento com ácido no nono dia.

Com relação aos psicotróficos (Figuras 5 e 6), no dia zero, os valores da contagem microbiana em ambos os tratamentos foram idênticos, diferindo dos microrganismos mesófilos e bactérias ácido-láticas, cujos valores do tratamento com ácido foram inferiores aos valores das amostras-controle. Entretanto, a partir do dia um (01), os psicotróficos passam a ter um comportamento semelhante ao dos microrganismos mesófilos, ou seja, valores inferiores aos do dia zero no tratamento com ácido (efeito bactericida) e tais valores também inferiores aos das amostras-controle (efeito bacteriostático).

No nono dia, semelhantemente aos mesófilos, em praticamente todas as atmosferas (exceto a 100% de CO₂) do tratamento com ácido, houve uma

inibição da multiplicação microbiana em relação às amostras-controle (sem ácido). Da mesma forma que os mesófilos, a 100% de N₂, houve quase o dobro de multiplicação microbiana na amostra-controle (8,2) em relação à adicionada de ácido (4,6). Ainda, a contagem do tratamento a 100% CO₂ sem adição do ácido também foi menor (4,4) do que do tratamento com o ácido (6,2).

No décimo sexto dia, também foram constatados valores inferiores no tratamento com ácido em relação ao tratamento sem ácido, exceto na atmosfera a 80/20 CO₂/N₂, onde a contagem microbiana do tratamento com ácido (5,8) foi próxima à do tratamento sem ácido (5,3), demonstrando que, semelhantemente às bactérias mesófilas, nesta concentração gasosa, a adição do ácido láctico não foi significativa do ponto de vista de inibição do crescimento microbiano.

De modo geral, pode-se observar que o comportamento dos psicotróficos foi muito semelhante ao dos mesófilos, demonstrando que nas amostras tratadas com ácido láctico houve uma significativa inibição da multiplicação microbiana. Também da mesma forma, a atmosfera mais eficaz foi a 80/20 CO₂/N₂ com ou sem ácido e a pior a 100% de N₂ sem ácido.

É importante ressaltar que, tanto nos mesófilos como nos psicotróficos, a adição do ácido láctico não causou grandes alterações na atmosfera com 80/20 CO₂/N₂, uma vez que os resultados de ambos os tratamentos (com ácido e sem ácido), nos diferentes dias de análise, foram muito próximos. Tais resultados demonstram que, nesta concentração de CO₂, a adição do ácido não foi significativa, pois a concentração gasosa de 80/20 CO₂/N₂, por si só, já bastou para uma boa inibição da multiplicação dos microrganismos.

No tratamento sem o ácido, tanto nas bactérias mesófilas e psicotróficas, como nas ácido-láticas, a adição de 40/60 e 80/20 de CO₂/N₂ e 100% CO₂ mostrou-se eficaz na redução das contagens até o nono dia de análise, retardando a multiplicação de microrganismos em relação às atmosferas com 20/80 CO₂/N₂, 100% de N₂ e 100% de ar. Já no décimo sexto dia, a EAM a 100% CO₂ apresenta uma ação diferente do esperado quanto ao comportamento de tais microrganismos, atingindo valores de contagens muito próximos aos valores das amostras embaladas a 100% ar. Em relação às bactérias ácido-láticas, tal fato se deve, provavelmente, em função do gás carbônico favorecer o crescimento de tais microrganismos (Parry, 1993). Quanto aos demais microrganismos, não foram encontradas possíveis explicações para tal comportamento.

Cabe ainda ressaltar que a EAM a 100% CO₂ teve uma ação diferente das demais no nono dia em relação ao comportamento das bactérias mesófilas, ácido-láticas e psicotróficas, apresentando menor contagem no tratamento sem adição do ácido em relação ao tratamento com ácido.

De modo geral, quando da adição do ácido láctico, o comportamento das bactérias mesófilas, psicotróficas e ácido-láticas frente às diferentes atmosferas foi semelhante, apresentando uma inibição da multiplicação microbiana em todas as concentrações de gases utilizados, inclusive 100% de ar e 100% de N₂, sugerindo não haver o sinergismo esperado entre a adição de ácido e a utilização do CO₂ na EAM.

Cegielska e Pikul (2000) processaram três tipos de lingüiça de frango fatiada, diferindo na composição, no grau de cominuição e quantidade de bactérias psicotóficas e ácido láticas. Foram embaladas a vácuo, em EAM

(75/20/5 CO₂/N₂/O₂) ou em ar e estocadas entre 0-2°C. Concluíram, ao final do experimento, que lingüiças com alto grau de cominuição e de carne desossada mecanicamente devem ser embaladas em EAM, pois tal tratamento resultou numa validade comercial duas a cinco vezes maiores do que as lingüiças embaladas em ar e uma semana a mais do que as embaladas a vácuo. Semelhantemente a estes autores, no presente experimento também se observou um aumento da validade comercial da lingüiça de frango quando esta fora embalada em concentrações de 40/60 e 80/20 de CO₂/N₂ em relação à embalada em ar, quando do tratamento sem o ácido.

Alguns autores sugerem um pré-tratamento das carcaças de frango como uma forma de descontaminação, e assim também proporcionando um aumento da validade comercial do produto. Sawaya et al. (1995) estudaram a validade comercial de carcaças de frango tratadas previamente com uma solução de ácido láctico e embaladas em EAM (70/25/5 CO₂/N₂/O₂). Ao final do trabalho, concluíram que o pré-tratamento das carcaças com o ácido láctico, com ou sem EAM, proporcionou uma potencial alternativa para aumento da validade comercial da lingüiça de frango. Da mesma forma, observou-se no presente trabalho, que a adição do ácido láctico à massa da lingüiça significou uma ótima alternativa para aumento da validade comercial do produto, independente se embalada ou não em EAM. Ainda Zeintoun & Debevere (1992) procedendo uma descontaminação de coxas de frango com uma solução de ácido láctico/lactato de sódio em combinação com EAM, observaram que, quando o produto não era tratado com ácido láctico, a validade comercial era 1,0; 2,3 e 4,0 dias mais curta. Diferentemente, Zeintoun (1992) concluiu que o uso combinado de uma solução de ácido láctico com EAM proporcionou melhor validade

comercial à carne de frango do que o uso de tais métodos de conservação isoladamente.

Lopes et al. (2004) trabalhando com lingüiça de frescal de frango submetida às mesmas concentrações de gases utilizadas no presente experimento, ao final de 21 dias, semelhantemente, concluiu que a amostra embalada a 80/20 de CO₂/N₂ apresentou o maior tempo de validade comercial.

Com relação ao ácido láctico, Rondini et al. (1997), comprovaram o uso do lactato de sódio para prolongamento da validade comercial da lingüiça frescal de frango. Tais autores processaram três diferentes formulações de lingüiça: sem adição do lactato de sódio; 1,5% do ácido a pH 7,0 e 1,5% do ácido a pH 5,5. As lingüiças foram embaladas em envoltórios permeáveis a gases ou em EAM (80/20 O₂/N₂) e estocadas a 6°C. Ao final do trabalho, semelhantemente ao uso do ácido láctico neste trabalho, os autores concluíram que, de modo geral, o lactato de sódio reduziu o crescimento microbiano, proporcionando um aumento da validade comercial do produto. Além disso, a EAM também proporcionou melhor validade comercial do que a embalagem convencional (ar).

Durante o experimento, não se observou o crescimento de enterobactérias e *Pseudomonas*, demonstrando a inocuidade da matéria-prima, bem como a aplicação das boas práticas de fabricação durante o processo de elaboração da lingüiça.

Segundo Parry (1993), o gás carbônico tem uma ação inibitória muito efetiva sobre as bactérias aeróbias da decomposição, Gram-negativas, tais como *Pseudomonas*. Entretanto, tal afirmativa não pôde ser utilizada como justificativa para o não crescimento de *Pseudomonas* neste experimento, uma

vez que tal crescimento não foi observado em nenhuma das atmosferas, inclusive nas que não possuíam o CO₂.

Quanto às enterobactérias, Zeitoun et al. (1994), analisando o uso destas como indicadoras de higiene no processamento de coxas de frango, observaram que, o tratamento das coxas com uma solução de ácido láctico a 10% eliminou as enterobactérias significativamente. Entretanto, neste trabalho, também não se pode afirmar que as enterobactérias não cresceram em função da ação do ácido láctico adicionado, uma vez que, na amostra-controle (sem adição do ácido), também não se observou crescimento.

Em relação ao pH (Figuras 7 e 8), pode-se observar que a adição de 0,15% de ácido láctico provocou uma queda do pH de 5,89 para em média de 5,50, suficiente para acarretar uma inibição significativa da taxa de multiplicação microbiana nas diferentes atmosferas, exceto na 80/20 CO₂/N₂.

É importante ressaltar que, embora a literatura (Pardi, 1996; Ferreira, 1999) recomende concentrações de 0,5 a 2,0% de ácido láctico como agente conservador, neste trabalho, foi utilizada uma concentração inferior (0,15%), uma vez que outras duas barreiras (EAM e refrigeração) estariam sendo utilizados concomitantemente. Ao final do experimento, pode-se observar que, a concentração de 0,15% de ácido láctico adicionada à massa da lingüiça de frango, foi suficiente para acarretar uma inibição dos microrganismos, demonstrando que, em concentrações inferiores a 0,5%, a ação do ácido láctico também é efetiva.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, sob o ponto de vista microbiológico, pode-se concluir que a embalagem em atmosfera modificada (EAM) a 80/20 CO₂/N₂, com ou sem ácido, mostrou-se como o método de conservação mais eficaz. As EAM a 40/60 e 80/20 CO₂/N₂, sem ácido láctico, retardaram o crescimento microbiano, comparativamente às EAM a 20/80 CO₂/N₂, 100% N₂ e 100% ar, aumentando a validade comercial do produto.

A utilização do ácido láctico, a 0,15%, não provocou grandes variações de pH, mas demonstrou ser um aditivo eficaz na conservação de lingüiças de frango, embaladas ou não em atmosfera modificada. Sugere-se, de acordo com as conclusões acima e baseado na literatura consultada que mais estudos sejam realizados no sentido de avaliar o comportamento dos microrganismos frente a outras atmosferas modificadas; avaliar a ação da EAM a 100% CO₂ sob o aspecto microbiológico, buscando as possíveis causas do seu efeito diferenciado sobre os microrganismos observado neste experimento; avaliar o comportamento dos microrganismos frente a um pré-tratamento (“lavagens”) com ácido láctico da matéria-prima cárnea a ser utilizada no processamento da lingüiça, resultando numa redução da carga microbiana inicial e analisar o produto (lingüiça frescal de frango), submetido aos diferentes tratamentos avaliados neste experimento, também sob o ponto de vista sensorial.

Referências

CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA, R.; PIKUL, J. Modified atmosphere packaging as a way of prolonging shelf-life of sliced poultry sausages stored in refrigerated conditions. *Chłodnictwo*. v.35, n.7, p. 37-41. 2000.

CONTE-JÚNIOR, C. A.; FERNÁNDEZ, M. e MANO, S.B. Use of carbon dioxide to control the microbial spoilage of bullfrog (*Rana catesbeiana*) meat. In: Mendez-Vilas, A. *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and Their Interactions*. Hardcover: Ed. Wiley-VCH. 822p, 2006.

FERREIRA, M.S. Lactatos de sódio e potássio aumentam vida-de-prateleira e melhoram a segurança. *Revista Nacional da Carne*. n. 270, p.58-59, 1999.

LOPES, M. M.; CONTE JUNIOR, C. A.; PEIXOTO, B. T. M.; SOUZA, V. G.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; PARDI, H. S.; MANO, S. B. Efeito da embalagem em atmosfera modificada sobre a conservação de linguiça fresca de frango. *Higiene Alimentar*, v. 18, p. 60-65, 2004.

MALAVOTA, L. C. M.; CONTE-JUNIOR, C. A.; LOPES, M. M.; SOUZA, V. G.; PEIXOTO, B. T. M.; STUSSI, J. S. P.; PARDI, H. S.; MANO, S. B. Análise micológica de linguiça de frango embalada em atmosfera modificada. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 13, n. 1, p. 3-9, 2006.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. *Ciência, higiene e tecnologia da carne*. Niterói:EDUFF, 1996. v.2. 1110p.

PARRY, R. T. *Envasado de los alimentos en atmósfera modificada*. Madrid: A. Madrid Vicente, 1993. 331p.

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.2-9, p.12-16. 1997.

SAWAYA, W. N.; ELNAWAWY, A. S.; AL ZENKI, S.; AL OTAIBI, J.; AL OMIRAH, H.; AL AMIRI, H. Storage stability of chickens as affected by MAP and lactic acid treatment. *Journal of Food Science*, v.60, n.3, p.611-614. 1995.

VANDERZANT, C. e SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3ed: Washington: American Public Health Association (APHA), Capítulo 4, p.75-94, 1992.

ZEITOUN, A. A. M. Use of lactic buffers and modified atmosphere packaging to improve shelf-life and safety of poultry. *Voedingsmiddelentechnologie*, v.25, n.13, p.50. 1992.

ZEITOUN, A. A. M.; DEBEVERE, J. M. Decontamination with lactic acid/sodium lactate buffer in combination with modified atmosphere packaging effects on the shelf life of fresh poultry. *International Journal of Food Microbiology*, v.16, n.2, p.89-98. 1992.

ZEITOUN, A. A. M.; DEBEVERE, J. M.; MOSSEL, D. A. A. Significance of Enterobacteriaceae as index organisms for hygiene on fresh untreated poultry, poultry treated with lactic acid and poultry stored in a modified atmosphere. *Food Microbiology*, v.11, n.2, p.169-176. 1994.

FIGURAS

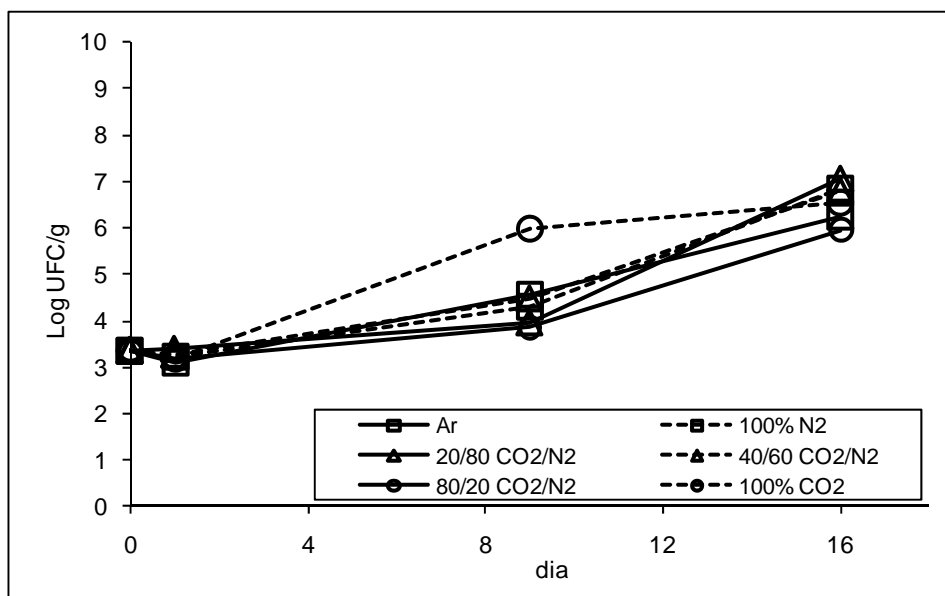


Figura 1. Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas presentes nas amostras de lingüiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

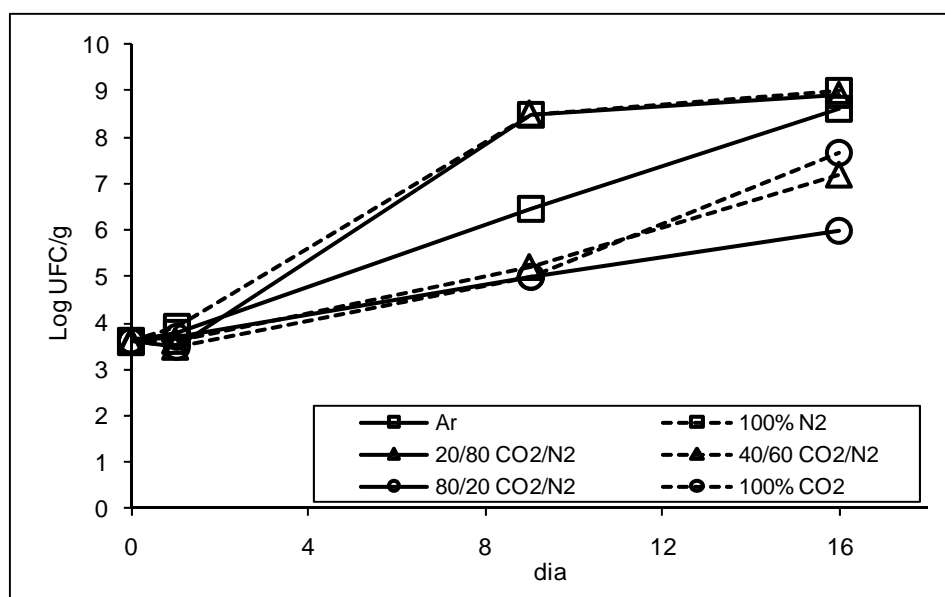


Figura 2. Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas presentes nas amostras de lingüiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, sem adição de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

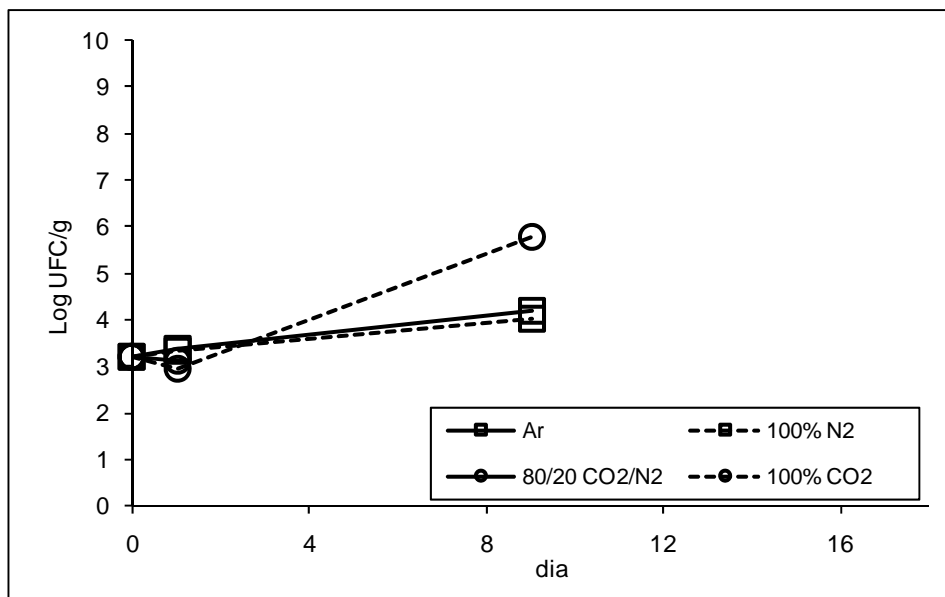


Figura 3. Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias ácido-láticas presentes nas amostras de lingüiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

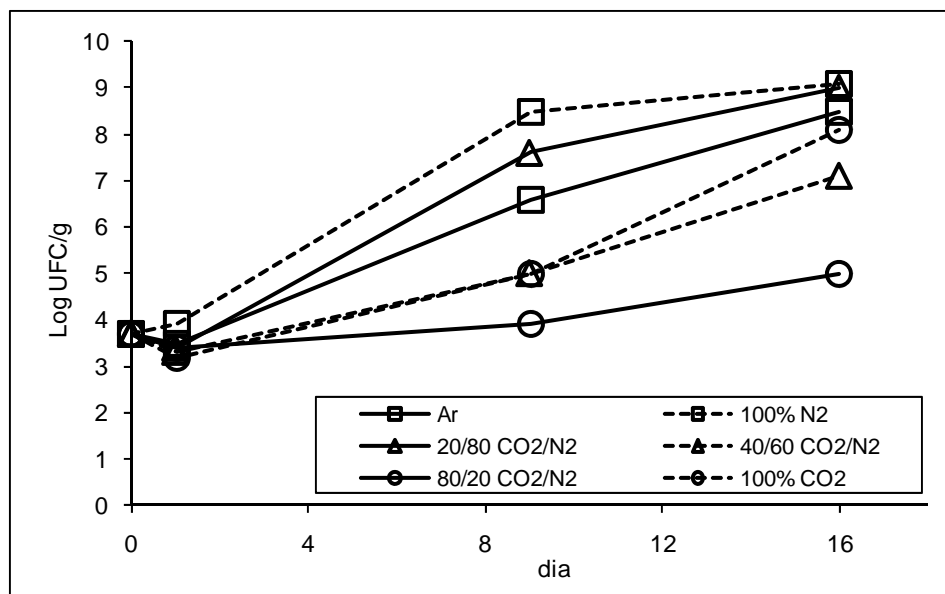


Figura 4. Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias ácido-láticas presentes nas amostras de lingüiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, sem adição de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

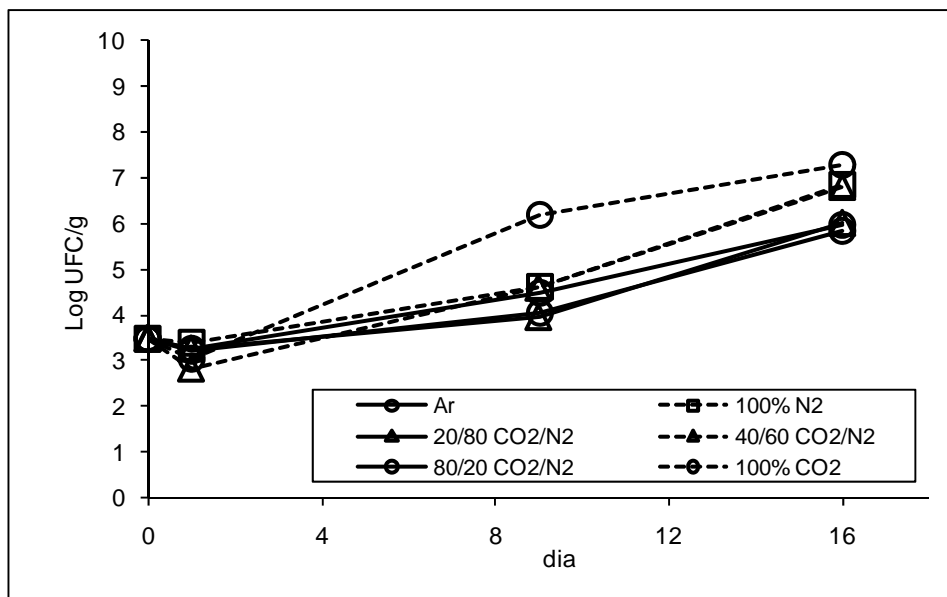


Figura 5. Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias psicotróficas presentes nas amostras de lingüiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

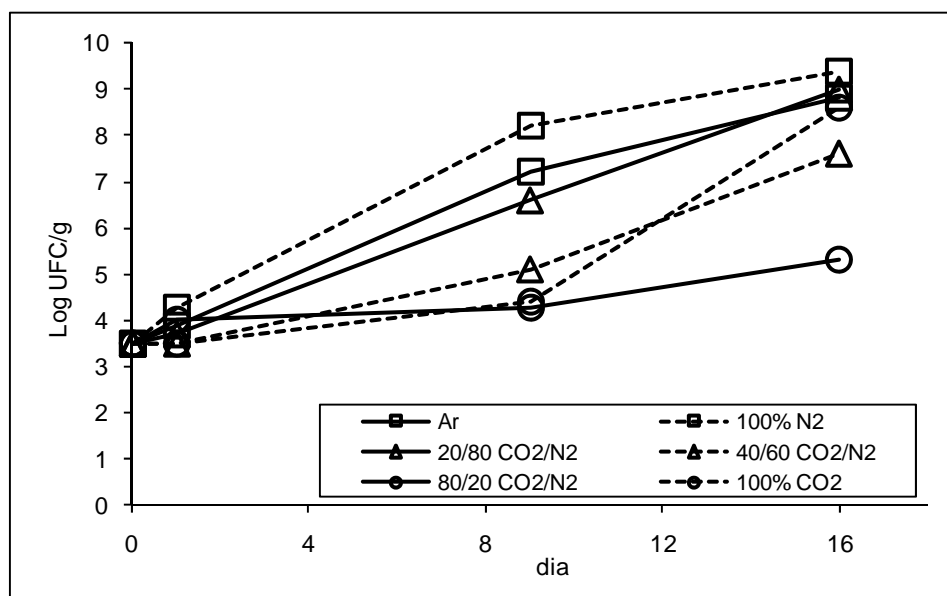


Figura 6. Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias psicotróficas presentes nas amostras de lingüiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, sem adição de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

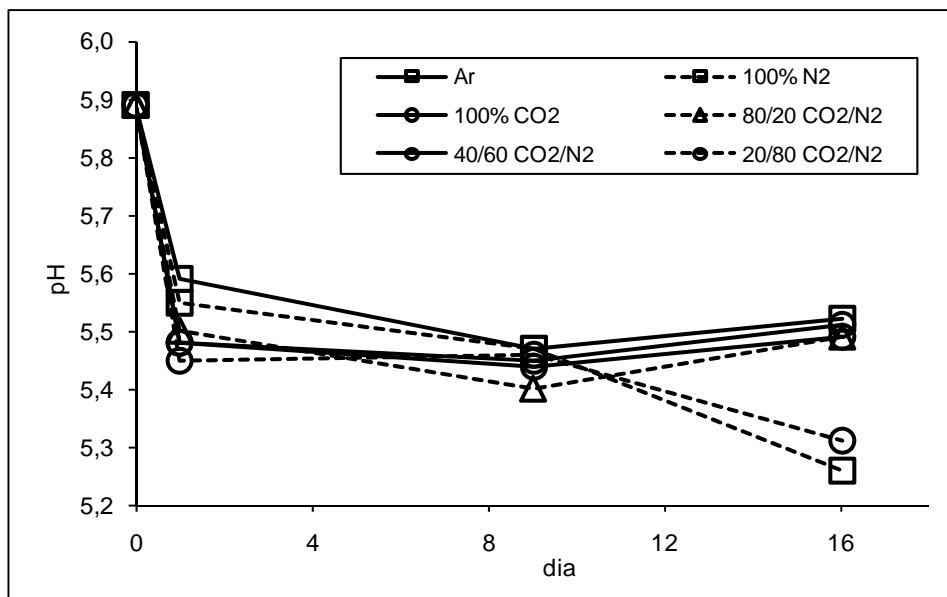


Figura 7. Representação gráfica dos resultados dos valores de pH das amostras de lingüiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

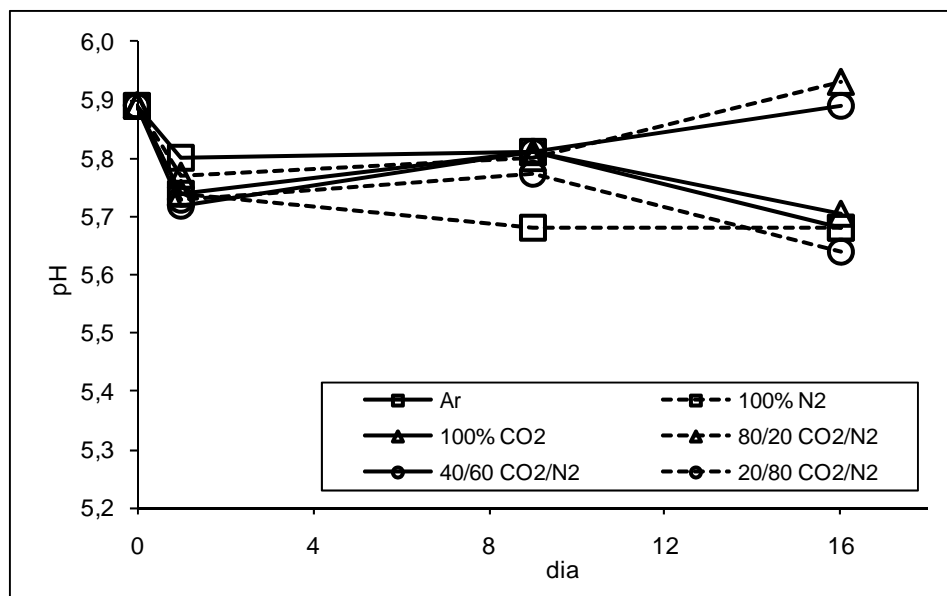


Figura 8. Representação gráfica dos resultados dos valores de pH das amostras de lingüiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, sem adição de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

3.3 EFFECT OF MODIFIED ATMOSPHERE PACKAGING ON THE GROWTH/SURVIVAL OF *Yersinia enterocolitica* AND NATURAL FLORA ON FRESH POULTRY SAUSAGE. Publicado no Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology (Paper III).

Effect of modified atmosphere packaging on the growth/survival of *Yersinia enterocolitica* and natural flora on fresh poultry sausage

C.A. Conte-Junior^{1,2*}, B.T. Macedo¹, M.M. Lopes¹, R.M.

Franco¹, M.Q. Freitas¹, M. Fernandez² and S.B. Mano¹

¹Department of Food Technology, Faculty of Veterinary Science, Universidade Federal Fluminense, Vital Brazil Filho, 64, CEP: 24230-340, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil.

²Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, CP: 28040, Madrid, Spain.

Modified atmosphere packaging (MAP) is increasingly used to extend shelf-life of fresh produce. In the present work, we determine the survival and growth of *Yersinia enterocolitica* and aerobic mesophiles on fresh poultry sausage under MAP. Samples were divided in two lots, half inoculated with 10^5 cfu g⁻¹ of *Y. enterocolitica* ATCC 9610, and half uninoculated control samples. The inoculated and control samples were packaged in different CO₂ concentrations and storage at 4±1°C, during 19 days. Parameters of microbial growth (lag and log phase) were determined by Baranyi and Roberts's equation. Aerobic mesophiles counts presented similar log and lag phase in all samples, except for the ones packaged with 20% CO₂. In the inoculated samples *Y. enterocolitica*

showed negative log phase in 100% CO₂, 80% CO₂, and 40% CO₂, 2.1 days in 20% CO₂, and approximately 0.3 day in air and 100% N₂. The lag phase varied from 0.9 to 12.0 days (air and 100% CO₂, respectively). Results show that MAP slowed the growth of *Y. enterocolitica* due to the bacteriostatic effect of CO₂ on the development of this pathogen in the samples, but MAP itself was not able to eliminate this pathogen.

Keywords carbon dioxide; MAP; pathogen

1. Introduction

Poultry is considered one of the most important animal protein sources for the world population [1, 2]. In Brazil, aviculture has significantly grown for the past ten years. Brazil is already the biggest poultry meat exporters in the world. In the year 2007, Brazil produced 9,700 thousand tons and exported 3,203 thousand tons of poultry meat, excluding industrialized products. In 2000, the Brazilian annual poultry consumption was 5,110 thousand tons, this number rising to 7,120 thousand tons in 2007 [3]. In addition to this, the poultry industry has started to develop new products, such as sausages and other industrialized products [4, 5].

Modified atmosphere packaging (MAP) technology provides a method of offering to consumers fresh products with a longer shelf-life [6]. This technology can be used by the food industry as an efficient tool to launch new products, providing convenience and practicability to them [7, 8]. At the present time, the food sector requires technologies that can replace

preservation methods which can alter food chemically and physically by less severe methods, such as MAP technology [9, 10].

However, an extended shelf-life can lead to an increase of the microbiological risk. Any attempt of extending the shelf-life of foods should consider the potential health hazard posed by the growth of the cold-tolerant pathogens [10, 11, 12, 13]. *Y. enterocolitica* is a psychrotrophic pathogen, able to grow and reach high concentrations in a short period of time, when in refrigeration temperature [14, 15]. Yersiniosis is mostly a food borne disease. When acquired by contaminated food this pathogen can cause gastroenteritis with diarrhea and/or vomit, even though, fever and abdominal pain [16, 17, 18]. This microorganism may also cause infection in other sites such as wounds, joints and urinary tract [19].

The objective of this study was to evaluate the growth/survival of aerobic mesophiles and *Y. enterocolitica*, when contaminating fresh poultry sausage, in MAP with different concentrations of CO₂ (100% CO₂, 100% N₂, 20/80 CO₂/N₂, 40/60 CO₂/N₂, 80/20 CO₂/N₂). For this purpose, the conditions and velocity of the growth of this pathogen in MAP environment and in aerobiosis, at 4±1°C, were studied.

2. Materials and methods

2.1 Sausage preparation

Fresh poultry sausages were elaborated at the Laboratory of Meat Technology, Faculty of Veterinary, Universidade Federal Fluminense, according to the following formulation: 85.5% poultry breast, 10% pork belly, 1.5% salt, 0.25% powdered garlic, 0.20% white pepper, and 3% sterilized distilled water. A total of 5 Kg of fresh poultry sausage were elaborated. Chicken breast fillets and pork belly were grinded together in a grinder equipped with a disk of 1 mm of diameter. Grinded meat and pork belly were mixed manually with the condiments and distilled water, until the 5 Kg sausage mixture was totally homogenized. Then, the sausage mass was divided into two lots of 2.5 Kg each. A suspension of 10^5 cfu g⁻¹ of *Y. enterocolitica*, ATCC 9610, was inoculated into one of the batches by manual mixing. Both control and inoculated batches were stuffed in artificial collagen casings, 'Coria' FSC 21 x 40, using a stuffing machine 'Picelli', with a 10 mm diameter stuffer. The control batch was stuffed before the inoculated one. A total of 180 small (10.0 x 1.5 cm) sausages was manufactured, 90 control sausages and 90 inoculated sausages.

2.2 *Yersinia enterocolitica* strain

The pathogen strain of *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 [20] was obtained from the Health Quality Control National Institute, at the Oswaldo Cruz Foundation.

2.3 Modified atmosphere packaging

Six lots of fifteen control sausages and fifteen sausages inoculated with *Y. enterocolitica* were packaged with either 1 L of 100% air, 100% N₂, 100% CO₂, or 20/80, 40/60, or 80/20 CO₂/N₂ in an 'FAMABRAS' (Model TEC MAQ sealed in vacuum AP 450) packaging machine, which, finally, heat-sealed the bags. 'White Martins LTDA' supplied the gases. Each sausage was packaged alone in one bag of 20 x 22 cm 'Cryovac' BB4L, with diffusion coefficients, according to the supplier, of 150 cm³/24h.m².bar to CO₂, 35 cm³/24h.m².bar to O₂ and 1.4 cm³/24h.m².bar to N₂ at 22°C. All packaged sausages were kept under refrigeration, at 4±1°C.

2.4 Microbial analyses

Microbial analyses were performed on duplicate samples, i.e. two slices from different bags. After opening the bags, slices (10g) were immersed in 90 ml sterile physiological saline solution (0.85% NaCl) and homogenized in a stomacher (Colwoth Stomacher 400 Lab Blender, Seward, U.K.) for 15s. After, decimal dilutions were prepared in saline solution.

Aerobic mesophiles counts were determined by the pour plate technique [21], in Plate Count Agar PCA (Merck), incubated at 35°C for 48h. *Yersinia enterocolitica* counts were performed by the spread plate technique [21], in *Yersinia* Selective Agar Base (Oxoid) with selective supplement SR109 (cefsulodin 1.5%, igarsan 0.4% and novobiocin 0.25%), at 32°C for 24h.

Aerobic mesophiles and *Y. enterocolitica* counts were determined after 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 14, 16, and 19 days of storage. Both control and inoculated samples were analyzed for periodic aerobic mesophiles counts. Only inoculated samples were analyzed for *Y. enterocolitica* counts.

Bacterial growth parameters (lag phase and log phase) were assessed using the Baranyi and Roberts [22] equations and the self-life of meat was defined as days to reach 10^7 cfu g⁻¹.

3. Results

Figure 1 shows the growth curves of aerobic mesophiles in the control and inoculated samples packaged in the six atmospheres assayed in the present work.

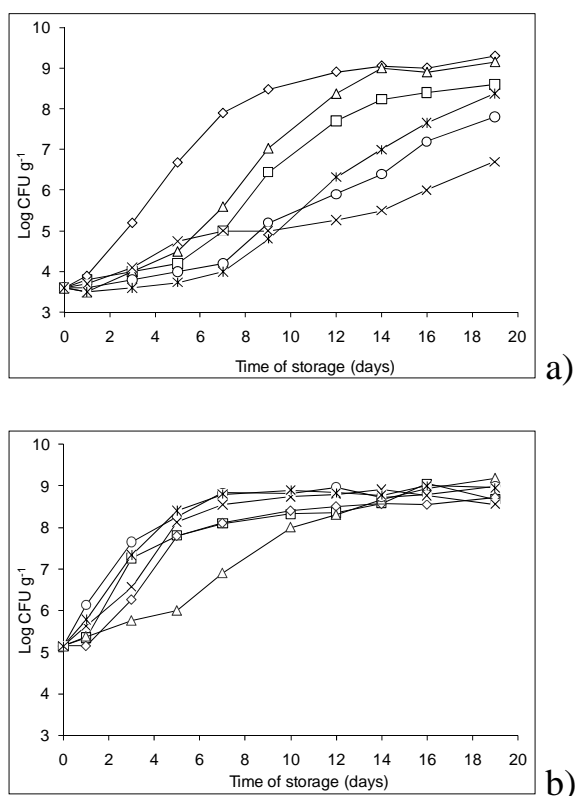


Fig. 1 Aerobic mesophiles growth curves in the control (a) and inoculated (b) samples packaged in: (\square) 100% air, (\diamond) 100% N_2 , (\triangle) 20/80 CO_2/N_2 , (\circ) 40/60 CO_2/N_2 , (\times) 80/20 CO_2/N_2 , and ($*$) 100% CO_2 , stored at $4 \pm 1^\circ C$.

In the control samples, the initial count was 4.4×10^3 cfu g^{-1} . Among the six atmospheres tested during the 19 days of experiment, MAP with 20/80 CO_2/N_2 and with 100% N_2 showed the highest counts of aerobic mesophiles on day 19, reaching 7.5×10^9 cfu g^{-1} and 9.6×10^9 cfu g^{-1} , respectively. On the other hand, MAP with 40/60 CO_2/N_2 and 80/20 CO_2/N_2 showed the lowest levels of aerobic mesophiles, reaching 6.2×10^7 cfu g^{-1} and 5.2×10^6 cfu g^{-1} , on day 19, respectively. Thus, both atmospheres (80/20 CO_2/N_2 and 40/60 CO_2/N_2) showed the best behavior for aerobic

mesophiles, presenting, together with lower counts, a higher log time (Table 1).

According to Figure 1a, aerobic mesophiles already started to grow on day one in samples packaged in 100% N₂. In samples packed in 100% air and in 20/80 CO₂/N₂ aerobic mesophiles increased their growth rate after day 5. The same happened in samples packaged in 40/60 CO₂/N₂ and in 100% CO₂, on day 7. Samples packaged in 80/20 CO₂/N₂ showed as light growth of aerobic mesophiles after day 1, stabilizing at day 5, and growing again on day 9.

Figure 1b shows the growth curves of aerobic mesophiles in the inoculated samples. Due to the presence of *Y. enterocolitica*, the initial count of mesophiles was much higher than in control samples. For the same reason, in comparison with the control samples, counts reached higher values in less time in the inoculated samples, approximately 10⁹ cfu g⁻¹ at the end of the experience, except for MAP with 80/20 CO₂/N₂ and 40/60 CO₂/N₂ which achieved a maximum of 10⁸ cfu g⁻¹. The atmosphere with the 100% N₂ recorded the highest counts, with 6.6x10⁹ cfu g⁻¹ at day 19.

The six curves followed the same pattern, showing expressive growth already on day 1. Counts reached values of approximately 10⁸ cfu g⁻¹ on day 5 in MAP with 40/60 CO₂/N₂, 80/20 CO₂/N₂, and 100% CO₂, and on day 7 in 100% air and 100% N₂. MAP with 20/80 CO₂/N₂ presented

discrete growth until day 7 (10^6 cfu g^{-1}) and more expressive growth at day 10 (10^8 cfu g^{-1}).

Table 1 shows the growth parameters (lag-phase, log-phase and number of cells in the stationary phase) of aerobic mesophiles in the control and inoculated samples. In control samples, the log phase was longer in MAP with 40/60 CO_2/N_2 and 80/20 CO_2/N_2 which also presented lower doubling time and achieved lower counts in the stationary phase.

Table 1 Growth parameters of aerobic mesophiles in the control and inoculated samples packed in 100% air and in different MAP, stored at $4\pm 1^\circ C$.

Atmosphere	Parameter	Control	Inoculated
100% Air	Lag	4.3	0.3
	Log	13.7	11.0
	NC	8.7	8.5
100% N_2	Lag	0.4	1.5
	Log	11.1	9.3
	NC	9.0	8.6
20/80 CO_2/N_2	Lag	4.3	0.5
	Log	6.6	25.5
	NC	9.0	9.2
40/60 CO_2/N_2	Lag	4.6	0.0
	Log	22.9	10.1
	NC	8.2	8.8
80/20 CO_2/N_2	Lag	0.0	0.3
	Log	44.7	11.5
	NC	7.4	8.8
100% CO_2	Lag	6.2	0.0
	Log	16.0	10.3
	NC	8.5	8.9

Lag – Lag-phase (days).

Log – Log-phase (hours).

NC – Number of cells in the stationary phase (log cfu g^{-1}).

In inoculated samples, MAP with 20/80 CO₂/N₂ showed the longest log-phase. But also the highest values in the stationary phase, opposite to what happened in the control samples. In the other five MAP tested, mesophiles presented similar log and lag phases (Table 1).

Figure 2 shows the growth curves of *Y. enterocolitica* in the inoculated samples in the six atmospheres tested. The initial count was 8.2×10^4 cfu g⁻¹. Inoculated samples packaged in 100% air and in MAP with 100% N₂ presented the highest counts, about 10⁷ cfu g⁻¹. The lowest counts of *Y. enterocolitica* were recorded in the MAP with 100% CO₂, decreasing its number from the initial values to 5.3×10^4 cfu g⁻¹, at day 19.

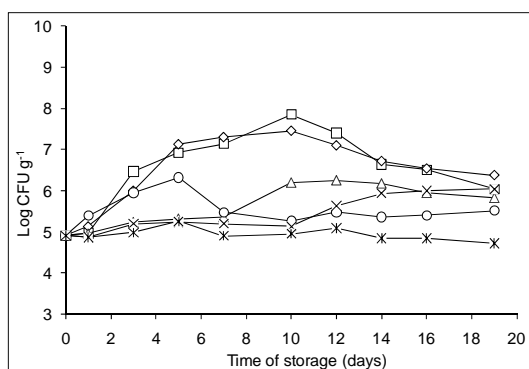


Fig. 2 *Y. enterocolitica* growth curves in the inoculated samples packaged in: (□) 100% air, (◇) 100% N₂, (△) 20/80 CO₂/N₂, (○) 40/60 CO₂/N₂, (×) 80/20 CO₂/N₂, and (*) 100% CO₂, stored at 4±1°C.

MAP with 100% CO₂ presented a very discrete growth during the whole experience, even registering the lowest counts at day 19. Growth was delayed in MAP with 80/20 CO₂/N₂ until day 12, reaching 10⁶ cfu g⁻¹ at day 14. In MAP with 40/60 CO₂/N₂ the maximum growth was observed on day

5 (10^6 cfu g^{-1}) and then a slight decrease was noticed remaining with counts around 10^5 cfu g^{-1} until the end of experiment. In MAP with 20/80 CO_2/N_2 a gradual growth of the pathogen was observed until day 12, reaching its highest value, and then decreasing its number until day 19. The most significant growth of *Y. enterocolitica* was observed in inoculated samples packaged in 100% air and in 100% N_2 . In both environments a gradual growth of *Y. enterocolitica* was verified, achieving the maximum values at day 10.

Table 2 shows the growth parameters of *Y. enterocolitica*. This microorganism presented the longest log-phase in MAP with 80/20 CO_2/N_2 . Negative log-phases were detected in MAP with 40/60 CO_2/N_2 and 100% CO_2 . The pathogen was not capable of growing in both environments. Its population decreased to lower values than the initial counts. *Y. enterocolitica* presented a shorter log-phase and higher counts in the stationary phase in 100% air and 100% N_2 .

Table 2 Growth parameters of *Yersinia enterocolitica* in the inoculated samples packaged in 100% air and in different MAP, stored at $4\pm 1^\circ\text{C}$.

Atmospheres	Parameter	<i>Y. enterocolitica</i>
100% Air	Lag	0.9
	Log	9.5
	NC	6.9
100% N₂	Lag	2.5
	Log	3.4
	NC	6.8
20/80 CO₂/N₂	Lag	2.3
	Log	50.7
	NC	6.1
40/60 CO₂/N₂	Lag	5.0
	Log	-497.6
	NC	4.9
80/20 CO₂/N₂	Lag	1.2
	Log	108.5
	NC	6.0
100% CO₂	Lag	12.0
	Log	-117.5
	NC	4.7

Lag – Lag-phase (days).

Log – Log-phase (hours).

NC – Number of cells on stationary phase ($\log \text{cfu g}^{-1}$).

4. Discussion

The growth pattern of aerobic mesophiles observed in the control samples packaged in 100% air and in 100% N₂ (Figure 1a), agrees with the one described by Kakouri and Nychas [23], who also found higher counts in shorter time in packages with 100% N₂ than in samples packaged in 100% air. On the contrary, Mano et al. [24] observed in turkey meat, stored at 7°C, higher counts in samples packaged with 100% air. However, these

differences could be attributed to the storage temperature and the product studied.

Aerobic mesophiles took 16 days to reach 10^7 cfu g⁻¹ in packages with 100% CO₂ in Figure 1a. However, Kakouri and Nychas [23], Hudson et al. [25], and Bell et al. [26] found that aerobic mesophiles needed approximately 10 days to achieve these counts in the same atmosphere in different products, i.e. poultry meat, smoked cod, and red meat, respectively. It stands to reason that the pH of poultry sausage is lower than that of poultry meat itself. The sausage tested in this experiment presented pH 5.9, on day 0, which could have contributed to delay the bacterial growth. Furthermore, poultry sausage contains salt and condiments that can also contribute for retardation and/or the inhibition of microbial growth. The initial counts found by the above mentioned authors were higher than we observed in the present work (Figure 1a – 4.4×10^3 cfu g⁻¹ mesophiles) but the storage temperatures were also different. Both factors certainly influenced the disparity of results found by the different authors.

Zeitoun et al. [27] detected 2.5×10^7 cfu cm⁻² of mesophiles around day 6, in poultry meat samples packaged in MAP with 90/10 CO₂/O₂. According to Figure 1a, aerobic mesophiles grew slower under 80/20 CO₂/N₂. The different behavior observed can be explained by the use of O₂ combined with CO₂ instead of N₂. It stands to reason that O₂ favors the growth of aerobic bacteria. Moreover, N₂ does not have the same effect [28].

The inoculated samples showed high initial counts of mesophiles, which could have interfered on the bacteriostatic effect of CO₂. The same was observed by Sarantópoulos et al. [29]. In addition to this, the growth curves of aerobic mesophiles in the inoculated samples packaged in modified atmospheres reached higher values in shorter time in comparison with the control samples (Figures 1a and 1b), and presented pretty short lag and log phases (Table 1).

Y. enterocolitica did not grow in the samples packaged in MAP with 100% CO₂, and even reduced its population. The same was observed by Hudson et al. [25], Bell et al. [26], Doherty et al. [30], Bodnaruk and Draughon [31] and Tassou et al. [32]. These authors assayed different products and storage temperatures, which can confirm the bacteriostatic effect of 100% CO₂ on the pathogen *Y. enterocolitica*.

In the inoculated samples packaged in 100% air and in 100% N₂, *Y. enterocolitica* increased its population up to three logarithmic cycles. Shenoy and Murano [33] also detected the growth of this organism in chopped pork meat packaged in air and stored at 4°C. Doherty et al. [30] detected growth of *Y. enterocolitica* in lamb meat packaged in 100% air, and stored at 0°C and 5°C. Wei et al. [34] also verified the growth of the pathogen in poultry meat packaged in 100% air. Thus *Y. enterocolitica* is capable of growing in 100% air and in MAP with 100% N₂, when stored at 4±1°C.

Although *Y. enterocolitica* can grow in MAP with 20/80 CO₂/N₂, its growth can be strongly influenced by the storage temperature. In the present study *Y. enterocolitica* reached counts up to 10⁶ cfu g⁻¹ in this atmosphere. Manu-Tawiah et al. [35] also detected growth in chopped pork meat, using the same MAP and temperature, with counts up to 10⁷ cfu cm⁻². However, Van Den Elzen et al. [36] observed a very discrete growth of this pathogen in pork meat, in MAP with 25/65/10 CO₂/O₂/N₂, stored in 3°C, with counts only up to one logarithmic cycle above the initial count. The association of CO₂ and O₂ tends to inhibit the growth of this pathogen, which can explain the differences between the results described above.

In 40/60 CO₂/N₂, *Y. enterocolitica* counts slightly increased until day 5, decreasing afterwards. In addition, it can be observed in Table 2 that the pathogen was not capable of growing. During the stationary phase it decreased in comparison with the initial counts. However, Doherty et al. [30] and Shenoy and Murano [33] detected *Y. enterocolitica* growth in MAP with 50/50 CO₂/N₂. The different gas concentrations, MAP with 50/50 CO₂/N₂ and 40/60 CO₂/N₂, and the different product (pork meat) used in the experiments might explain the disparity of results.

Hudson et al. [25] stated that to inhibit the growth of psychrotrophic pathogens it is necessary an atmosphere with more than 75% CO₂ and total absence of O₂. In the presence of O₂, higher concentrations of CO₂ are necessary. The effect of MAP with O₂ on the growth of *Y. enterocolitica*

was not studied in the present work. The results exposed on Figure and Table 2 show that the pathogen was able to grow in MAP with 80/20 CO₂/N₂, which does not agree with Hudson et al. [25]. Nevertheless, it was a discrete growth, presenting a pretty long log-phase (108.5 hours) compared to the growth in samples packaged in 100% air (9.5 hours). These observations confirm the bacteriostatic effect of CO₂.

The influence of competitive microbial population was evidenced by the growth of aerobic mesophiles, which presented much higher counts when compared to *Y. enterocolitica*, during the 19 days of experiment in all the inoculated samples and MAP tested (Tables 1 and 2).

The infective dose of *Y. enterocolitica* in food is still unknown [37]. However, Bhaduri and Turner-Jones [38] stated that the virulent characteristics of this microorganism remain the same, even in anaerobiosis and in mixtures of CO₂ and other gases, being able to cause foodborne disease. The study of *Y. enterocolitica* in MAP food becomes significant to public health, provided that this pathogen can be present in food and is able to grow in those conditions, even in low levels.

5. Conclusions

According to this research, it can be concluded that MAP with 80/20 CO₂/N₂ is the best choice for fresh poultry sausage. This atmosphere controlled the growth of aerobic mesophiles. In those conditions,

mesophiles showed a low growth rate and moderate counts. This MAP was also capable of inhibiting *Yersinia enterocolitica*, although other factors can influence its development. Therefore, it can be concluded that MAP itself is not able to eliminate this pathogen in fresh poultry sausage. However, it can collaborate, sometimes precisely, by controlling its development, avoiding its growth and even reducing its population.

Packaging in 100% air and in 100% N₂ should not be used for fresh poultry sausage. Moreover, it enhances the rapid growth of not only the natural microbiota, but also of *Y. enterocolitica*, being able to reach high counts and thus, representing a serious risk for public health.

Further research on the pathogen *Y. enterocolitica* and its behavior in different MAP is still necessary for the development of packaging of different animal origin products. It is likely that the effectiveness of the technique shall be optimized so that ideal concentrations of gases in MAP can be established for each type of product.

Acknowledgements This work was supported by the 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)'. The CAPES of the Brazil Government grants author B.T. Macedo. We are grateful to David Bailey for English critical reading of this manuscript.

References

- [1] Rust RE. Productos embutidos. In: Price JF, Schweigert BS, eds. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Zaragoza: Acribia Press; 1994:415-439.
- [2] Lopes MM, Silva LP, Conte-Junior CA, Teodoro AJ, Mano SB, Freitas MQ, Franco RM, Pardi HS. Aspectos bacteriológicos e físico-químicos da lingüiça fresca de frango. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 2007;102:331-338.
- [3] Associação Brasileira dos Exportadores de Frango. The ABEF page. Available at: <http://www.abef.com.br/estatisticas>. 08. Accessed May 26, 2010.
- [4] Madava R, Hoogenkamp H. The role of processed products in the poultry meat industry. In: Richardson IR, Mead GG, eds. *Poultry Meat Science*. Wallingford: CABI Publishing; 1999:396-410.
- [5] Silva LP, Lopes MM, Mano SB, Mársico ET, Conte-Junior CA, Teodoro AJ, Guedes WS. Influência da adição de polifosfato em lingüiça de frango. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 2008;15:50-55.
- [6] Mano SB, García de Fernando GD, López-Gálvez D, Selgas MD, García ML, Cambero MI, Ordoñez JA. Growth/survival of natural flora and *Listeria monocytogenes* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged under modified atmosphere. *J. Food Safety*. 1995;15:305-319.
- [7] García de Fernando GD, Nychas GJE, Peck MW, Ordóñez JA. Growth/survival of psychrotrophic pathogens on meat packaged under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*. 1995;28:221-231.
- [8] Conte-Junior CA, Fernández M, Mano SB. Use of carbon dioxide to control the microbial spoilage of bullfrog (*Rana catesbeiana*) meat. In: Mendez-Vilas A, ed. *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and their Interactions*. Weinheim: Wiley-VCH; 2006:356-361.

- [9] Sarantópoulos CIGL, Alves RMV, Contreras CJC, Galvão MTEL, Gomes TC. Use of a modified atmosphere masterpack for extending the shelf life of chicken cuts. *Packaging Technology and Science*. 1998;11:217-229.
- [10] Mano SB, Ordóñez JA, Garcia de Fernando GD. Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres. *Food Microbiology*. 2000;17:657-669.
- [11] Church N. Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies. *Trends in Food Science & Technology*. 1994;5:345-352.
- [12] Phillips CA. Review: modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science and Technology*. 1996;31:463-479.
- [13] Woods LFJ, Church P N. Strategies for extending the shelf-life of poultry meat and products. In: Richardson IR, Mead GG, eds. *Poultry Meat Science*. Wallingford: CABI Publishing; 1999:297-310.
- [14] Nortjé GL, Vorster SM, Greebe RP, Steyn PL. Occurrence of *Bacillus cereus* and *Yersinia enterocolitica* in South Africa retail meats. *Food Microbiology*. 1999;16:213-217.
- [15] Tompkin RB, Mcnamara AM, Acuff GR. Meat and poultry products. In: Downes FP, Ito K, eds. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: American Public Health Association; 2001:421-428.
- [16] Bourgeois C. Conservación en atmosferas modificadas. In: Bourgeois MC, Mescle FJ, Zucca J, eds. *Microbiología alimentaria aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*. Zaragoza: Acribia; 1994:409-421.
- [17] Dromigny E. *Campylobacter, Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica*. In: Bourgeois MC, Mescle FJ, Zucca J, eds. *Microbiología alimentaria aspectos*

- microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*. Zaragoza: Acribia Press. 1994:113-129.
- [18] Center for Disease Control and Prevention. The CDC page. *Yersinia enterocolitica*. Available at: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/yersinia_g.htm. Accessed May 27, 2010.
- [19] United States Food & Drug Administration. The FDA page. *Yersinia enterocolitica*. In: *Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook*. Available at: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070040.htm>. Accessed May 27, 2010.
- [20] Krieg NR, Holt JG. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Baltimore, Md: Williams and Wilkins; 1984.
- [21] Vanderzant C, Splittstoesser DF. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3rd ed. Washington, Md: American Public Health Association; 1992.
- [22] Baranyi J, Roberts TA. A dynamic to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*. 1994;23:277-294.
- [23] Kakouri A, Nychas GJE. Storage of poultry meat under modified atmospheres or vacuum packs: possible role of microbial metabolites as indicator of spoilage. *Journal of Applied Bacteriology*. 1994;76:163-172.
- [24] Mano SB, Ordóñez JA, Fernando, GDG. Aumento de la vida útil y microbiología de la carne de pavo envasada en atmósferas modificadas. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 1999;6:55-65.

- [25] Hudson AJ, Mott SJ, Penney N. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. *Journal of Food Protection*. 1994;57:204-208.
- [26] Bell GR, Penney N, Moorhead SM. Growth of the psychrotrophic pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, and *Yersinia enterocolitica* on smoked blue cod (*Parapercis colias*) packed under vacuum or carbon dioxide. *International Journal of Food Science and Technology*. 1995;30:515-521.
- [27] Zeitoun AAM, Debevere JM, Mossel DAA. Significance of Enterobacteriaceae as index organisms for hygiene on fresh poultry, poultry treated with lactic acid and poultry stored in modified atmosphere. *Food Microbiology*. 1994;11:169-176.
- [28] Guynot ME, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ. Modified atmosphere packaging of mold spoilage of bakery products with different pH and water activity levels. *Journal of Food Protection*. 2003;66:1864-1872.
- [29] Sarantópoulos CIGL, Alves RMV, Oliveira LM, Gomes TC. *Embalagens com atmosfera modificada*. 2nd ed. Campinas, Md: CETEA/ITAL Press; 1998.
- [30] Doherty A, Sheridan JJ, Allen P, Mcdowell DA, Blair YS, Harrington D. Growth of *Yersinia enterocolitica* O:3 on modified atmosphere packaged lamb. *Food Microbiology*. 1995;12:251-257.
- [31] Bodnaruk PW, Draughon, FA. Effect of packaging atmosphere and pH on the virulence and growth of *Yersinia enterocolitica* on pork stored at 4°C. *Food Microbiology*. 1998;15:129-136.
- [32] Tassou CC, Lambropoulou K, Nychas GJE. Effect of prestorage treatments and storage conditions on the survival of *Salmonella enteritidis* PT4 and *Listeria*

- monocytogenes* on fresh marine and freshwater aquaculture fish. *Journal of Food Protection*. 2004;67:193-198.
- [33] Shenoy K, Murano EA. Effect of storage conditions on growth of heat-stressed *Yersinia enterocolitica* in ground pork. *Journal of Food Protection*. 1996;59:365-369.
- [34] Wei QK, Fang TJ, Chen WC. Development and validation of growth model for *Yersinia enterocolitica* in cooked chicken meats packaged under various atmosphere packaging and stored at different temperatures. *Journal of Food Protection*. 2001;74:987-993.
- [35] Manu-Tawiah W, Myers DJ, Olson DG, Molins RA. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in pork chops packaged under modified gas atmospheres. *Journal of Food Science*. 1993;58:475-479.
- [36] Van den Elzen AMG, Houben JH, Snijders JMA. Effect of modified atmosphere packaging on the survival of pathogens on artificially contaminated pork. Proceedings of the 40th International Congress of Meat Science Technology. The Hague, Holland; 1994.
- [37] Long C, Jones TF, Vugia DJ, Scheftel J, Strockbine N, Ryan P, Shiferaw B, Tauxe RV, Gould LH. *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* infections, FoodNet, 1996–2007. *Emerging Infectious Diseases*. 2010;16:566-567.
- [38] Bhaduri S, Turner-Jones C. The effect of anaerobic atmospheres on the stability of the virulence-related characteristics in *Yersinia enterocolitica*. *Food Microbiology*, 1993;10:239-242.

3.4 INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DIÓXIDO DE CARBONO E OXIGÊNIO NA VALIDADE COMERCIAL DE CARNE MOÍDA BOVINA. Enviado para Pesquisa Veterinária Brasileira (Paper IV).

Influência das diferentes concentrações de dióxido de carbono e oxigênio na validade comercial de carne moída bovina¹

Carlos A. Conte Júnior^{2*}, Eliane Teixeira Mársico³, Renata Patrícia², Márcia M. Lopes²,
Eva Hierro⁴ e Sérgio B. Mano³

ABSTRACT.- Conte-Junior C.A., Mársico E.T., Patrícia R., Lopes M.M., Hierro E. & Mano S.B. 2011. [**Influence of different concentrations of carbon dioxide and oxygen in shelf life of ground beef.**] Influência das diferentes concentrações de dióxido de carbono e oxigênio na validade comercial de carne moída bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Tecnologia dos Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, Rio de Janeiro 24.230-340, Brasil. E-mail: mtaconte@vm.uff.br

The work had an objective to evaluate the effect of modified atmosphere packing of ground beef. The samples were divided in 8 batches, filled with either 1.5 L of air (100%), 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50 CO₂/O₂, 100% O₂ and vacuum and finally sealed. Samples were taken at different day's storage and gas concentration (O₂/CO₂), pH, filtration test and total volatile basis (TVB) were determinate; likewise, total viable mesophylic and psychrotrophic were counted. Bacterial growth parameters (lag phase and generation time) were assessed using Baranyi equations. In shelf life determination, it was taken 10⁷ UFC/g of mesophylic count limit. In relation to the gas concentration, as expected, a decrease of oxygen and an increase of carbon dioxide were observed. These results agree with another's authors, and it can be explained by the microbial and enzymatic activity. The results of pH, filtration time and TVB, in all studied modified atmospheres, were smaller than in 100% air stored samples. The lag phase and generation time of mesophylic microorganisms in MAP, was approximately 7.1 days and ~22 hours respectively. An increase of generation time of psychrotrophic micro flora of the samples stored in MAP (~22 hours) was observed when compared to ones in air (~10 hours). However, in lag phase, in all the studied atmospheres (~2.7 days), these increased was not verified. Shelf life of samples packaged in MAP presented an increase of approximately 2.5 times when compared to the ones packaged in air atmospheric. It may be concluded that, in physical-chemical and microbiologic view, MAP with O₂/CO₂ show to be an excellent conservation method to ground beef.

INDEX TERMS: Modified atmosphere packaging; food preservation; biochemical changes.

RESUMO.- O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da embalagem em atmosfera modificada na carne moída bovina. As amostras foram divididas em 8 lotes, embaladas com aproximadamente 1,5 L de ar (100%), 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50 CO₂/O₂, 100% O₂ e vácuo, sendo a continuação termo-seladas. Periodicamente, durante 22 dias de armazenamento, tomaram-se amostras determinando-se: percentual dos gases presentes nas embalagens (O₂/CO₂), pH, prova de filtração, bases voláteis totais (BVT) e contagens totais de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos e psicrófilos. Na determinação da validade comercial, foi levado em consideração o limite da contagem de mesófilos em 10⁷ UFC/g. Em relação à concentração de gases, observou-se uma redução do percentual de oxigênio ao longo do tempo, enquanto que o de dióxido de carbono elevou-se. Estes resultados podem ser explicados em função da atividade microbiana e enzimática. Os resultados de pH, tempo de filtração e bases voláteis totais, em todas as atmosferas modificadas estudadas, foram menores que nas armazenadas em 100% ar. Os microrganismos mesófilos, nas embalagens em atmosfera modificada apresentaram fases de latência de aproximadamente 7,1 dias e tempos de duplicação de aproximadamente 22 horas. Em relação aos tempos de duplicação da microbiota psicrotrófica das amostras armazenadas em MAP (~22 horas), observou-se um aumento quando comparados com os tempos observados em ar (~10 horas). Entretanto, não se verificaram alterações significativas, em todas as atmosferas estudadas, na fase de latência desta microbiota (~2,7 dias). A validade comercial das amostras embaladas em MAP apresentou um aumento de aproximadamente 2,5 vezes quando comparadas com as embalagens armazenadas em ar atmosférico. Pode-se concluir que, sob o ponto de vista físico-químico e microbiológico, as embalagens em atmosfera modificada com O₂/CO₂ são adequadas para conservação de carne moída bovina.

TERMO DE INDEXAÇÃO: Embalagem em atmosfera modificada; conservação de alimentos; alterações bioquímicas.

INTRODUÇÃO

O consumidor exerce uma influência crescente e seletiva ao preocupar-se com questões como: segurança dos alimentos, dieta, aditivos e embalagens, sendo cada vez mais exigentes com os produtos que consome, buscando qualidade, preço e facilidades (Parry 1993, Mano et al. 2000, Conte-Junior et al. 2006). Assim, com a mudança do ritmo de vida associado a crescente oferta de tecnologia das indústrias de carnes e derivados e visando a sobrevivência em um mercado em franco

desenvolvimento, as indústrias têm que se adequar cada vez mais aos anseios do consumidor, que deseja encontrar já preparado no mercado varejista, não só os cortes de carne, como também a carne moída que faz parte dos pratos mais requintados aos mais tradicionais (Kasnowski et al. 2008).

Na década de 90, as carnes resfriadas já dominavam 30% das vendas do mercado de embalagens em atmosfera modificada no Reino Unido (Church 1994). No Brasil, entretanto, o sistema de comercialização e distribuição de carne bovina ainda vem passando por importantes transformações às quais vêm alterando principalmente a estrutura de toda a cadeia produtiva e a conduta de seus agentes. Estudos realizados por Bliska (1997) demonstraram que essas transformações já vêm se consolidando desde a década passada, baseada na crescente demanda de carne embalada e desossada, oferecida para o consumidor através do sistema de auto-serviço nas gôndolas de supermercados. Por outro lado, a carne moída resfriada é um produto perecível, susceptível ao crescimento de microrganismos, principalmente bactérias, devido à alta atividade da água e composição química, sendo os principais fatores de deterioração da carne fresca o crescimento microbiano, a oxidação do pigmento do músculo (mioglobina) e a rancificação da gordura (Harrigan 1998, Pardi et al. 2001, Kasnowski et al. 2008).

Em função da crescente preocupação com a sanidade dos produtos cárneos, existe uma tendência no setor de alimentos de substituição dos métodos de preservação que alteram química e fisicamente os alimentos para métodos menos severos (Parry 1993, Mano et al. 1995, Conte-Junior et al. 2010). A resposta das indústrias de alimentos tem sido investir em novas tecnologias que satisfaçam esta demanda. Com isso, nos últimos anos observa-se uma tendência ao acondicionamento em atmosfera modificada, uma vez que esta técnica atende as exigências dos consumidores por alimentos frescos e de boa qualidade, com maior validade comercial, porém sem conservantes e aditivos (Mano et al. 1999, Conte-Junior et al. 2006, Malavota et al. 2006).

A embalagem em atmosfera modificada consiste na eliminação de todo ar da embalagem, substituindo-se por um gás ou mistura gasosa, de forma a alterar inicialmente a atmosfera gasosa em torno do produto (Mano et al. 2000). Durante as etapas seguintes de armazenamento e comercialização ocorre uma variação contínua dos gases utilizados na embalagem, devido atividades bioquímicas do produto embalado e das características de difusão dos gases através da embalagem (Brody 1996).

Acompanhando as tendências de mercado, as indústrias e pesquisadores têm despertado um grande interesse em avaliar o comportamento de diversos produtos

embalados em atmosfera modificada para obtenção de resultados tecnológicos e econômicos que auxiliem na sua aplicação (Sarantópoulos 1998, Lopes et al. 2004, Salgado et al. 2006; Conte-Junior et al. 2010). O acondicionamento de um alimento em atmosfera modificada representa sem dúvida uma importante forma de embalar vários produtos alimentícios, pois apresenta como principal vantagem o prolongamento da validade comercial destes produtos (Oliveira 1998).

Em vista do apreciado, visando a melhoria das condições tecnológicas e higiênicas, e, buscando um favorecimento na logística e comercialização desse produto, o trabalho tem como objetivo geral determinar a influência de diferentes concentrações dos gases oxigênio e dióxido de carbono (CO_2 e O_2), na validade comercial da carne moída de bovino resfriada embalada em atmosfera modificada.

MATERIAL E MÉTODOS

A carne resfriada de bovino com osso (dianteiro), proveniente de matadouro frigorífico com Inspeção Federal foi recebida em um entreposto de carnes e derivados também sob inspeção federal no município de São João de Meriti, Rio de Janeiro. A carne foi desossada em seção climatizada a 12°C no mesmo dia do abate, onde foi realizada toaleta para a retirada do excesso de gordura, aponeuroses, ligamentos, tendões e linfonodos em cima de mesas com polietileno. Os cortes de carne paleta e acém foram embalados a vácuo e, no mesmo dia, foram encaminhados para a seção de moagem mantida a 5°C .

Preparo das amostras

Na seção de produção de carne moída, a matéria-prima, com uma temperatura de $6,2^\circ\text{C}$, foi colocada sobre uma mesa de aço inoxidável que está acoplada à um transportador com uma esteira de borracha que alimenta o moedor. No trajeto pela esteira, a carne passou por um detector de metal. A primeira moagem foi feita com disco de 13 mm, em um moedor de aço inoxidável com capacidade de 9000 Kg/h. Após a moagem, o produto foi transportado através de um transportador helicoidal em aço inoxidável com 300 mm de diâmetro, 4,26 m de comprimento e 35° de inclinação, para o homogeneizador. Em seguida, o produto foi homogeneizado 1 minuto, seguido de mais 3 minutos nos quais o operador da máquina através do painel de controle ativou a injeção de neve carbônica na massa por bicos injetores instalados no fundo do equipamento reduzindo a temperatura a $-0,7^\circ\text{C}$, primando pela qualidade e segurança microbiológica do produto. Por fim, mais 1 minuto concluindo a homogeneização. Ao final da homogeneização, o produto foi transferido por intermédio de um transportador helicoidal para o silo de fluxo constante em aço inoxidável com

volume de 1275 litros. Em seguida, foi realizada a segunda moagem com função de reduzir o diâmetro do produto de 13 mm para 3,2 mm com capacidade para moer 1800 Kg/h. Este moedor em aço inoxidável tem acoplado junto a sua extrusão um sistema de eliminação de ossos, cartilagens e nervos, sendo estes resíduos depositados em um recipiente para posterior remoção e expedição. A carne homogeneizada foi porcionada em tabletes de 800 gramas nas bandejas seguindo sobre esteiras de frequência variável, sendo pesada em balança eletrônica dinâmica e seqüencial, a fim de verificar conformidade do peso.

Embalagem em atmosfera modificada

Após acondicionamento da carne homogeneizada nas bandejas, o transportador automático de bandejas posicionou-as lado a lado na máquina termo-seladora, para injeção de gases de acordo com a concentração de oxigênio e dióxido de carbono de cada tratamento: T1 (100% ar atmosférico), T2 (90/10 O₂/CO₂), T3 (80/20 O₂/CO₂), T4 (70/30 O₂/CO₂), T5 (60/40 O₂/CO₂), T6 (50/50 O₂/CO₂), T7 (100% O₂) e T8 (vácuo). Uma vez embaladas as bandejas contendo as amostras, foram depositadas e identificadas manualmente com etiqueta numerada em caixas plásticas vazadas. A temperatura final da carne embalada foi de 3 a 6°C. Sendo esta temperatura verificada por amostragem do produto, fazendo-se uso de termômetro digital. As caixas plásticas foram então encaminhadas imediatamente para a câmara fria de armazenagem com temperatura média de 2±2°C.

Análise dos gases

Da câmara fria do entreposto de carnes e derivados, as amostras foram colocadas em caixas isotérmicas com frascos de gel congelado, para manter constante a temperatura das amostras durante o trajeto do entreposto de carnes e derivados até os laboratórios.

O percentual dos gases contido em cada bandeja de cada tratamento foi detectado através do analisador de gases (Witt O₂/CO₂), onde, penetrou-se uma agulha através de uma pastilha adesiva de borracha para não haver troca de gases da bandeja com o ar e ativou-se a bomba de vácuo.

Análises físico-químicas

Os sacos de homogeneização contendo 25 g de amostra diluídos em SSP, após as análises microbiológicas foram encaminhados para o Laboratório de Controle Físico-químico onde foi determinado o potencial hidrogeniônico (pH), utilizando-se o método ponteciométrico (Conte-Junior et al., 2006).

Na Prova de Filtração, obteve-se os resultados cronometrando o tempo de filtração de 10 g de cada amostra homogeneizadas em 100 mL de água destilada recente e filtragem em papel filtro Whatman nº40.

A Determinação de bases voláteis totais (BVT) foi realizada pelo método de microdifusão (Brasil 1981).

Análises microbiológicas

A contagem das bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas foi determinada por semeadura em profundidade (Conte-Junior et al. 2006). Para a realização da contagem em placa utilizou-se a técnica "Spread Plate", ou espalhamento (Swanson et al. 1992). Os resultados foram expressos em unidade formadora de colônias (UFC) por grama de amostra. Na contagem de bactérias heterotróficas aeróbias psicrófilas o procedimento para preparação das diluições e contagem das colônias foi semelhante, porém a incubação foi feita em geladeira a 10°C durante 7 dias consecutivos.

Tratamento estatístico

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente pelo método dos mínimos quadrados para obtenção de uma regressão linear, utilizando-se a equação de Baranyi e Roberts (1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variações na composição dos gases durante os 22 dias de armazenamento são observadas na Figura 1. O percentual de oxigênio reduziu-se ao longo do tempo e o percentual de dióxido de carbono elevou-se, este fato certamente aconteceu, principalmente, devido à atividade microbiana, atividade bioquímica da carne e permeabilidade do plástico (Mano et al. 2002).

Nos tratamentos T2, T3, T4 e T7 os percentuais de gases cruzaram-se no gráfico no 14º dia, com percentual médio de aproximadamente 46% cada um, concluindo no 22º dia, com concentrações de 30, 15, 30, 15% de oxigênio e de 65, 69, 65 e 70% de dióxido de carbono, respectivamente, apresentando assim curvas de concentração bastante semelhantes. Resultados que confirmam, de acordo com Parry (1993), que o nível de oxigênio pode diminuir numa embalagem em atmosfera modificada como resultado do metabolismo da carne e dos microrganismos, como pela difusão gasosa da embalagem.

Nos tratamentos onde foram usados menores níveis de oxigênio pode-se observar comportamentos análogos, como nos tratamentos T5 e T6 nos quais os percentuais de gases cruzaram-se, no gráfico, aproximadamente no 12º dia, com percentual médio de 47% cada um, concluindo no 22º dia, com concentrações de 0% de oxigênio, nos

dois tratamentos, e de 70 e 80% de dióxido de carbono, respectivamente. A taxa de concentração final de 0% de oxigênio é consequência dos baixos níveis iniciais do gás, nos dois tratamentos (T5 e T6).

As variações que ocorreram nas concentrações dos gases começaram, de modo significativo, a partir do 10º dia, isso provavelmente devido às elevadas contagens (Parry et al. 1993). Paparella e colaboradores (1994) também observaram um aumento do CO₂ e uma diminuição do O₂ em amostras de carne moída de bovino embalada em atmosfera com 40% de CO₂. Estes resultados demonstram que quando esta matriz alimentar é submetida a esta tecnologia, existe, ainda que em menor grau, um possível desenvolvimento de bactérias aeróbicas.

A literatura é escassa com relação ao estudo das variações da composição dos gases durante o armazenamento de carne em atmosfera modificada. Apesar disso, outro estudo também evidenciou diminuição de O₂ e um aumento de CO₂ durante o armazenamento a 4°C de carne suína cozida embalada em aerobiose, observando também uma diminuição do O₂ nas amostras embaladas em atmosfera modificada (Fang & Lin 1994).

Análises Físico-químicas

Como pode-se observar na Figura 2 as amostras no dia 0 (zero) apresentaram o pH 6,04. A amostra T1 apresentou o pH 6,22 no 7º dia de armazenagem. As amostras T2, T3, T4, T5, T6, T7 e T8 tiveram os valores do pH oscilando entre de 6,12 a 5,56, verificando que houve uma redução no pH das amostras ao final dos 22 dias de armazenagem. Segundo Fernando (1995), em amostra de carne com média de pH 5,5 e em temperatura de armazenagem baixa (1°C) o crescimento dos microrganismos patogênicos psicotróficos diminuem significativamente se a concentração de CO₂ for superior a 40%. Contudo, quando o pH for superior a 6,0 ou houver uma irregularidade na temperatura de armazenagem, esses microrganismos e outros não patogênicos podem crescer, sendo assim a armazenagem da carne bovina em atmosferas enriquecidas com o CO₂ é influenciada sensivelmente pelo pH e vice-versa. Segundo o Riispoa (Brasil 2008), o pH da carne atinge seu limite no valor de 6,4, quando segundo o mesmo regulamento este produto deve ser direcionado para o consumo imediato. Tomando como referência este valor, podemos observar que no presente estudo as amostras T1 alcançaram este valor em aproximadamente 8 dias. Os outros tratamentos apresentaram diminuição de pH. Alguns autores (McMullen & Stiles 1991; Daniels et al. 1995, Conte-Junior et al. 2006) tem observado diminuição de pH como consequência da solubilidade de CO₂ nos alimentos, enquanto outros não observam esta mesma tendência (Sheridan et al. 1995, Doherty et al. 1996, Avery et

al. 1995, Mano et al. 2000). Isto pode ser explicado devido a capacidade tampão que alguns componentes alimentares apresentam e sua eficiência na presença do CO₂ em solução.

A carne ao ser moída tem sua estrutura morfológica alterada, aumentando sua superfície de exposição e, conseqüentemente, propiciando uma deterioração mais rápida do que no produto íntegro (Kasnowski et al. 2008). Na Figura 3 pode-se observar que a amostra embalada a ar apresentou resultado diferente das demais amostras embaladas em atmosfera modificada, apresentando tempos de filtração elevados antes de 8 dias de estocagem sob refrigeração. A perda de capacidade de retenção de água é observada em produtos cárneos em estado de deteriora (Pardi et al. 2001). Os tratamentos com dióxido de carbono apresentaram tempos de filtração reduzidos quando comparados ao tratamento T1 durante o período de estocagem.

As amostras apresentaram o resultado de 10,7 mg N/ 100g no dia 0 (zero) de análise caracterizando-se dentro do padrão para carne fresca (Figura 4). As Bases Voláteis Totais (BVT) são compostos nitrogenados, como a Trimetilamina (TMA) e amônia, produzidos durante o processo de deterioração (Pereira et al. 2001). Embora os níveis estabelecidos para BVT pela legislação nacional (Brasil 2008) façam referência ao pescado, principalmente os peixes marinhos devido a TMA, este parâmetro também pode ser utilizado para outras matrizes alimentares desde que seus valores sejam revistos para cada produto. A amostra T1 apresentou resultado de 17,8 mg N/ 100g no 6º dia de armazenagem já caracterizado fora dos níveis aceitáveis. As amostras T2, T3, T4, T5, T6, T7 e T8, segundo a Figura 16, demonstraram comportamento semelhante, apresentando níveis aceitáveis das BVT até o 16º dia de armazenagem. Desta forma, a análise de BVT mostrou ser uma prova eficaz para caracterizar a validade comercial da carne bovina moída bovina, ainda que mais estudos devam ser realizados de forma a estabelecer valores de referência para este e outros produtos cárneos.

Análises Microbiológicas

De acordo com a Figura 5, as bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (BHAM) apresentaram contagem inicial de 6,5 log UFC/g. Estas contagens iniciais altas refletem as péssimas condições de manipulação das amostras, e ainda, do perigo relativo ao produto que possui uma grande superfície de contato, aumentando o risco de contaminação. No T1, no 3º dia de experimento, apresentou contagens de 7,0 log UFC/g, a qual caracterizava a amostra como imprópria para consumo segundo vários autores (Dainty 1986; Frazier 1993, Harrigan 1998, Jay 1994, Lambert 1991). As curvas de crescimento do mesmo grupo de bactérias no T2, T3, T4 e T5 foram bem

semelhantes, atingindo valores acima de 7,0 log UFC/g respectivamente no 6º, 8º, 7º e 7º dia de armazenamento. No tratamento T6 pode-se observar o efeito do dióxido de carbono no retardo do crescimento bacteriano (Daniels et al. 1995), nesta mistura a contagem de 7,0 log UFC/g, só foi atingida no 10º dia. No tratamento T7 observa-se também a inibição do crescimento microbiano devido à elevada concentração de oxigênio, segundo Parry (1993), os microrganismos têm um nível ideal de oxigênio para o crescimento, em torno de 21%. O T8 apresentou resultado de impróprio para consumo a partir do 12º dia de armazenagem, discordando de Emswiler et al. (1976) que atingiu contagem de 7,0 log UFC/g no 18º dia de acondicionamento, isso provavelmente devido a temperatura de armazenagem que foi de $-1,7 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$.

Na Figura 6, verificou-se que as bactérias heterotróficas aeróbias psicrófilas (BHAP) apresentaram contagem inicial de 5,5 log UFC/g. No 5º dia de experimento, o T1, apresentou contagem de 7,1 log UFC/g, a qual caracterizou a amostra como imprópria para consumo. A curva de crescimento do mesmo grupo de bactérias no T2 demonstrou que a amostra atingiu a contagem de 7,5 log UFC/g no 7º dia. As amostras T3, T4, T5, T6 e T7 se comportaram de forma bem semelhante, atingindo o valor superior a 7,0 log UFC/g respectivamente no 9º, 8º, 9º, 9º e 8º dia de armazenagem. O T8 apresentou o melhor resultado atingindo a contagem de 7,0 log UFC/g no 11º dia de armazenagem. Estes resultados demonstram, como mostrado por Conte-Junior e colaboradores (2006), que o dióxido de carbono exerce efeito tanto contra bactérias mesófilas quanto psicrotólicas.

Comparando a Figura 7a e 7b, e a Tabela 1, as amostras embaladas em 100% ar atmosférico apresentaram uma vida útil de 11 dias, como o esperado, apresentando fase de latência de 2,88 dias, tempo de duplicação de 17,3 horas, atingindo uma contagem ao final do 33º dia do experimento de $\sim 10^9$ UFC/g. As amostras embaladas em 100% CO_2 e 100% N_2 , apresentaram um comportamento muito semelhante: validade comercial de 20 dias, fase de latência ~ 9 dias, tempo de duplicação de $\sim 21,5$ horas e fase estacionária 10^7 UFC/g. As amostras embaladas em 20% CO_2 / 80% N_2 , 40% CO_2 / 60% N_2 e 80% CO_2 / 20% N_2 foram as que apresentaram o melhor comportamento: fase de latência ~ 13 dias, tempo de duplicação de ~ 40 horas, exceto nas amostras com 80% CO_2 / 20% N_2 , cujo tempo de duplicação foi bastante curto (8,1 horas), apesar de terem atingido ao término do 33º dia de experimento, uma contagem total de 10^5 UFC/g, que sob o ponto de vista microbiológico, produto ainda próprio para consumo.

CONCLUSÃO

Em relação à concentração de gases, pode-se concluir que em todas as atmosferas modificadas ocorreu redução do percentual de oxigênio ao longo do tempo, enquanto que o de dióxido de carbono elevou-se. Os resultados de pH, tempo de filtração e bases voláteis totais, em todas as atmosferas modificadas estudadas, foram menores que nas armazenadas em 100% ar durante o tempo de estudo.

Por outro lado, os microrganismos mesófilos e psicrótróficos, nas embalagens em atmosfera modificada, de uma maneira geral, apresentaram redução nas suas taxas de crescimento quando comparadas ao tratamento T1. A validade comercial das amostras embaladas em MAP apresentou um aumento de aproximadamente 2,5 vezes quando comparadas com as embalagens armazenadas em ar atmosférico. De forma geral, pode-se concluir que, sob o ponto de vista físico-químico, sensorial e microbiológico, as embalagens em atmosfera modificada com O₂/CO₂ mostraram ser um excelente método de conservação de carne moída bovina.

Agradecimentos.- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio aos projetos E-26/111.610/2010 e E-26/110.816/2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avery S.M., Rogers A.R. & Bell G. 1995. Continued inhibitory effect of carbon dioxide packaging on *Listeria monocytogenes* and other microorganisms on normal pH beef during abusive retail display. *Int. J. Food Sci. Technol* 30:725-735.
- Baranyi J. & Roberts T.A. 1994. A dynamic to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*,
- Bliska F.M. 1997. *Perspectivas de Demanda para o Mercado de Carne Embalada*, Seminário e Workshop do Centro de Tecnologia de Carne. ITAL – Campinas.
- Brasil. 1981. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Laboratório Nacional de Referência Animal - Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. Brasília.
- Brasil. 2008. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, aprovado pelo Decreto nº

30.691 de 29/03/52, alterado pelos Decretos nº 1.255 de 25/06/62, 1.236 de 02/09/94, 1.812 de 08/02/96 e nº 2.244 de 04/06/97. Brasília.

- Brody A.L. 1996. Envasado de Alimentos en Atmósferas controladas, modificadas y a vacío. Acribia, Zarayaza, p.12-13.
- Church N. 1994. Developments in Modified-Atmosphere Packing and Related Technologies. Trends in Food Science & Technology, 5:345
- Conte-Junior C.A., Macedo B.T., Lopes M.M., Franco R.M., Freitas M.Q., Fernández M., Mano S.B. 2010. Effect of modified atmosphere packaging on the growth/survival of *Yersinia enterocolitica* and natural flora on fresh poultry sausage, p.1217-1223. In: Méndez-Vilas A. (Ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Formatex Books, Badajoz.
- Conte-Junior C.A., Fernández M., Mano S.B. 2006. Use of carbon dioxide to control the microbial spoilage of bullfrog (*Rana catesbeiana*) meat, p.356-361. In: Mendez-Vilas A. (Ed.) Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and their Interactions. Wiley-VCH, Weinheim.
- Dainty R.H. 1986. Chemical changes associated with microbial growth on meat stored at chill temperatures. Proc. 32^o Eur. Meet Meat Res. Work., Ghent, Bélgica, p.171-186.
- Daniels J.A., Krishnamurthi R. & Rizvi S.S.H. 1995. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. J. Food Prot. 48:532-537.
- Doherty A., Sheridan J.J., Allen P., McDowell D.A., Blair I.S. & Harrington D. 1996. Survival and growth of *Aeromonas hydrophila* on modified atmosphere packaged normal and high pH lamb. Int. J. Food Microbiol. 28:379-392.
- Emswiler B.S., Pierson C.J. & Kotula A.W. 1976. Bacteriological quality and shelf life of ground beef. Appl. Environ. Microbiol. 31:826-830.
- Fang T.J. & Lin L.W. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on cooked pork in a modified atmosphere packaging/nisin combination system. J. Food Prot. 57:479-485.
- Fernando G.D.G., Nychas G.J.E., Peck N.W., Ordóñez J.A. 1995. Growth/survival of psychrotrophic pathogens on meat packaged under modified atmosphere. Int. J. Food Microbiol. 28:221-229.
- Frazier W.C. et al. 1993. *Microbiología de los Alimentos*, Zarayaza, Acribia, 4^aed, 537-

546p.

Harrigan W.F., *Laboratory Methods in Food Microbiology*, Academic Press, 3^o ed., 1998, 121-219p.

Jay J.M., *Microbiología Moderna de los Alimentos*, Zarayaza, Acribia, 3^aed, 1994, 289-309p.

Kasnowski M.C., Franco R.M., Oliveira L.A.T., Valente A.M., Carvalho J.C.A.P. & Conte-Junior C.A. 2008. Detección, caracterización, estudio serológico y antibiograma de *Escherichia coli* aislada de muestras de carne de ternera entera y picada. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 9:2-11.

Lambert A.D., Smith J.P. & Dodds K. L. 1991. Shelf Life Extension And Microbiological Safety of Fresh Meat – A Review. *Food microbiology*. 8:267-290.

Lopes M.M., Mársico E.T., Sobreiro L.G., Silva L.P., Conte-Junior C.A., Pardi H.S. & Mano S.B. 2004. Efeito da embalagem em atmosfera modificada sobre a conservação de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 99:207-210.

Malavota L.C.M., Conte-Junior C.A., Lopes M.M., Souza V.G., Peixoto B.T.M., Stussi J.S.P., Pardi H.S. & Mano S.B. 2006. Análise micológica de lingüiça de frango embalada em atmosfera modificada. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 13:3-9.

Mano S.B., Ordóñez J.A. & García de Fernando G.D. 2002. Aumento da vida útil e microbiologia da carne suína embalada em atmosfera modificada. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 22:1-10.

Mano S.B., Ordóñez J.A. & García de Fernando G.D. 1999. Aumento de la vida útil y microbiología de la carne de pavo envasada en atmósferas modificadas. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 6:55-65.

Mano S.B., García de Fernando G.D., López-Gálvez D., Selgas M.D., García M.L., Cambero M.I. & Ordoñez J.A. 1995. Growth/survival of natural flora and *Listeria monocytogenes* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged under modified atmosphere. *J. Food Safety*. 15:305-319.

Mano S.B., Ordóñez J.A. & Garcia de Fernando G.D. 2000. Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres. *Food Microbiology*. 17:657-669.

- McMullen L.M. & Stiles M.E. 1991. Changes in microbial parameters and gas composition during modified atmosphere storage of fresh pork loin chops. *J. Food Prot.* 54:778-783.
- Oliveira L.M., Alves R.M.V., Cipolli K.B., Corrêa M.S. & Rodrigues L.A. *Efeito da Atmosfera Modificada sobre a Cor da Carne Bovina Moída e Acondicionada*. Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio de Janeiro, 1998.
- Paparella A., Ruocco G. & Barbieri B. 1994. Application of a rapid gas chromatographic method for assessing the shelf life of modified atmosphere packaged minced beef. *Industrie Alimentari.* 33:980-984.
- Pardi M.C., Santos F., Souza E.R & Pardi, H.S. *Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne*, Vol. 23 edição. Goiânia: UFG, 2001.
- Parry R.T. *Envasado de los Alimentos em Atmósfera Modificada*. A Madrid Vicente Ediciones, Madrid, Espanã, 1993.
- Pereira W.D., Athayde A.H. & Pinto K.P. 2001. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na Cidade de Maceió, Alagoas – AL. *Revista Higiene Alimentar*, v. 15, n. 84,
- Salgado R., Costa J.C.B., Conte-Junior C.A., Fernández M., Freitas M.Q., & Mano S.B. 2006. Efeitos da embalagem em atmosfera modificada sobre as alterações microbiológicas, químicas e sensoriais de pargo (*Pagrus pagrus*). *Revista Brasileira de Ciência Veterinária.* 13:94-97.
- Sarantópoulos C.I.G.L., et al. *Embalagens com Atmosfera Modificada*. Campinas, CETEA – ITAL, 1998.
- Sheridan J.J., Doherty A., Allen P., McDowell D.A., Blair Y.S. & Harrington D. 1995. Investigations on the growth of *Listeria monocytogenes* on lamb packaged under modified atmospheres. *Food Microbiol.* 12:259-266.
- Swanson K.M.J., Busta F.F., Peterson E.H. et al. Colony Count Methods. *In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. p. 75-95.

Legendas das Figuras

- Fig. 1. Percentual de variação diária da concentração de oxigênio (círculo não preenchido) e dióxido de carbono (quadrado preenchido) nas embalagens das amostras de carne moída resfriada de bovino embaladas em atmosfera modificada nos seguintes tratamentos: T2- 90/10 O₂/CO₂; T3- 80/20 O₂/CO₂; T4- 70/30 O₂/CO₂; T5- 60/40 O₂/CO₂; T6- 50/50 O₂/CO₂; T7- 100% O₂.
- Fig. 2. Avaliação diária da taxa de variação do pH nas amostras de carne moída resfriada de bovino embaladas em atmosfera modificada nos seguintes tratamentos: T1- ar atmosférico; T2- 90/10 O₂/CO₂; T3- 80/20 O₂/CO₂; T4- 70/30 O₂/CO₂; T5- 60/40 O₂/CO₂; T6- 50/50 O₂/CO₂; T7- 100% O₂, T8- vácuo.
- Fig. 3. Avaliação diária da taxa de filtração nas amostras de carne moída resfriada de bovino embaladas em atmosfera modificada nos seguintes tratamentos: T1- ar atmosférico; T2- 90/10 O₂/CO₂; T3- 80/20 O₂/CO₂; T4- 70/30 O₂/CO₂; T5- 60/40 O₂/CO₂; T6- 50/50 O₂/CO₂; T7- 100% O₂, T8- vácuo.
- Fig. 4. Avaliação diária da taxa de variação das bases voláteis totais expressa em mg de N-BVT/100g nas amostras de carne moída resfriada de bovino embaladas em atmosfera modificada nos seguintes tratamentos: T1- ar atmosférico; T2- 90/10 O₂/CO₂; T3- 80/20 O₂/CO₂; T4- 70/30 O₂/CO₂; T5- 60/40 O₂/CO₂; T6- 50/50 O₂/CO₂; T7- 100% O₂, T8- vácuo.
- Fig. 5. Curva de crescimento das bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas expressa em log UFC/ g nas amostras de carne moída resfriada de bovino embaladas em atmosfera modificada nos seguintes tratamentos: T1- ar atmosférico; T2- 90/10 O₂/CO₂; T3- 80/20 O₂/CO₂; T4- 70/30 O₂/CO₂; T5- 60/40 O₂/CO₂; T6- 50/50 O₂/CO₂; T7- 100% O₂, T8- vácuo.
- Fig. 6. Curva de crescimento das bactérias heterotróficas aeróbias psicrótroficas expressa em log UFC/g nas amostras de carne moída resfriada de bovino embaladas em atmosfera modificada nos seguintes tratamentos: T1- ar atmosférico; T2- 90/10 O₂/CO₂; T3- 80/20 O₂/CO₂; T4- 70/30 O₂/CO₂; T5- 60/40 O₂/CO₂; T6- 50/50 O₂/CO₂; T7- 100% O₂, T8- vácuo.

Fig. 7. Tempo de duplicação em horas (A) e tempo em dias da fase de latência (B) nos diferentes tratamentos. Barras brancas (mesófilos) e barras negras (psicrotróficos).

Os Quadros

Quadro 1: Parâmetro da vida útil (dias) das amostras de carne moída resfriada de bovino embaladas em atmosfera modificada avaliando a fase de latência (FL) expressa em log UFC/ g, tempo de duplicação (TD) expresso em horas e a Contagem na Fase Estacionária de Crescimento (FE) expressa em log UFC/ g, nos seguintes tratamentos: T1- ar atmosférico; T2- 90/10 O₂/CO₂; T3- 80/20 O₂/CO₂; T4- 70/30 O₂/CO₂; T5- 60/40 O₂/CO₂; T6- 50/50 O₂/CO₂; T7- 100% O₂, T8- vácuo.

TRATAMENTO	VC*	PARÂMETRO	MESÓFILO	PSICOTRÓFICO	
T1	ar	3	FL	2,61	2,57
			TD	9,50	9,71
			FE	8,63	8,84
T2	10/90 CO ₂ /O ₂	5	FL	7,13	3,05
			TD	17,92	20,75
			FE	8,96	8,94
T3	20/80 CO ₂ /O ₂	8	FL	4,56	3,79
			TD	31,58	19,30
			FE	9,10	8,95
T4	30/70 CO ₂ /O ₂	6	FL	7,33	2,15
			TD	21,03	22,81
			FE	9,33	9,37
T5	40/60 CO ₂ /O ₂	7	FL	8,66	3,86
			TD	15,51	20,35
			FE	9,39	9,35
T6	50/50 CO ₂ /O ₂	9	FL	7,66	1,89
			TD	23,35	24,92
			FE	9,05	9,06
T7	0/100 CO ₂ /O ₂	7	FL	3,98	1,96
			TD	24,78	18,81
			FE	8,93	8,85
T8	vácuo	10	FL	10,47	2,27
			TD	20,78	30,28
			FE	9,07	9,06

*VC: Validade comercial – dias necessários para que a contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas alcance 10⁷ UFC/g.

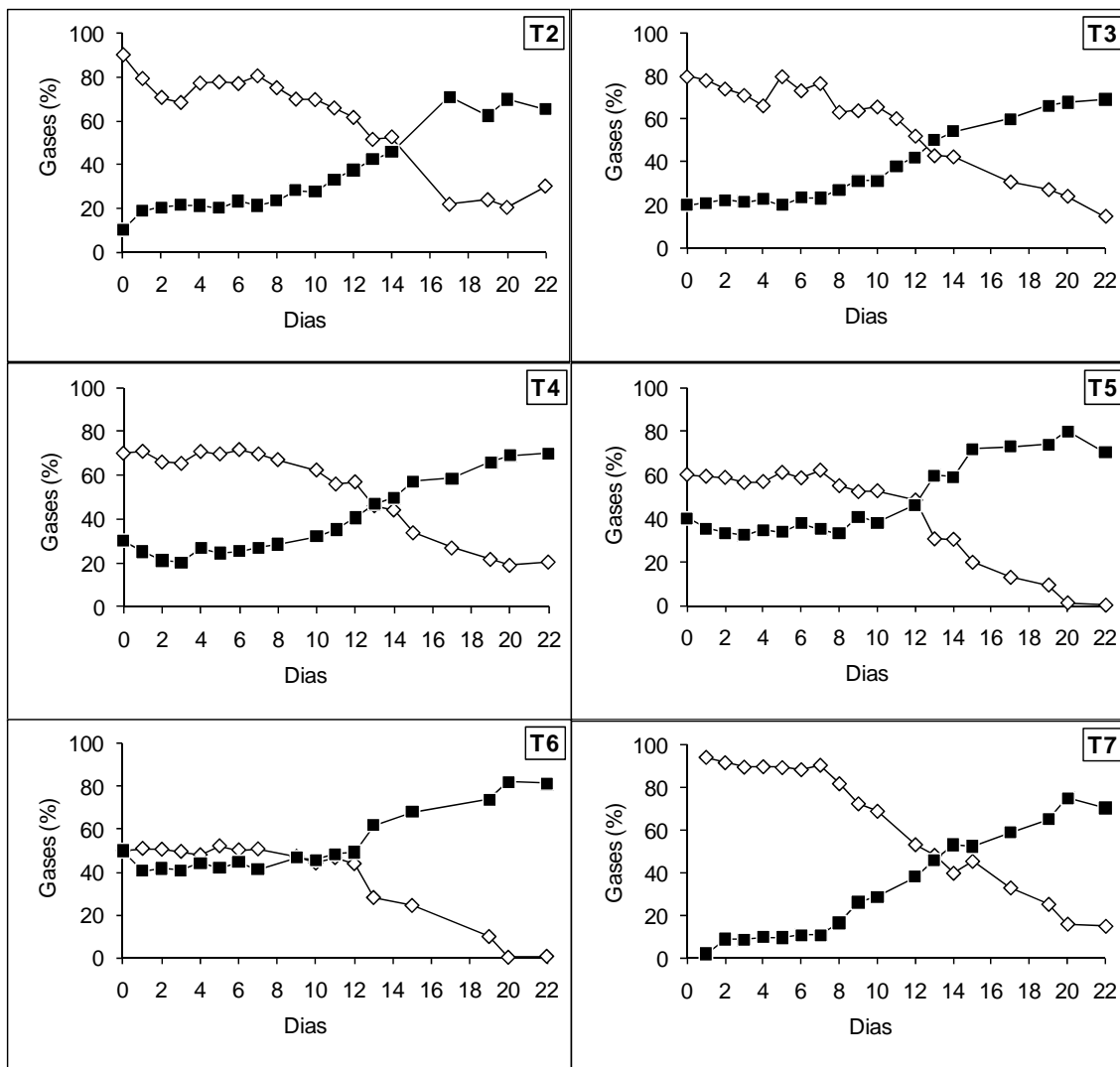


Figura 1

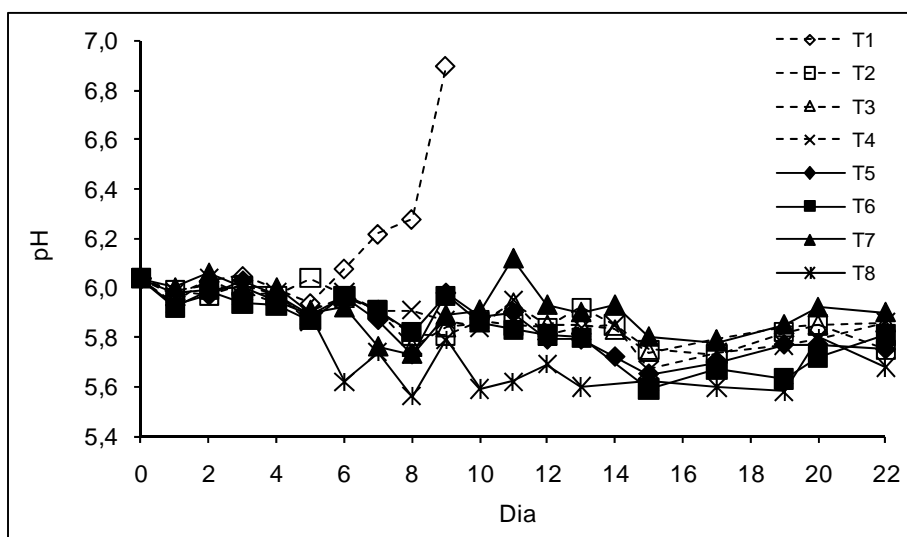


Figura 2

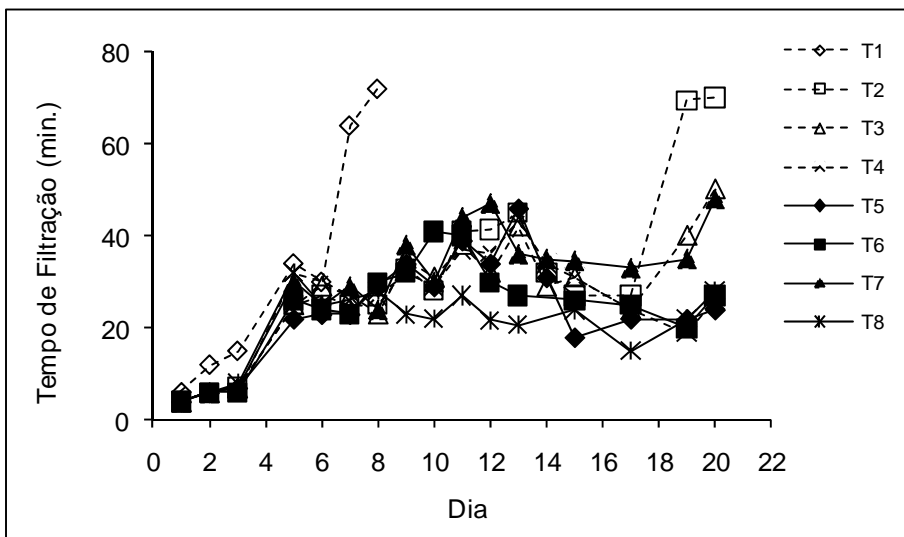


Figura 3

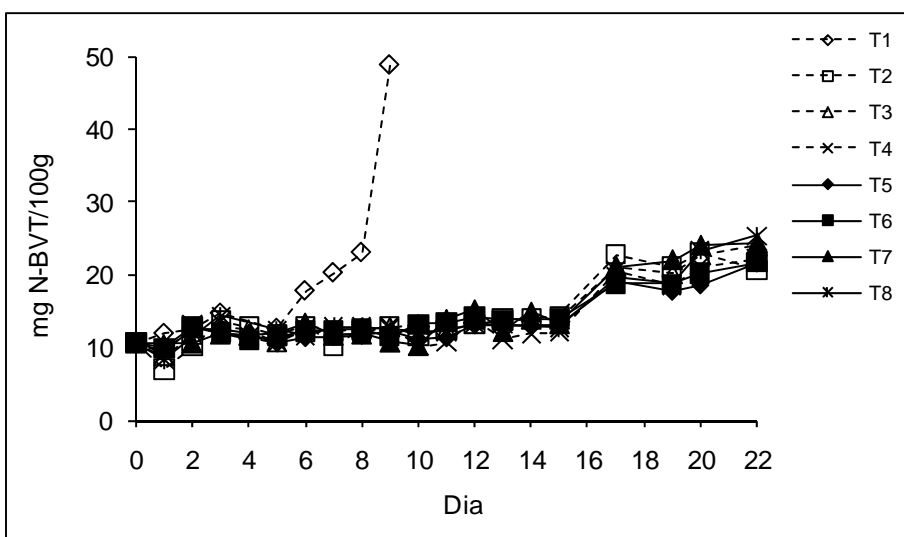


Figura 4

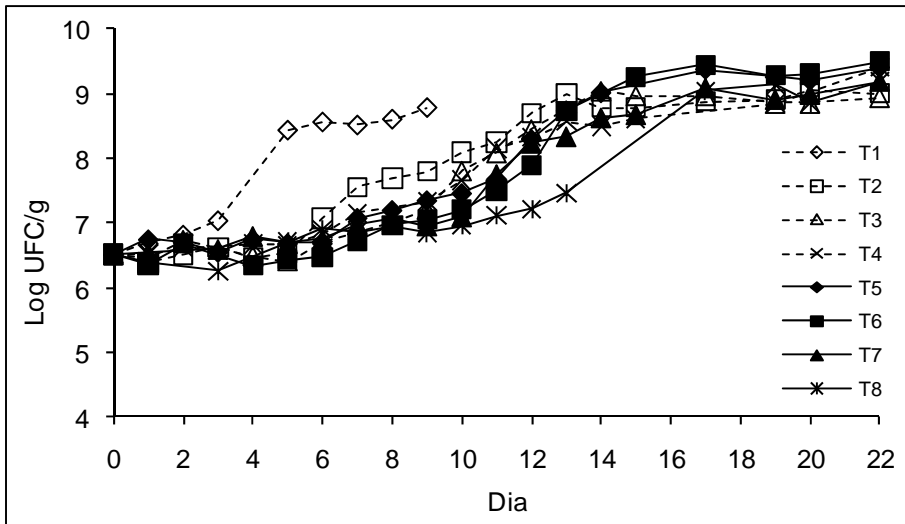


Figura 5

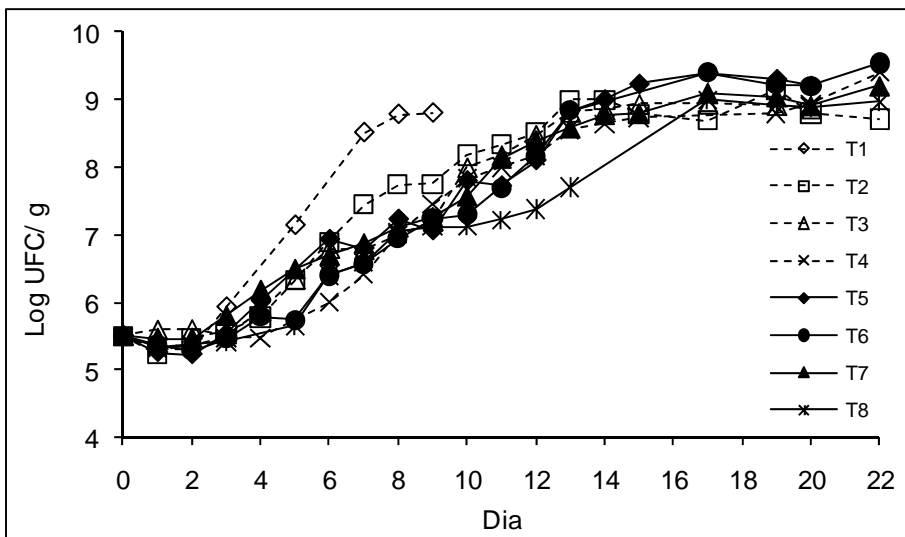


Figura 6

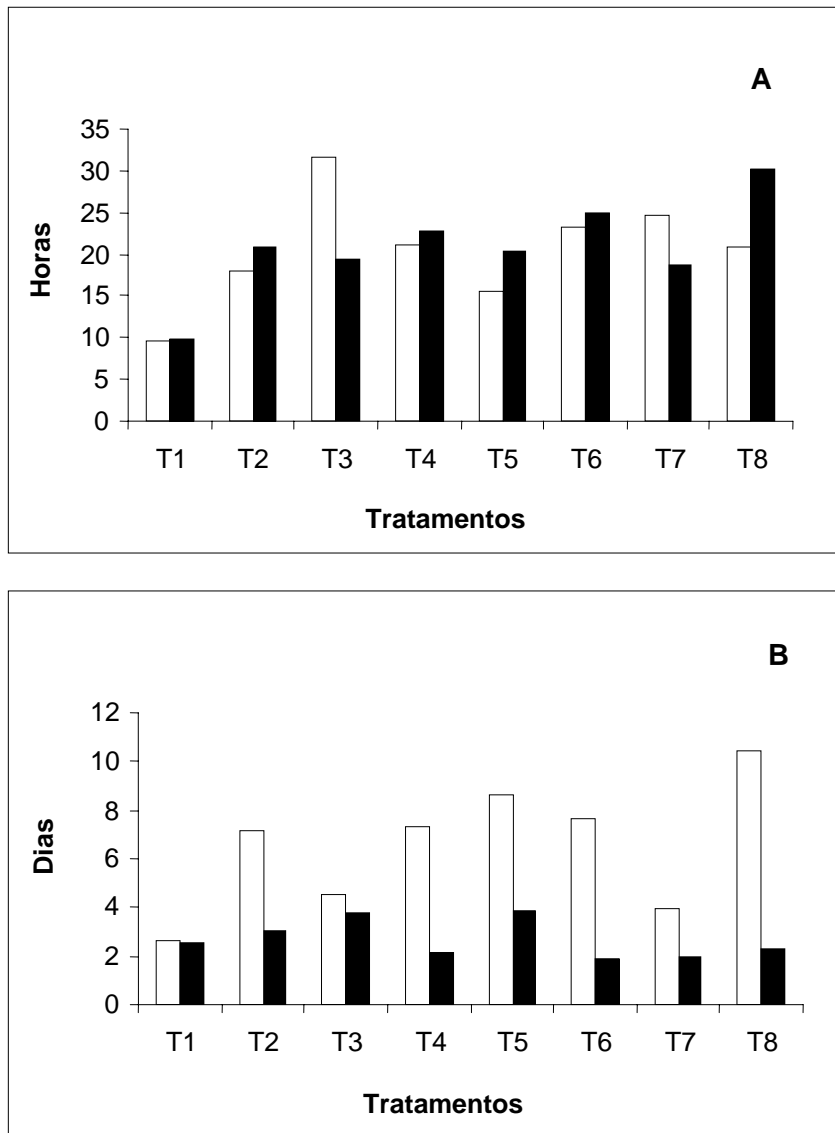


Figura 7

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com relação a carne de rã pode-se concluir que a embalagem com de 80% CO₂ foi a que aumentou de forma satisfatória a vida útil do produto estudado. Conclui-se também que, a embalagem em atmosfera modificada (EAM) inibe o crescimento de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos nesta matriz alimentar, ainda que possam existir outros fatores que influenciem seu crescimento.

Quando utilizado de forma combinada o ácido láctico e EAM, sugere-se, de acordo com as conclusões e baseado na literatura consultada que mais estudos sejam realizados no sentido de avaliar o comportamento dos microrganismos frente a outras atmosferas modificadas; avaliar a ação da EAM a 100% CO₂ sob o aspecto microbiológico, buscando as possíveis causas do seu efeito diferenciado sobre os microrganismos observado neste experimento; avaliar o comportamento dos microrganismos frente a um pré-tratamento (“lavagens”) com ácido láctico da matéria-prima cárnea a ser utilizada no processamento da lingüiça, resultando numa redução da carga microbiana inicial e analisar o produto (lingüiça frescal de frango), submetido aos diferentes tratamentos avaliados neste experimento, também sob o ponto de vista sensorial.

A embalagem em atmosfera modificada inibiu o crescimento de *Yersinia enterocolitica*, ainda que possam existir outros fatores que influenciem no seu crescimento. Neste sentido, a embalagem em atmosfera modificada não pode, por si só, impedir o crescimento deste patógeno, porém, colabora para dificultar seu desenvolvimento, impedir seu crescimento e até mesmo diminuir seu número. Sugere-se o estudo do comportamento de outros micro-organismos patogênicos frente à misturas de gases utilizados na EAM.

Em relação à concentração de gases quando estudado atmosferas enriquecidas com dióxido de carbono e oxigênio em carne bovina moída, pode-se concluir que em todas as atmosferas modificadas ocorreu redução do percentual de oxigênio ao longo do tempo, enquanto que o de dióxido de carbono elevou-se. Os resultados de pH, tempo de filtração e bases voláteis totais, em todas as atmosferas modificadas estudadas, foram menores que nas armazenadas em 100% ar durante o tempo de estudo. Por outro lado, os microrganismos mesófilos e psicrotróficos, nas embalagens em atmosfera modificada, de uma maneira geral, apresentaram redução nas suas taxas de crescimento quando comparadas ao tratamento T1. A validade comercial das amostras embaladas em MAP apresentou um aumento de aproximadamente 2,5 vezes quando comparadas com as embalagens armazenadas em ar atmosférico. De forma geral, pode-se concluir que, sob o ponto de vista físico-químico, sensorial e microbiológico, as embalagens em atmosfera modificada com O_2/CO_2 mostraram ser um excelente método de conservação de carne moída bovina.

Neste trabalho pode-se observar a utilização da embalagem em atmosfera modificada em diferentes matrizes, mostrando a influência que o dióxido de carbono exerceu na validade comercial de cada produto estudado.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGA. MAPAX – A SOLUÇÃO IDEAL EM ATMOSFERA MODIFICADA. BRASIL, 1997.

ARASHISAR, S.; HISAR, O.; KAYA, M.; YANIK, T. Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 209-214, 2004.

ASENSIO, M. A.; ORDÓÑEZ, J. A. y SANZ, B. (1988) Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on the shelf-life of refrigerated pork packed in plastic bags. *J. Food Prot.* 51, 356-360.

BARANYI, J. and ROBERTS, T.A. *A dynamic to predicting bacterial growth in food.* International Journal of Food Microbiology, 1994.

BLISKA, F.M. *Perspectivas de Demanda para o Mercado de Carne Embalada,* Seminário e Workshop do Centro de Tecnologia de Carne. ITAL - Campinas, 1997.

BRASIL. Instrução Normativa nº4, de 31 de março de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de identidade e Qualidade de lingüiça. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, 05 abril 2000. Seção 1, p. 6-10.

_____. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. *Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Elaboração para Estabelecimentos Elaboradores/ Industrializadores de Alimentos.* Portaria nº 368, de 04/09/97. Brasília: Ministério da Agricultura, 1997.

_____. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA).* Decreto nº 30.691, de 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. Brasília, 1997.

_____. Secretária de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde - DINAL. *Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos,* Portaria 451/1999.

BRODY, A.L. Envasado de Alimentos en Atmósferas controladas, modificadas y a vacío, Zarayaza, Acribia, 1996, 12-13p.

CÂNDIA MERCANTIL NORTE SUL LTDA. *Acondicionamento de Cortes Cárneos Frescos em Embalagens com Atmosfera Modificada*. Campinas CETEA e CTC - ITAL, 1997.

CHURCH, I. J. & PARSONS A. L.. *Modified Atmosphere Packing Technology: A Review*. J Sei Food Agric, 1995, 67, 143-149.

CHURCH, N.. *Developments in Modified-Atmosphere Packing and Related Technologies*. Trends in Food Science & Technology, 1994, V.5, 345.

CONTE-JUNIOR C.A., MACEDO B.T., LOPES M.M., FRANCO R.M., FREITAS M.Q., FERNÁNDEZ M., MANO S.B. Effect of modified atmosphere packaging on the growth/survival of *Yersinia enterocolitica* and natural flora on fresh poultry sausage, p.1217-1223. In: Méndez-Vilas A. (Ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Formatex Books, Badajoz. 2010.

COUSIN, M. A. et al. *Psychrotrophic Microorganisms*, in VANDERZANT, C. APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, Washington, 3^a.ed, 1992, 153-164p.

DAINTY, R. H. *Chemical changes associated with microbial growth on meat stored at chill temperatures*. Proc. 32^o Eur. Meet Meat Res. Work. Ghent, Bélgica, 1986,171-186p.

DAY, B.P. F. *Recent Developments In MAP*. Campden Food and Drink Research Association. European Food and Drink Review. Summer, 1993, 87-89p.

DIXON, N. M. & KELL, D.B, *The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms*. Journal of Applied Bacteriology, 1989, 67, 109-136p.

ERIBO, B. E. & JAY, J. J.. *incidence of Acinetobacter spp. And other grm-negative , oxidase-negative bacteria in fresh and spoiled ground beef*. Applied and environmental microbiology – American Society for Microbiology, 1988, Vol. 49, n^o 1, 256-257p.

FERNANDO, G. D. G.; NYCHAS, G. J. E.; PECK, N. W.; ORDÓÑEZ, J. A. *Growth/ Survival Of Psychrotrophic Pathogens On Meat Packaged Under Modified Atmosphere*. International Journal of Food Microbiology 28, 1995, 221-229.

FERREIRA, C.M. *Ranicultura*. Disponível em:
<<http://www.aquicultura.br/ranicultura.htm>>. Acesso em: 8 Março 2011.

FIPERJ - Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro. *Ranicultura: a ranicultura no Estado do Rio de Janeiro*. 2011. Disponível em:<<http://www.fiperj.rj.gov.br/ranicu.html>>. Acesso em: 8 Março 2011.

FRANCO, G. *Tabela de Composição Química dos Alimentos*, São Paulo - Rio de Janeiro, ed. Atheneu, 9^a ed., 1992, 118p.

FRAZIER, W.C. et al., *Microbiologia de los Alimentos*, Zarayaza, Acribia, 4^aed, 1993, 537-546p.

- GEYSEN, S.; VERLINDEN, B. E.; GEERAERD, A. H.; VAN IMPE, J. F.; MICHIELS, C. W.; NICOLAI, B. M. Predictive modeling and validation of *Listeria innocua* growth at speratmospheric oxygen and carbon dioxide concentrations. *International Journal of Food Microbiology*, v. 105, p. 333-345, 2005.
- GONÇALVES, A. A. e OTTA, M. C. M. Aproveitamento da carne da carcaça de rã-touro gigante (*Rana catesbeiana*) no desenvolvimento de hambúrguer. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 3(2): 7-15, 2008.
- GRAPHPAD INSTANT TM, copyright ©, *Graphpad software* V2.05A, 1990-1994.
- GROSSKLAUS, D. *Inspeccion sanitaria de la carne de ave*. Zaragoza: Acribia, 1979. 347p.
- GUEDES, W.; MÁRSICO, E.T.; SILVA, L.P.; FILHO ALMEIDA, E.S.A.; FREITAS, M.Q.; MANO, S. Efeito da atmosfera modificada sobre a conservação de lombo de atum (*Thunnus albacares*) embalado. *Rev. Bras. Ciênc. Vet*; 13(2): 89-93, 2006.
- HARRIGAN, W. F., *Laboratory Methods in Food Microbiolgy*, Academic Press, 3º ed., 1998, 121-219p.
- HASTINGS, M. J. (1993) Packaging machinery. En: *Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Food*. (ed. Parry, R. T.). Blackie Academic & Professional, London.
- JAY, J.M., *Microbiologia Moderna de los Alimentos*, Zarayaza, Acribia, 3ªed, 1994, 289-309p.
- JOHNSTON, R. W.; TOMPKIN, R. B. Meat and poultry products. In: VANDERZANT, C. & SPLITTSTCESSER, D. F. *Compendium of methods of the microbiological examination of foods*. 3 ed. Washington: APHA, 1992, p. 821-834.
- KASNOWSKI, M.C.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; VALENTE, A.M.; CARVALHO, J.C.A.P.; CONTE-JUNIOR, C.A. Detecção, caracterización, estudio serológico y antibiograma de *Escherichia coli* aislada de muestras de carne de ternera entera y picada. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 9, 2-11, 2008.
- KOSTAKI, M.; GIATRAKOU, V.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology*, v. 26, p. 475-482, 2009.
- LAMBERT, A.D.; SMITH, J. P.; DODDS; K. L. *Shelf Life Extension and Microbiological Safety of Fresh Meat – A Review*. *Food microbiology*, 1991, 8, 267-290p.
- LIMA, S.L., CRUZ, T.A., MOURA, O.N. (1999) *Ranicultura: análise da cadeia produtiva*. Viçosa: Folha de Viçosa.
- LINDAU, C.F.; NOLL, I.B. Determinação do valor nutritivo da carne de rã. Encontro Nacional de Ranicultura, 6., 1988, Rio de Janeiro. Anais e Coletânea do V Encontro Nacional de Ranicultura, 1988. p. 43-50.

LOPES, M.M.; MÁRSICO, E.T.; SOBREIRO, L.G.; SILVA, L.P.; CONTE-JUNIOR, C.A.; PARDI, H.S.; MANO, S.B. Efeito da embalagem em atmosfera modificada sobre a conservação de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99, 207-210, 2004.

LÓPEZ-GÁVEZ, D.; HOZ, L. de la; y ORDÓÑEZ, J. A. (1995) Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on microbiological and chemical changes in refrigerated tuna (*Thunnus alalunga*) steaks. *J. Agric. Food Chem.* 43, 483-490.

MADAVA R, HOOGENKAMP H. The role of processed products in the poultry meat industry. In: Richardson IR, Mead GG, eds. *Poultry Meat Science*. Wallingford: CABI Publishing; 1999:396-410.

MALAVOTA, L.C.M.; CONTE-JUNIOR, C.A.; LOPES, M.M.; SOUZA, V.G.; PEIXOTO, B.T.M.; STUSSI, J.S.P.; PARDI, H.S.; MANO, S.B. Análise micológica de lingüiça de frango embalada em atmosfera modificada. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 13, 3-9, 2006.

MANO, S.B. *Comportamento de la Microbiota Natural y Listeria monocytogenes, Aeromonas hydrophila y Yersinia enterocolítica em Carne Envasada em Atmosfera Modificadas*. Tesis Doctoral, Madrid, 1997.

MANO, S. B., ORDÓÑEZ, J. A.; GARCIA DE FERNANDO G. D. Aumento de la vida útil y microbiología de la carne de pavo envasada en atmósferas modificadas. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 6, 55-65, 1999.

MANO, S.B. ORDÓÑEZ, J.A.; GARCIA DE FERNANDO, G.D. Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres. *Food Microbiology*, 17, 657-669, 2000.

MANSUR, R. T. Modified Atmosphere Packaging. *The Wiley Encyclopedia of Packanging Technology*, Natick, Massachusetts, 2^a ed., 650-654, 1997.

MANTILLA, S.P.S.; SANTOS, E.B.; CONTE JUNIOR, C.A.; MANO, S.B.; VITAL, H.C.; FRANCO, R.M. Bactérias deteriorantes em filés de frango embalados em ar, vácuo e irradiados: parâmetros bacteriológicos de desenvolvimento e prazo comercial. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 39, 271-277, 2009.

MELLO, S. C. R. P.; PESSANHA, L. S. Avaliação bacteriológica e físico-química da polpa de dorso de rã obtida por separação mecânica. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 9, n. 1, p. 39-48, jan./mar. 2006.

MELLO, S.C.R.P.; MANO, S.;FRANCO,R.M.; PARDI, H.S.; PESSANHA, L.S.; SANTOS, I.F. Avaliação bacteriológica e físico-química da polpa e dorso de rã obtida por separação mecânica. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 9, n. 1, p. 39-48, 2006.

ORDÓÑEZ, J. A. y LEDWARD, D. A. (1977) Lipid and myoglobin oxidation in pork stored in oxygen- and carbon dioxide-enriched atmospheres. *Meat Sci.* 1, 41.

ORDOÑEZ, J.A. *Tecnologia de los Alimentos VOL. I e II*. Madrid, Ed. Síntesis, 1998.

PALOV, A., GARCIA DE FERNANDO, G.D. ORDOÑEZ, J.A., HOZ, L. (1994) β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH) activity of unfrozen and frozen-thawed frog (*Rana esculenta*) legs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 64, 141-143.

PARDI, M.C. et al. *Ciência Higiene e Tecnologia da Carne: Carne Processamento Tecnológico de Carnes in natura*. Niterói: EDUFF; Goiânia: UFG, v2., 1994.

PARDI, M.C.; SANTOS, F.; SOUZA, E.R; PARDI, US. *Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne*, Vol. 2. 3 edição. Goiânia: UFG, 2001.

PARRY, R.T. *Envasado de los Alimentos em Atmósfera Modificada*. A Madrid Vicente Ediciones, Madrid, Espanã, 1993.

PATSIAS, A.; BADEKA, A. V.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of freeze chilling and MAP on quality parameters of raw chicken fillets. *Food Microbiology*, v. 25, p. 575-581, 2008.

RAMOS, E.M., GOMIDE, L.A.M., RAMOS, A.L.S., PETERNELLI, L.A. (2004) Effect of stunning methods on the differentiation of frozen-thawed bullfrog meat based on the assay of β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase. *Food Chemistry*, 87, 607-611.

RIO DE JANEIRO. SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. Decreto nº6235, 30 de outubro de 1986. *Aprova o Regulamento de Defesa e Proteção da Saúde no Tocante a Alimentos e a Higiene Habitacional e Ambiental*. Diário Oficial (do Estado do Rio de Janeiro) - Municipalidades, Rio de Janeiro, 03 de novembro de 1986.

RÖNNER, U. (1994) Modified atmosphere packaging of non-respiring products. En: *Food Preservation by Combined Processes*. (eds. Leistner, L. y Gorris, L. G. M.). Final Report. FLAIR (Food Linked Agro-Industrial Research) Concerted Action No. 7, Subgroup B. pp: 51-58.

_____. *MAPAX – A Solução ideal em Atmosfera Modificada*, AGA Brasil, 1997.

ROSA, V. P. *Efeitos da atmosfera modificada e da irradiação sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do queijo minas frescal*. Piracicaba, 2004. 155 f. Dissertação apresentada a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2004.

RUST RE. Productos embutidos. In: Price JF, Schweigert BS, eds. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Zaragoza: Acribia Press; 1994:415-439.

SALGADO, R.; COSTA, J.C.B.; CONTE-JUNIOR, C.A.; FERNÁNDEZ, M.; FREITAS, M.Q.; MANO, S.B. Efeitos da embalagem em atmosfera modificada sobre as alterações microbiológicas, químicas e sensoriais de pargo (*Pagrus pagrus*). *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 13, 94-97, 2006.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L. ; SOLER, R. M. Embalagens com atmosfera modificada/controlada. *Catálogo Brasileiro de Produtos e Serviços*. Campinas, Ital, Jul. 1994.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L., et al. *Atmosfera Modificada para Aves*. Campinas, CETEA – ITAL, 1995.

_____, et al. *Embalagens com Atmosfera Modificada*. Campinas, CETEA – ITAL, 1998.

SILVA, L.P.; LOPES, M.M.; MANO, S.B.; MÁRSICO, E.T.; CONTE-JUNIOR, C.A.; TEODORO, A.J.; GUEDES, W.S. Influência da adição de polifosfato em lingüiça de frango. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 15, p.50-55, 2008.

SOBREIRO, L. G.; SOUZA, E. R. Avaliação Físico-química e Organoléptica do Estado de Conservação da Carne Bovina Moída, Preparada Industrialmente. Niterói, *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.3, n.3, p.99-104, V. 3, nº 3, 1996.

SOCOL, M. C. H.; OETTERER, M. Use of modified atmosphere in seafood preservation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 46, n. 4, p. 569-580, December 2003.

SOUZA, C. L., et al. Avaliação Microbiológica e Físico-química da Carne Bovina Moída em Açougues do Município de Macapá - AP. São Paulo, *Revista Higiene Alimentar*, v. 14, n. 72, 2000.

TEIXEIRA, R.D. Produção e Comércio de Rã nas Américas e Europa. Ciclo de Palestras Sobre Ranicultura do Instituto de Pesca, 1. 2001, São Paulo. São Paulo: Boletim técnico do Instituto de Pesca, 2001. n. 3, p.1-2.

TOMPKIN, R.B.; MCNAMARA, A.M.; ACUFF, G.R. Meat and poultry products. In: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p.421-428.

VANDERZANT, G.; SPLITTSTOESSER, D.F. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, American Public Healths Association, 3ª ed. 1992.

VIEIRA, M.I. (1993) *Ra-touro gigante: características e reprodução* (4th ed.). São Paulo: INFOTEC.

ZAGORY, D. Modified atmosphere packaging. In: BRODY, A. L.; MARSH, K. S. *The wiley encyclopedia of packaging technology*. 2 ed. Wiley Interscience Publication, 1997. p. 650- 656.

6 APÊNDICES

6.1 REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIA VETERINÁRIA

Influência do ácido láctico e da embalagem em atmosfera modificada sobre a validade comercial da linguiça fresca de frango

Influence of lactic acid and modified atmosphere packing in shelf life of fresh poultry sausage

Carlos Adam Conte Junior*,** Valéria Garrido de Souza*, Rami Fanticelli Batista*,
Eliane Teixeira Mársico**, Sergio Borges Mano**

Resumo

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a influência da embalagem em atmosfera modificada (EAM) e do ácido láctico (AL) na validade comercial da linguiça fresca de frango. Para tanto, foram processadas duas massas de linguiça, sendo uma delas adicionado ácido láctico (0,15%). As linguiças foram então embaladas nas seguintes atmosferas: 100% ar atmosférico, 100% N₂, 100% CO₂, 80% CO₂/20% N₂, 40% CO₂/60% N₂, e 20% CO₂/80% N₂, e armazenadas durante 16 dias a 4±2°C. Foram realizadas, nos dias 0, 1, 9 e 16, análises bacteriológicas: contagem em placa de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas, bactérias ácido-láticas, enterobactérias e *Pseudomonas*, e determinação do pH. A EAM a 80/20 CO₂/N₂ mostrou-se como método mais eficaz, sob o ponto de vista microbiológico, em termos de conservação da linguiça fresca de frango, atingindo ao final do experimento valores de 6,0; 5,3 e 5,0 Log UFC/g (bactérias mesófilas, psicrotróficas e ácido-láticas, respectivamente). Em relação à adição do AL, tal tratamento foi eficaz sob o aspecto de inibição microbiológica em quase todas as atmosferas, com exceção da 80/20 CO₂/N₂. Durante o experimento, não foi observado crescimento de enterobactérias e *Pseudomonas*. Em relação ao pH, pôde-se observar que a adição de 0,15% de AL provocou uma queda do pH de 5,89 para ~5,50, suficiente para acarretar uma inibição significativa da taxa de multiplicação microbiana nas diferentes atmosferas, exceto na 80/20 CO₂/N₂. Pôde-se concluir que a EAM com 80/20 CO₂/N₂ mostrou-se como o método de conservação mais eficaz quanto ao aumento da vida útil da linguiça de frango e a adição de 0,15% de AL demonstrou ser uma alternativa eficaz para conservação deste produto.

Palavras-chave: ácido láctico, embalagem em atmosfera modificada, embutidos.

Abstract

The present work has an objective to observe and to characterize, through microbiological analyses and pH determination, the influence of the Modified Atmosphere Packaging (MAP) and the lactic acid additive in shelf life of fresh poultry sausage. Two sausage batches were made under laboratory control. One of them was added of lactic acid (0.15%). The samples were processed, and packaged in plastic bags (four sausages per bag). Finally, the bags were filled with different atmospheres: 100% air, 100% N₂, 100% CO₂, 80/20 CO₂/N₂, 40/60 CO₂/N₂ and 20/80 CO₂/N₂. Samples were stored in walk-in cold rooms at 4±2°C. Samples were taken at different days of storage (zero, 1, 9 and 16). Both added and not added with lactic acid samples were subjected to total viable aerobic counts (mesophylic and psychrophylic), lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae, and *Pseudomonas* sp. in specific media plates. Also, it was determinate the pH of all the samples. The results were arranged in tables and graphs for the descriptive statistical analyses. The MAP 80/20 CO₂/N₂ was the more effective method to conserve fresh poultry sausages, reaching at the end of the experiment values of 6.0; 5.3 and 5.0 Log UFC/g (mesophylic, psychrophylic and acid-lactic bacteria, respectively), comparing to the conventional package (100% air) and 100% N₂ that reached at the end of the experiment maximum values of 8.8 and 9.4 Log UFC/g, respectively. The addition of the acid lactic was effective about the aspect of microbiological inhibition, reaching inferior values in almost all the atmospheres comparing to the samples without addition of the acid, except to 80/20 CO₂/N₂, that the values of the microbial count in both treatments (with and without acid) they were very close. During the experiment, it was not observed the growth of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas*. Analyzing the pH, it can be observed that the addition of 0.15% lactic acid caused a fall of the pH of 5.89 for ~5.50, enough to inhibit the microbial multiplication in the different atmospheres, except in 80/20 CO₂/N₂. After analyzed this results, it was concluded that MAP to 80/20% of CO₂/N₂ was the more effective method to increase the shelf life of the fresh poultry sausage, added or not added with lactic acid; the addition of 0.15% of lactic acid was an effective alternative for conservation of fresh poultry sausage chicken, wrapped or not in modified atmosphere.

Keywords: lactic acid; modified atmosphere packaging; fresh poultry sausage.

* Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal - Faculdade de Veterinária - Universidade Federal Fluminense.

**Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense. Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói - RJ, CEP 24230-340.

A quem enviar a correspondência: Sergio Borges Mano. E-mail: mtasbm@vm.uff.br

Introdução

O avanço da avicultura brasileira nas últimas três décadas permitiu um grande aumento no consumo *per capita* da carne de aves, proporcionando também o desenvolvimento dos mais variados tipos de produtos derivados, isto é, produtos mais elaborados como, por exemplo, a linguiça de frango, aos quais são agregados valor, maior conveniência e praticidade para o consumidor (Malavota et al., 2006).

Apesar de todos estes avanços científicos e tecnológicos da avicultura, a validade comercial dos produtos mantidos em atmosfera normal ou sem a presença de conservantes em sua composição é limitada. A refrigeração pode retardar as alterações indesejáveis, mas não aumenta a validade comercial suficientemente para atender as exigências de distribuição e comercialização, quando se necessita de transporte a zonas mais distantes dos centros de produção, ou quando se embalam para venda nas seções de refrigerados dos mercados (Lopes et al., 2004).

Em virtude disto, há um crescente interesse por parte das indústrias e pesquisadores em desenvolver novas tecnologias que permitam um prolongamento da validade comercial de produtos alimentícios. Logo, acredita-se que estudos devam ser conduzidos, no sentido de avaliar o comportamento de diversos produtos embalados em atmosfera modificada ou adicionados de aditivos saudáveis com características conservantes, frente às exigências atuais do mercado consumidor (Conte-Junior et al., 2006).

Em função do exposto, o presente trabalho tem como objetivo geral observar e caracterizar, através de análises bacteriológicas e determinação do pH, a influência da embalagem em atmosfera modificada (EAM) e do aditivo conservante ácido láctico na validade comercial da linguiça de frango.

Material e métodos

A linguiça frescal de frango foi elaborada no Laboratório de Tecnologia de Carnes da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense. Utilizou-se uma formulação cuja constituição era: filé de frango (85,0%), toucinho (10%), sal (1,5%), alho (0,25%), pimenta branca (0,25%) e água destilada esterilizada (3%). Foram processadas duas massas de linguiça, sendo a uma delas adicionado o ácido láctico (0,15%) de acordo com os objetivos do experimento.

No processo de fabricação, inicialmente, moeu-se o filé de frango descongelado juntamente com o toucinho em um moedor de carne da marca C.A.F. Picadores de Carne, utilizando-se para isso o disco com 5mm de diâmetro. A seguir, procedeu-se à mistura manual com os demais ingredientes. Durante esta etapa, foram acrescentados os condimentos e a água destilada, misturando-os até que se obtivesse a liga desejada. A massa, então, foi dividida igualmente em duas bandejas, sendo que em uma delas foi adicionado o ácido láctico. A massa controle (sem o ácido láctico) foi embutida anteriormente à massa com o conservante. Para tanto, foi utilizada uma embutidora da marca Picelli, com embutidor de 5mm de diâmetro. Utilizou-se para o embutimento uma tripa artificial de colágeno da marca Coria FSC, com tamanho de 21 x 40mm.

As amostras foram constituídas, tanto as controle como as adicionadas de ácido láctico, por cerca de quatro gomos de linguiça, acondicionados em embalagens plásticas barreiras, de baixa permeabilidade aos gases, próprias para embalagem em atmosfera modificada. Tais embalagens mediam 25x35cm, sendo este tamanho de embalagem escolhido por propiciar uma boa capacidade volumétrica de armazenamento dos gases.

Os cilindros de gases utilizados no experimento foram adquiridos da empresa White Martins Ltda. Foram aplicados os seguintes gases ou mistura de gases: 100% ar atmosférico, 100% nitrogênio, 100% gás carbônico, 80% gás carbônico com 20% nitrogênio (80/20), 40% gás carbônico com 60% nitrogênio (40/60) e 20% gás carbônico com 80% nitrogênio (20/80).

Todos os gomos de linguiça já embalados foram estocados em geladeira com temperatura oscilando entre 4±2°C. As técnicas utilizadas para as análises bacteriológicas basearam-se nas metodologias citadas por Vanderzant e Splittstoesser (1992).

Durante o preparo da linguiça, ou seja, no dia zero do experimento, várias amostras controle foram colhidas para a realização das contagens iniciais de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas, bactérias ácido-láticas, enterobactérias e *Pseudomonas*. Através dessas contagens, obtinham-se informações com relação à qualidade da matéria-prima, à qualidade dos condimentos, à higienização e à condição sanitária dos equipamentos. Com estes dados foi possível realizar também um rastreamento de alguma possível contaminação, durante a confecção e manipulação do produto.

Inicialmente, colheu-se uma amostra de aproximadamente 10g da matéria prima (filé de frango) já descongelada, "over night" em geladeira. Após a moagem da matéria-prima, colheu-se também uma outra amostra de aproximadamente 10g. Em seguida a etapa da mistura, colheu-se outra amostra de aproximadamente 10g da massa já acrescida dos condimentos, do sal e da água. Após a divisão da massa em duas bandejas, colheu-se uma amostra de aproximadamente 10g desta massa misturada e adicionada do conservante ácido láctico. Estas quatro subamostras foram colhidas em embalagem plástica esterilizada para "Stomacher" e depois pesadas asepticamente (10g). Após o embutimento da massa controle, foram colhidas mais duas amostras, constituindo uma amostragem da linguiça controle e outra com ácido láctico previamente preparada. A colheita e pesagem foram realizadas da mesma forma que as anteriores.

Para a realização da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas utilizou-se a técnica "Pour Plate". Após a solidificação do meio de cultura, incubavam-se as placas semeadas em posição invertida em estufa a 35-37°C durante 24 a 48 horas (mesófilas) e na geladeira com temperatura em torno de 7-10°C durante 7 a 10 dias (psicrotróficas). O meio de cultura utilizado para esta contagem foi o Ágar padrão para contagem. A cada contagem de mesófilas e psicrotróficas foram semeadas três placas referentes às três últimas diluições consecutivas. Foram realizadas contagens totais de mesófilas e psicrotróficas em todas as seis amostras colhidas no dia zero.

A contagem em placa de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas viáveis foi realizada em todas as amostras colhidas durante o experimento. Realizou-se um acompanhamento do crescimento dessas bactérias no decorrer de 16 dias, realizando-se a contagem nos dias um, nove e 16 em todos os gomos de linguiça, tanto controle quanto adicionados de ácido láctico, embalados nas diferentes atmosferas modificadas (100% ar atmosférico, 100% N₂, 100% CO₂, 80/20, 40/60 e 20/80 CO₂/N₂) utilizadas no experimento, os quais foram estocados em geladeira. Portanto, somou-se um total de três dias de análise, e ainda o resultado das contagens iniciais, havendo então, no decorrer de todo o experimento, três contagens de mesófilas e psicrotróficas em cada gomo de linguiça controle e adicionada de ácido láctico de acordo com cada atmosfera modificada: a) três contagens (um, nove e 16) de mesófilas e psicrotróficas na amostra controle embalada em 100% ar; b) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra com ácido láctico embalada em 100% ar; c) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra controle embalada em 100% N₂; d) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra com ácido láctico embalada em 100% N₂; e) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra controle embalada em 100% CO₂; f) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra com ácido láctico embalada em 100% CO₂; g) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra controle embalada em 80/20 CO₂/N₂; h) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra com ácido láctico embalada em 80/20 CO₂/N₂; i) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra controle embalada em 40/60 CO₂/N₂; j) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra com ácido láctico embalada em 40/60 CO₂/N₂; k) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra controle embalada em 20/80 CO₂/N₂; l) três contagens de mesófilas e psicrotróficas na amostra com ácido láctico embalada em 20/80 CO₂/N₂.

Para a realização da contagem em placa de enterobactérias também se utilizou a técnica já descrita de "Pour Plate". As placas foram incubadas em posição invertida em estufa a 35-37°C por 24 a 48 horas. O meio de cultura utilizado para esta contagem foi o VRBD-ágar cristal violeta vermelho-bile-glucosa, segundo Mossel. O total de dias de contagens, assim como o número total de contagens para enterobactérias seguiu a mesma sequência das contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas.

Para a realização da contagem de bactérias ácido-láticas em placa também se utilizou a técnica já descrita de "Pour Plate" (com dupla camada). As placas foram incubadas em posição invertida a 35-37°C por 24 a 48 horas. O meio de cultura utilizado para esta contagem foi o ágar MRS, segundo De Man, Rogosa e Sharpe. O total de dias de contagens, assim como o número total de contagens para bactérias ácido-láticas seguiu o mesmo esquema das contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas.

Para a realização da contagem de *Pseudomonas* em placa, foi utilizada a técnica de espalhamento superficial. A placa foi incubada invertida em estufa a 35-37°C por 24 a 48 horas. A leitura da placa foi realizada com o auxílio de uma lâmpada ultravioleta, evidenciando as UFC através da fluorescência. O meio de cultura utilizado para esta contagem foi o ágar

Cetrimide. O total de dias de contagens, assim como o número total de contagens para *Pseudomonas* seguiu o mesmo esquema das contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas.

Após o período de incubação correspondente das placas semeadas em APC, VRBD, MRS e ágar Cetrimide, realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) presentes nas placas, considerando sempre as placas que continham entre 25 e 250 UFC. Para tanto, utilizou-se o contador de colônias do tipo Quebec. O valor final da contagem era resultante da multiplicação do número de UFC pelo inverso da diluição da placa escolhida. Os resultados das contagens foram anotados em tabelas previamente preparadas para melhor organização dos dados.

Realizou-se determinação do pH. Para tanto, introduziu-se o eletrodo do pHmetro na própria embalagem plástica para "Stomacher", onde se homogeneizou a amostra de linguiça (diluição 10⁻¹). Determinou-se o pH em todas as amostras analisadas bacteriologicamente. Os dados das determinações de pH também foram postos em tabelas para melhor organização dos mesmos.

A análise estatística constou de uma análise descritiva simples, através da qual se realizou a média e proporção dos diversos dados estudados, procedendo-se um estudo comparativo, com utilização de tabelas e gráficos. Para a realização da referida análise estatística descritiva e confecção dos gráficos utilizou-se o programa Microsoft® Excel 2002.

Resultados e discussão

Os valores obtidos ao longo do experimento foram dispostos em tabelas e gráficos para realização da análise estatística descritiva. Entretanto, antes da apresentação desses resultados, é importante salientar que os diferentes tratamentos aos quais as amostras foram submetidas serão avaliados, neste trabalho, quanto à capacidade de inibição da multiplicação dos micro-organismos analisados, fator relevante para aumentar a validade comercial de um alimento.

Analisando as Figuras 1, 2, 3 e 4, observar-se que os valores das contagens do dia zero dos micro-organismos mesófilos e bactérias ácido-láticas do tratamento com ácido foram menores do que das amostras-controle. Além disso, nas amostras adicionadas de ácido láctico, tanto os mesófilos como os psicrotróficos tiveram os valores das contagens do dia um (1) inferiores aos valores do dia zero. Tais resultados poderiam sugerir uma ação bactericida do ácido láctico, pois segundo Ferreira (1999), este ácido pode ter um efeito bacteriostático, como também bactericida devido a sua capacidade de provocar um desequilíbrio intracelular, retardando o crescimento celular e, em alguns casos, provocando até a morte do micro-organismo.

Em relação ao comportamento dos mesófilos frente aos diferentes tratamentos, através das Figuras 1 e 2, pode-se observar que, no nono (9º) dia, em praticamente todas as atmosferas (exceto a 100% CO₂) do tratamento com ácido, houve uma inibição da multiplicação microbiana em relação às amostras-controle (sem ácido). Inibição esta significativa, principalmente na atmosfera 20/80% de CO₂/N₂, onde a

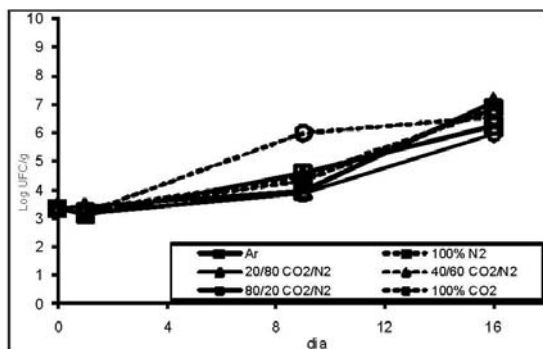


Figura 1: Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas presentes nas amostras de linguça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

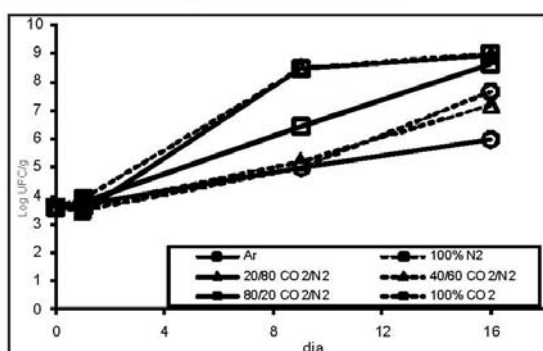


Figura 2: Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas presentes nas amostras de linguça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, sem adição de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

contagem da amostra-controle (8,5) ultrapassa o dobro da contagem da amostra adicionada do ácido (4,0). Na atmosfera 100% de N₂, observou-se quase o dobro da multiplicação microbiana na amostra-controle (8,5) em relação à amostra adicionada do ácido láctico (4,3). Tais resultados comprovam a ação bacteriostática do ácido láctico. Já a EAM a 100% CO₂ teve uma ação diferenciada no comportamento dos micro-organismos mesófilos, onde se observa uma menor contagem no tratamento sem adição do ácido láctico (5,0) em relação ao tratamento com adição do mesmo (6,0).

No décimo sexto (16^o) dia, a ação bacteriostática do ácido láctico continua efetiva, fato este demonstrado através dos menores valores atingidos nas amostras submetidas ao ácido láctico em relação às controle, exceto na atmosfera a 80/20% de CO₂/N₂, onde o valores da contagem microbiana em ambos os tratamentos (com e sem ácido) foram idênticos (6,0), demonstrando que, nesta concentração gasosa, a

adição do ácido láctico não foi significativa do ponto de vista de inibição do crescimento microbiano.

Com relação aos micro-organismos mesófilos, o tratamento com a adição do ácido láctico foi muito eficaz, acarretando de modo geral uma diminuição da taxa de multiplicação microbiana quando comparado ao tratamento sem o ácido. Quanto às atmosferas, a melhor foi a 80/20 CO₂/N₂ com ou sem ácido e a pior a 100% de N₂ sem ácido.

Em relação às bactérias ácido-láticas (Figuras 3 e 4), em função de problemas de contaminação durante o desenvolvimento das análises bacteriológicas, algumas contagens não puderam ser realizadas. Entretanto, pelos resultados obtidos, pode-se perceber que o ácido láctico também teve uma ação inibitória sobre os micro-organismos. Analisando os dados do tratamento sem o ácido, observa-se que, semelhantemente ao comportamento dos micro-organismos mesófilos, a melhor atmosfera foi a 80/20 CO₂/N₂ e a pior a 100% de N₂ sem ácido. Além disso, a ação da EAM a 100% CO₂ também foi semelhante aos mesófilos, onde encontrou-se contagem de 5,0 Log UFC/g no tratamento sem o ácido e 5,8 no tratamento com ácido no nono dia.

Com relação aos psicrotóxicos (Figuras 5 e 6), no dia zero, os valores da contagem microbiana em ambos os tratamentos foram idênticos, diferindo dos micro-organismos mesófilos e bactérias ácido-láticas, cujos valores do tratamento com ácido foram inferiores aos valores das amostras-controle. Entretanto, a partir do dia um (1), os psicrotóxicos passam a ter um comportamento semelhante ao dos micro-organismos mesófilos, ou seja, valores inferiores aos do dia zero no tratamento com ácido (efeito bactericida) e tais valores também inferiores aos das amostras-controle (efeito bacteriostático).

No nono dia, semelhantemente aos mesófilos, em praticamente todas as atmosferas (exceto a 100% de CO₂) do tratamento com ácido, houve uma

inibição da multiplicação microbiana em relação às amostras-controle (sem ácido). Da mesma forma que os mesófilos, a 100% de N₂, houve quase o dobro de multiplicação microbiana na amostra-controle (8,2) em relação à adicionada de ácido (4,6). Ainda, a contagem do tratamento a 100% CO₂ sem adição do ácido também foi menor (4,4) do que do tratamento com o ácido (6,2).

No décimo sexto dia, também foram constatados valores inferiores no tratamento com ácido em relação ao tratamento sem ácido, exceto na atmosfera a 80/20 CO₂/N₂, onde a contagem microbiana do tratamento com ácido (5,8) foi próxima à do tratamento sem ácido (5,3), demonstrando que, semelhantemente às bactérias mesófilas, nesta concentração gasosa, a adição do ácido láctico não foi significativa do ponto de vista de inibição do crescimento microbiano.

De modo geral, pode-se observar que o comportamento dos psicrotóxicos foi muito semelhante ao dos mesófilos, demonstrando que nas amostras tratadas com ácido láctico

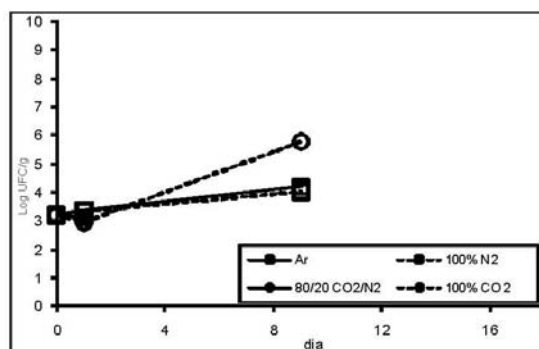


Figura 3: Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias ácido-láticas presentes nas amostras de linguiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas de ácido lático, realizadas em diferentes dias.

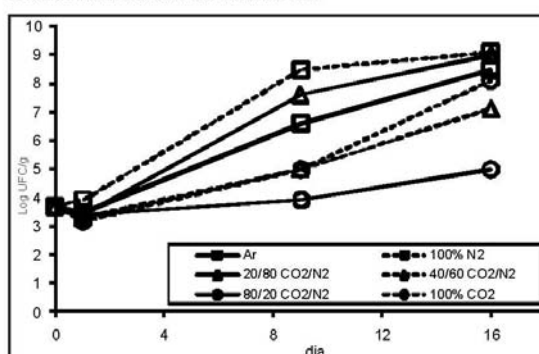


Figura 4: Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias ácido-láticas presentes nas amostras de linguiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, sem adição de ácido lático, realizadas em diferentes dias.

houve uma significativa inibição da multiplicação microbiana. Também da mesma forma, a atmosfera mais eficaz foi a 80/20 CO₂/N₂ com ou sem ácido e a pior a 100% de N₂ sem ácido.

É importante ressaltar que, tanto nos mesófilos como nos psicrotróficos, a adição do ácido lático não causou grandes alterações na atmosfera com 80/20 CO₂/N₂, uma vez que os resultados de ambos os tratamentos (com ácido e sem ácido), nos diferentes dias de análise, foram muito próximos. Tais resultados demonstram que, nesta concentração de CO₂, a adição do ácido não foi significativa, pois a concentração gasosa de 80/20 CO₂/N₂, por si só, já bastou para uma boa inibição da multiplicação dos micro-organismos.

No tratamento sem o ácido, tanto nas bactérias mesófilas e psicrotróficas, como nas ácido-láticas, a adição de 40/60 e 80/20 de CO₂/N₂ e 100% CO₂ mostrou-se eficaz na redução

das contagens até o nono dia de análise, retardando a multiplicação de micro-organismos em relação às atmosferas com 20/80 CO₂/N₂, 100% de N₂ e 100% de ar. Já no décimo sexto dia, a EAM a 100% CO₂ apresenta uma ação diferente do esperado quanto ao comportamento de tais micro-organismos, atingindo valores de contagens muito próximos aos valores das amostras embaladas a 100% ar. Em relação às bactérias ácido-láticas, tal fato se deve, provavelmente, em função do gás carbônico favorecer o crescimento de tais micro-organismos (Parry, 1993). Quanto aos demais micro-organismos, não foram encontradas possíveis explicações para tal comportamento.

Cabe ainda ressaltar que a EAM a 100% CO₂ teve uma ação diferente das demais no nono dia em relação ao comportamento das bactérias mesófilas, ácido-láticas e psicrotróficas, apresentando menor contagem no tratamento sem adição do ácido em relação ao tratamento com ácido.

De modo geral, quando da adição do ácido lático, o comportamento das bactérias mesófilas, psicrotróficas e ácido-láticas frente às diferentes atmosferas foi semelhante, apresentando uma inibição da multiplicação microbiana em todas as concentrações de gases utilizados, inclusive 100% de ar e 100% de N₂, sugerindo não haver o sinergismo esperado entre a adição de ácido e a utilização do CO₂ na EAM.

Cegielska e Pikul (2000) processaram três tipos de linguiça de frango fatiada, diferindo na composição, no grau de cominuição e quantidade de bactérias psicrotróficas e ácido láticas. Foram embaladas a vácuo, em EAM (75/20/5 CO₂/N₂/O₂) ou em ar e estocadas entre 0-2°C. Concluíram, ao final do experimento, que linguiças com alto grau de cominuição e de carne desossada mecanicamente devem ser embaladas em EAM, pois tal tratamento resultou numa validade comercial duas a cinco vezes maiores do que as linguiças embaladas em ar e uma semana a mais do que as embaladas a vácuo. Semelhantemente a estes autores, no presente experimento também se observou um aumento da validade comercial da linguiça de frango quando esta fora embalada em concentrações de 40/60 e 80/20 de CO₂/N₂ em relação à embalada em ar, quando do tratamento sem o ácido.

Alguns autores sugerem um pré-tratamento das carcaças de frango como uma forma de descontaminação, e assim também proporcionando um aumento da validade comercial do produto. Sawaya et al. (1995) estudaram a validade comercial de carcaças de frango tratadas previamente com uma solução de ácido lático e embaladas em EAM (70/25/5 CO₂/N₂/O₂). Ao final do trabalho, concluíram que o pré-tratamento das carcaças com o ácido lático, com ou sem EAM, proporcionou uma potencial alternativa para aumento da validade comercial da linguiça de frango. Da mesma forma, observou-se no presente trabalho, que a adição do ácido lático à massa da linguiça significou uma ótima alternativa para aumento da validade comercial do produto, independentemente se embalada ou não em EAM. Ainda

64

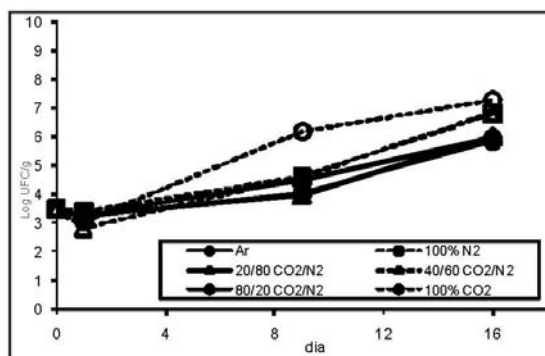


Figura 5: Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas presentes nas amostras de linguiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

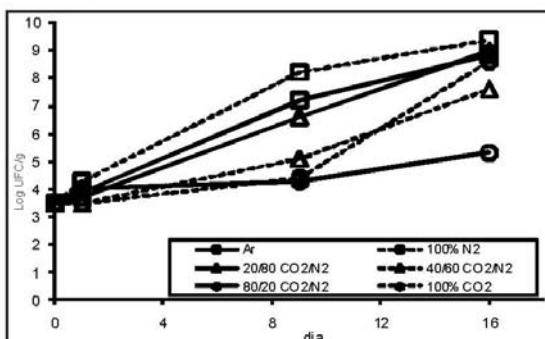


Figura 6: Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas presentes nas amostras de linguiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, sem adição de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

Zeitoun e Debevere (1992) procedendo a uma descontaminação de coxas de frango com uma solução de ácido láctico/lactato de sódio em combinação com EAM, observaram que, quando o produto não era tratado com ácido láctico, a validade comercial era 1,0; 2,3 e 4,0 dias mais curta. Diferentemente, Zeitoun (1992) concluiu que o uso combinado de uma solução de ácido láctico com EAM proporcionou melhor validade comercial à carne de frango do que o uso de tais métodos de conservação isoladamente.

Lopes et al. (2004), trabalhando com linguiça de frango submetida às mesmas concentrações de gases utilizadas no presente experimento, ao final de 21 dias, semelhantemente, concluíram que a amostra embalada a 80/20 de CO₂/N₂ apresentou o maior tempo de validade comercial.

Com relação ao ácido láctico, Rondini et al. (1997) comprovaram o uso do lactato de sódio para prolongamento da validade comercial da linguiça fresca de frango. Tais autores processaram três diferentes formulações de linguiça: sem adição do lactato de sódio; 1,5% do ácido a pH 7,0 e 1,5% do ácido a pH 5,5. As linguiças foram embaladas em envoltórios permeáveis a gases ou em EAM (80/20 O₂/N₂) e estocadas a 6°C. Ao final do trabalho, semelhantemente ao uso do ácido láctico neste trabalho, os autores concluíram que, de modo geral, o lactato de sódio reduziu o crescimento microbiano, proporcionando um aumento da validade comercial do produto. Além disso, a EAM também proporcionou melhor validade comercial do que a embalagem convencional (ar).

Durante o experimento, não se observou o crescimento de enterobactérias e *Pseudomonas*, demonstrando a inocuidade da matéria-prima, bem como a aplicação das boas práticas de fabricação durante o processo de elaboração da linguiça.

Segundo Parry (1993), o gás carbônico tem uma ação inibitória muito efetiva sobre as bactérias aeróbias da decomposição, Gram-negativas, tais como *Pseudomonas*. Entretanto, tal afirmativa não pôde ser utilizada como justificativa para o não crescimento de *Pseudomonas* neste experimento, uma vez que tal crescimento não foi observado em nenhuma das atmosferas, inclusive nas que não possuíam o CO₂.

Quanto às enterobactérias, Zeitoun et al. (1994), analisando o uso destas como indicadoras de higiene no processamento de coxas de frango, observaram que o tratamento das coxas com uma solução de ácido láctico a 10% eliminou as enterobactérias significativamente. Entretanto, neste trabalho, também não se pode afirmar que as enterobactérias não cresceram em função da ação do ácido láctico adicionado, uma vez que, na amostra-controle (sem adição do ácido), também não se observou crescimento.

Em relação ao pH (Figuras 7 e 8), pode-se observar que a adição de 0,15% de ácido láctico provocou uma queda do pH de 5,89 para em média de 5,50, suficiente para acarretar uma inibição significativa da taxa de multiplicação microbiana nas diferentes atmosferas, exceto na 80/20 CO₂/N₂.

É importante ressaltar que, embora a literatura (Pardi, 1996; Ferreira, 1999) recomende concentrações de 0,5 a 2,0% de ácido láctico como agente conservador, neste trabalho, foi utilizada uma concentração inferior (0,15%), uma vez que outras duas barreiras (EAM e refrigeração) estariam sendo utilizados concomitantemente. Ao final do experimento, pode-se observar que, a concentração de 0,15% de ácido láctico adicionada à massa da linguiça de frango, foi suficiente para acarretar uma inibição dos micro-organismos, demonstrando que, em concentrações inferiores a 0,5%, a ação do ácido láctico também é efetiva.

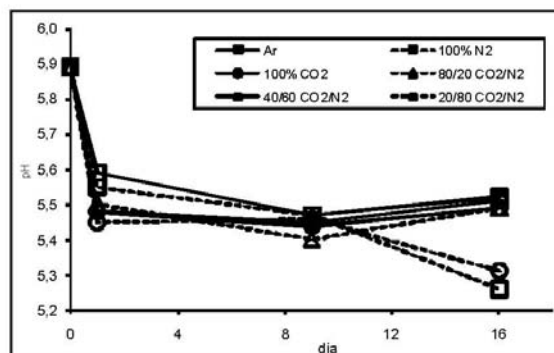


Figura 7: Representação gráfica dos resultados dos valores de pH das amostras de linguiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

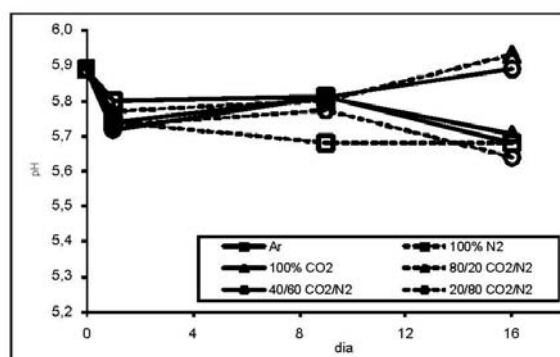


Figura 8: Representação gráfica dos resultados dos valores de pH das amostras de linguiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, sem adição de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, sob o ponto de vista microbiológico, pode-se concluir que a embalagem em atmosfera modificada (EAM) a 80/20 CO₂/N₂, com ou sem ácido, mostrou-se como o método de conservação mais eficaz. As EAM a 40/60 e 80/20 CO₂/N₂, sem ácido láctico, retardaram o crescimento microbiano, comparativamente às EAM a 20/80 CO₂/N₂, 100% N₂ e 100% ar, aumentando a validade comercial do produto.

A utilização do ácido láctico, a 0,15%, não provocou grandes variações de pH, mas demonstrou ser um aditivo eficaz na conservação de linguiças de frango, embaladas ou não em atmosfera modificada. Sugere-se, de acordo com as conclusões acima e baseado na literatura consultada, que mais estudos sejam realizados no sentido de avaliar o comportamento dos micro-organismos frente a outras atmosferas modificadas; avaliar a ação da EAM a 100% CO₂ sob o aspecto microbiológico, buscando as possíveis causas do seu efeito diferenciado sobre os micro-organismos observado neste experimento; avaliar o comportamento dos micro-organismos frente a um pré-tratamento ("lavagens") com ácido láctico da matéria-prima cárnea a ser utilizada no processamento da linguiça, resultando numa redução da carga microbiana inicial e analisar o produto (linguiça fresca de frango), submetido aos diferentes tratamentos avaliados neste experimento, também sob o ponto de vista sensorial.

Referências

- CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA, R.; PIKUL, J. Modified atmosphere packaging as a way of prolonging shelf-life of sliced poultry sausages stored in refrigerated conditions. *Chłodnictwo*, v. 35, n. 7, p. 37-41, 2000.
- CONTE-JÚNIOR, C. A.; FERNÁNDEZ, M. e MANO, S.B. Use of carbon dioxide to control the microbial spoilage of bullfrog (*Rana catesbeiana*) meat. In: Mendez-Vilas, A. *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and Their Interactions*. Hardcover. Ed. Wiley-VCH. 822 p, 2006.
- FERREIRA, M. S. Lactatos de sódio e potássio aumentam vida-de-prateleira e melhoram a segurança. *Revista Nacional da Carne*, n. 270, p. 58-59, 1999.
- LOPES, M. M.; CONTE JUNIOR, C. A.; PEIXOTO, B. T. M.; SOUZA, V. G.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; PARDI, H. S.; MANO, S. B. Efeito da embalagem em atmosfera modificada sobre a conservação de linguiça fresca de frango. *Higiene Alimentar*, v. 18, p. 60-65, 2004.

- MALAVOTA, L. C. M.; CONTE-JUNIOR, C. A.; LOPES, M. M.; SOUZA, V. G.; PEIXOTO, B. T. M.; STUSSI, J. S. P.; PARDI, H. S.; MANO, S. B. Análise micológica de linguiça de frango embalada em atmosfera modificada. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 13, n. 1, p. 3-9, 2006.
- PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. *Ciência, higiene e tecnologia da carne*. Niterói: EdUFF, 1996. v. 2. 1110 p.
- PARRY, R. T. *Envasado de los alimentos en atmósfera modificada*. Madrid: A. Madrid Vicente, 1993. 331 p.
- 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. 2-9, p. 12-16, 1997.
- SAWAYA, W. N.; ELNAWAWY, A. S.; AL ZENKI, S.; AL OTAIBI, J.; AL OMIRAH, H.; AL AMIRI, H. Storage stability of chickens as affected by MAP and lactic acid treatment. *Journal of Food Science*, v. 60, n. 3, p. 611-614, 1995.
- VANDERZANT, C. e SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), Capítulo 4, p. 75-94, 1992.

66

ZEITOUN, A. A. M. Use of lactic buffers and modified atmosphere packaging to improve shelf-life and safety of poultry. *Voedingsmiddelentechnologie*, v. 25, n. 13, p. 50, 1992.

ZEITOUN, A. A. M.; DEBEVERE, J. M. Decontamination with lactic acid/sodium lactate buffer in combination with modified atmosphere packaging effects on the shelf life of fresh poultry. *International Journal of Food Microbiology*, v. 16, n. 2, p. 89-98, 1992.

ZEITOUN, A. A. M.; DEBEVERE, J. M.; MOSSEL, D. A. A. Significance of Enterobacteriaceae as index organisms for hygiene on fresh untreated poultry, poultry treated with lactic acid and poultry stored in a modified atmosphere. *Food Microbiology*, v. 11, n. 2, p. 169-176, 1994.

6.2 CURRENT RESEARCH, TECHNOLOGY AND EDUCATION TOPICS IN APPLIED MICROBIOLOGY AND MICROBIAL BIOTECHNOLOGY

Effect of modified atmosphere packaging on the growth/survival of *Yersinia enterocolitica* and natural flora on fresh poultry sausage

C.A. Conte-Junior^{1,2*}, B.T. Macedo¹, M.M. Lopes¹, R.M. Franco¹, M.Q. Freitas¹, M. Fernandez² and S.B. Mano¹

¹ Department of Food Technology, Faculty of Veterinary Science, Universidade Federal Fluminense, Vital Brazil Filho, 64, CEP: 24230-340, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil.

² Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, CP: 28040, Madrid, Spain.

Modified atmosphere packaging (MAP) is increasingly used to extend shelf-life of fresh produce. In the present work, we determine the survival and growth of *Yersinia enterocolitica* and aerobic mesophiles on fresh poultry sausage under MAP. Samples were divided in two lots, half inoculated with 10^5 cfu g⁻¹ of *Y. enterocolitica* ATCC 9610, and half uninoculated control samples. The inoculated and control samples were packaged in different CO₂ concentrations and storage at 4±1°C, during 19 days. Parameters of microbial growth (lag and log phase) were determined by Baranyi and Roberts's equation. Aerobic mesophiles counts presented similar lag and log phase in all samples, except for the ones packaged with 20% CO₂. In the inoculated samples *Y. enterocolitica* showed negative log phase in 100% CO₂, 80% CO₂, and 40% CO₂, 2.1 days in 20% CO₂, and approximately 0.3 day in air and 100% N₂. The lag phase varied from 0.9 to 12.0 days (air and 100% CO₂, respectively). Results show that MAP slowed the growth of *Y. enterocolitica* due to the bacteriostatic effect of CO₂ on the development of this pathogen in the samples, but MAP itself was not able to eliminate this pathogen.

Keywords carbon dioxide; MAP; pathogen

1. Introduction

Poultry is considered one of the most important animal protein sources for the world population [1, 2]. In Brazil, aviculture has significantly grown for the past ten years. Brazil is already the biggest poultry meat exporters in the world. In the year 2007, Brazil produced 9,700 thousand tons and exported 3,203 thousand tons of poultry meat, excluding industrialized products. In 2000, the Brazilian annual poultry consumption was 5,110 thousand tons, this number rising to 7,120 thousand tons in 2007 [3]. In addition to this, the poultry industry has started to develop new products, such as sausages and other industrialized products [4, 5].

Modified atmosphere packaging (MAP) technology provides a method of offering to consumers fresh products with a longer shelf-life [6]. This technology can be used by the food industry as an efficient tool to launch new products, providing convenience and practicability to them [7, 8]. At the present time, the food sector requires technologies that can replace preservation methods which can alter food chemically and physically by less severe methods, such as MAP technology [9, 10].

However, an extended shelf-life can lead to an increase of the microbiological risk. Any attempt of extending the shelf-life of foods should consider the potential health hazard posed by the growth of the cold-tolerant pathogens [10, 11, 12, 13]. *Y. enterocolitica* is a psychrotrophic pathogen, able to grow and reach high concentrations in a short period of time, when in refrigeration temperature [14, 15]. Yersiniosis is mostly a food borne disease. When acquired by contaminated food this pathogen can cause gastroenteritis with diarrhea and/or vomit, even though, fever and abdominal pain [16, 17, 18]. This microorganism may also cause infection in other sites such as wounds, joints and urinary tract [19].

The objective of this study was to evaluate the growth/survival of aerobic mesophiles and *Y. enterocolitica*, when contaminating fresh poultry sausage, in MAP with different concentrations of CO₂ (100% CO₂, 100% N₂, 20/80 CO₂/N₂, 40/60 CO₂/N₂, 80/20 CO₂/N₂). For this purpose, the conditions and velocity of the growth of this pathogen in MAP environment and in aerobiosis, at 4±1°C, were studied.

2. Materials and methods

2.1 Sausage preparation

Fresh poultry sausages were elaborated at the Laboratory of Meat Technology, Faculty of Veterinary, Universidade Federal Fluminense, according to the following formulation: 85.5% poultry breast, 10% pork belly, 1.5% salt, 0.25% powdered garlic, 0.20% white pepper, and 3% sterilized distilled water. A total of 5 Kg of fresh poultry sausage were elaborated. Chicken breast fillets and pork belly were grinded together in a grinder equipped with a disk of 1 mm of diameter. Grinded meat and pork belly were mixed manually with the condiments and distilled water, until the 5 Kg

sausage mixture was totally homogenized. Then, the sausage mass was divided into two lots of 2.5 Kg each. A suspension of 10^5 cfu g⁻¹ of *Y. enterocolitica*, ATCC 9610, was inoculated into one of the batches by manual mixing.

Both control and inoculated batches were stuffed in artificial collagen casings, 'Coria' FSC 21 x 40, using a stuffing machine 'Picelli', with a 10 mm diameter stuffer. The control batch was stuffed before the inoculated one. A total of 180 small (10.0 x 1.5 cm) sausages was manufactured, 90 control sausages and 90 inoculated sausages.

2.2 *Yersinia enterocolitica* strain

The pathogen strain of *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 [20] was obtained from the Health Quality Control National Institute, at the Oswaldo Cruz Foundation.

2.3 Modified atmosphere packaging

Six lots of fifteen control sausages and fifteen sausages inoculated with *Y. enterocolitica* were packaged with either 1 L of 100% air, 100% N₂, 100% CO₂, or 20/80, 40/60, or 80/20 CO₂/N₂ in an 'FAMABRAS' (Model TEC MAQ sealed in vacuum AP 450) packaging machine, which, finally, heat-sealed the bags. 'White Martins LTDA' supplied the gases. Each sausage was packaged alone in one bag of 20 x 22 cm 'Cryovac' BB4L, with diffusion coefficients, according to the supplier, of 150 cm³/24h.m².bar to CO₂, 35 cm³/24h.m².bar to O₂ and 1.4 cm³/24h.m².bar to N₂ at 22°C. All packaged sausages were kept under refrigeration, at 4±1°C.

2.4 Microbial analyses

Microbial analyses were performed on duplicate samples, i.e. two slices from different bags. After opening the bags, slices (10g) were immersed in 90 ml sterile physiological saline solution (0.85% NaCl) and homogenized in a stomacher (Colworth Stomacher 400 Lab Blender, Seward, U.K.) for 15s. After, decimal dilutions were prepared in saline solution.

Aerobic mesophiles counts were determined by the pour plate technique [21], in Plate Count Agar PCA (Merck), incubated at 35°C for 48h. *Yersinia enterocolitica* counts were performed by the spread plate technique [21], in *Yersinia* Selective Agar Base (Oxoid) with selective supplement SR109 (cefesulodin 1.5%, igarsan 0.4% and novobiocin 0.25%), at 32°C for 24h.

Aerobic mesophiles and *Y. enterocolitica* counts were determined after 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 14, 16, and 19 days of storage. Both control and inoculated samples were analyzed for periodic aerobic mesophiles counts. Only inoculated samples were analyzed for *Y. enterocolitica* counts.

Bacterial growth parameters (lag phase and log phase) were assessed using the Baranyi and Roberts [22] equations and the self-life of meat was defined as days to reach 10^7 cfu g⁻¹.

3. Results

Figure 1 shows the growth curves of aerobic mesophiles in the control and inoculated samples packaged in the six atmospheres assayed in the present work.

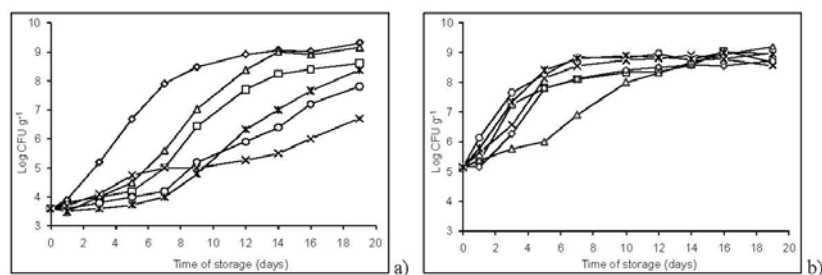


Fig. 1 Aerobic mesophiles growth curves in the control (a) and inoculated (b) samples packaged in: (□) 100% air, (○) 100% N₂, (△) 20/80 CO₂/N₂, (◇) 40/60 CO₂/N₂, (×) 80/20 CO₂/N₂, and (∗) 100% CO₂, stored at 4±1°C.

In the control samples, the initial count was 4.4×10^3 cfu g⁻¹. Among the six atmospheres tested during the 19 days of experiment, MAP with 20/80 CO₂/N₂ and with 100% N₂ showed the highest counts of aerobic mesophiles on day 19, reaching 7.5×10^9 cfu g⁻¹ and 9.6×10^9 cfu g⁻¹, respectively. On the other hand, MAP with 40/60 CO₂/N₂ and 80/20 CO₂/N₂ showed the lowest levels of aerobic mesophiles, reaching 6.2×10^7 cfu g⁻¹ and 5.2×10^6 cfu g⁻¹, on day 19,

respectively. Thus, both atmospheres (80/20 CO₂/N₂ and 40/60 CO₂/N₂) showed the best behavior for aerobic mesophiles, presenting, together with lower counts, a higher log time (Table 1).

According to Figure 1a, aerobic mesophiles already started to grow on day one in samples packaged in 100% N₂. In samples packed in 100% air and in 20/80 CO₂/N₂ aerobic mesophiles increased their growth rate after day 5. The same happened in samples packaged in 40/60 CO₂/N₂ and in 100% CO₂, on day 7. Samples packaged in 80/20 CO₂/N₂ showed as light growth of aerobic mesophiles after day 1, stabilizing at day 5, and growing again on day 9.

Figure 1b shows the growth curves of aerobic mesophiles in the inoculated samples. Due to the presence of *Y. enterocolitica*, the initial count of mesophiles was much higher than in control samples. For the same reason, in comparison with the control samples, counts reached higher values in less time in the inoculated samples, approximately 10⁹ cfu g⁻¹ at the end of the experience, except for MAP with 80/20 CO₂/N₂ and 40/60 CO₂/N₂ which achieved a maximum of 10⁸ cfu g⁻¹. The atmosphere with the 100% N₂ recorded the highest counts, with 6.6x10⁹ cfu g⁻¹ at day 19.

The six curves followed the same pattern, showing expressive growth already on day 1. Counts reached values of approximately 10⁸ cfu g⁻¹ on day 5 in MAP with 40/60 CO₂/N₂, 80/20 CO₂/N₂, and 100% CO₂, and on day 7 in 100% air and 100% N₂. MAP with 20/80 CO₂/N₂ presented discrete growth until day 7 (10⁶ cfu g⁻¹) and more expressive growth at day 10 (10⁸ cfu g⁻¹).

Table 1 shows the growth parameters (lag-phase, log-phase and number of cells in the stationary phase) of aerobic mesophiles in the control and inoculated samples. In control samples, the log phase was longer in MAP with 40/60 CO₂/N₂ and 80/20 CO₂/N₂ which also presented lower doubling time and achieved lower counts in the stationary phase.

Table 1 Growth parameters of aerobic mesophiles in the control and inoculated samples packed in 100% air and in different MAP, stored at 4±1°C.

Atmosphere	Parameter	Control	Inoculated
100% Air	Lag	4.3	0.3
	Log	13.7	11.0
	NC	8.7	8.5
100% N ₂	Lag	0.4	1.5
	Log	11.1	9.3
	NC	9.0	8.6
20/80 CO ₂ /N ₂	Lag	4.3	0.5
	Log	6.6	25.5
	NC	9.0	9.2
40/60 CO ₂ /N ₂	Lag	4.6	0.0
	Log	22.9	10.1
	NC	8.2	8.8
80/20 CO ₂ /N ₂	Lag	0.0	0.3
	Log	44.7	11.5
	NC	7.4	8.8
100% CO ₂	Lag	6.2	0.0
	Log	16.0	10.3
	NC	8.5	8.9

Lag – Lag-phase (days).

Log – Log-phase (hours).

NC – Number of cells in the stationary phase (log cfu g⁻¹).

In inoculated samples, MAP with 20/80 CO₂/N₂ showed the longest log-phase. But also the highest values in the stationary phase, opposite to what happened in the control samples. In the other five MAP tested, mesophiles presented similar log and lag phases (Table 1).

Figure 2 shows the growth curves of *Y. enterocolitica* in the inoculated samples in the six atmospheres tested. The initial count was 8.2x10⁴ cfu g⁻¹. Inoculated samples packaged in 100% air and in MAP with 100% N₂ presented the highest counts, about 10⁷ cfu g⁻¹. The lowest counts of *Y. enterocolitica* were recorded in the MAP with 100% CO₂, decreasing its number from the initial values to 5.3x10⁴ cfu g⁻¹, at day 19.

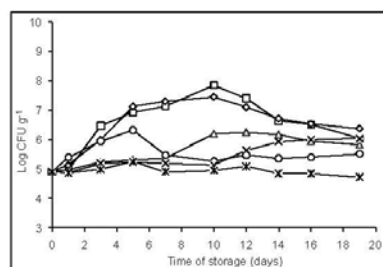


Fig. 2 *Y. enterocolitica* growth curves in the inoculated samples packaged in: (□) 100% air, (◇) 100% N₂, (△) 20/80 CO₂/N₂, (○) 40/60 CO₂/N₂, (×) 80/20 CO₂/N₂, and (*) 100% CO₂, stored at 4±1°C.

MAP with 100% CO₂ presented a very discrete growth during the whole experience, even registering the lowest counts at day 19. Growth was delayed in MAP with 80/20 CO₂/N₂ until day 12, reaching 10⁶ cfu g⁻¹ at day 14. In MAP with 40/60 CO₂/N₂ the maximum growth was observed on day 5 (10⁶ cfu g⁻¹) and then a slight decrease was noticed remaining with counts around 10⁵ cfu g⁻¹ until the end of experiment. In MAP with 20/80 CO₂/N₂ a gradual growth of the pathogen was observed until day 12, reaching its highest value, and then decreasing its number until day 19. The most significant growth of *Y. enterocolitica* was observed in inoculated samples packaged in 100% air and in 100% N₂. In both environments a gradual growth of *Y. enterocolitica* was verified, achieving the maximum values at day 10.

Table 2 shows the growth parameters of *Y. enterocolitica*. This microorganism presented the longest lag-phase in MAP with 80/20 CO₂/N₂. Negative lag-phases were detected in MAP with 40/60 CO₂/N₂ and 100% CO₂. The pathogen was not capable of growing in both environments. Its population decreased to lower values than the initial counts. *Y. enterocolitica* presented a shorter lag-phase and higher counts in the stationary phase in 100% air and 100% N₂.

Table 2 Growth parameters of *Yersinia enterocolitica* in the inoculated samples packaged in 100% air and in different MAP, stored at 4±1°C.

Atmospheres	Parameter	<i>Y. enterocolitica</i>
100% Air	Lag	0.9
	Log	9.5
	NC	6.9
100% N ₂	Lag	2.5
	Log	3.4
	NC	6.8
20/80 CO ₂ /N ₂	Lag	2.3
	Log	50.7
	NC	6.1
40/60 CO ₂ /N ₂	Lag	5.0
	Log	-497.6
	NC	4.9
80/20 CO ₂ /N ₂	Lag	1.2
	Log	108.5
	NC	6.0
100% CO ₂	Lag	12.0
	Log	-117.5
	NC	4.7

Lag – Lag-phase (days).

Log – Log-phase (hours).

NC – Number of cells on stationary phase (log cfu g⁻¹).

4. Discussion

The growth pattern of aerobic mesophiles observed in the control samples packaged in 100% air and in 100% N₂ (Figure 1a), agrees with the one described by Kakouri and Nychas [23], who also found higher counts in shorter time in packages with 100% N₂ than in samples packaged in 100% air. On the contrary, Mano et al. [24] observed in turkey meat, stored at 7°C, higher counts in samples packaged with 100% air. However, these differences could be attributed to the storage temperature and the product studied.

Aerobic mesophiles took 16 days to reach 10⁷ cfu g⁻¹ in packages with 100% CO₂ in Figure 1a. However, Kakouri and Nychas [23], Hudson et al. [25], and Bell et al. [26] found that aerobic mesophiles needed approximately 10 days to

achieve these counts in the same atmosphere in different products, i.e. poultry meat, smoked cod, and red meat, respectively. It stands to reason that the pH of poultry sausage is lower than that of poultry meat itself. The sausage tested in this experiment presented pH 5.9, on day 0, which could have contributed to delay the bacterial growth. Furthermore, poultry sausage contains salt and condiments that can also contribute for retardation and/or the inhibition of microbial growth. The initial counts found by the above mentioned authors were higher than we observed in the present work (Figure 1a – 4.4×10^3 cfu g⁻¹ mesophiles) but the storage temperatures were also different. Both factors certainly influenced the disparity of results found by the different authors.

Zeitoun et al. [27] detected 2.5×10^7 cfu cm⁻² of mesophiles around day 6, in poultry meat samples packaged in MAP with 90/10 CO₂/O₂. According to Figure 1a, aerobic mesophiles grew slower under 80/20 CO₂/N₂. The different behavior observed can be explained by the use of O₂ combined with CO₂ instead of N₂. It stands to reason that O₂ favors the growth of aerobic bacteria. Moreover, N₂ does not have the same effect [28].

The inoculated samples showed high initial counts of mesophiles, which could have interfered on the bacteriostatic effect of CO₂. The same was observed by Sarantópoulos et al. [29]. In addition to this, the growth curves of aerobic mesophiles in the inoculated samples packaged in modified atmospheres reached higher values in shorter time in comparison with the control samples (Figures 1a and 1b), and presented pretty short lag and log phases (Table 1).

Y. enterocolitica did not grow in the samples packaged in MAP with 100% CO₂, and even reduced its population. The same was observed by Hudson et al. [25], Bell et al. [26], Doherty et al. [30], Bodnaruk and Draughon [31] and Tassou et al. [32]. These authors assayed different products and storage temperatures, which can confirm the bacteriostatic effect of 100% CO₂ on the pathogen *Y. enterocolitica*.

In the inoculated samples packaged in 100% air and in 100% N₂, *Y. enterocolitica* increased its population up to three logarithmic cycles. Shenoy and Murano [33] also detected the growth of this organism in chopped pork meat packaged in air and stored at 4°C. Doherty et al. [30] detected growth of *Y. enterocolitica* in lamb meat packaged in 100% air, and stored at 0°C and 5°C. Wei et al. [34] also verified the growth of the pathogen in poultry meat packaged in 100% air. Thus *Y. enterocolitica* is capable of growing in 100% air and in MAP with 100% N₂, when stored at 4±1°C.

Although *Y. enterocolitica* can grow in MAP with 20/80 CO₂/N₂, its growth can be strongly influenced by the storage temperature. In the present study *Y. enterocolitica* reached counts up to 10^6 cfu g⁻¹ in this atmosphere. Manu-Tawiah et al. [35] also detected growth in chopped pork meat, using the same MAP and temperature, with counts up to 10^7 cfu cm⁻². However, Van Den Elzen et al. [36] observed a very discrete growth of this pathogen in pork meat, in MAP with 25/65/10 CO₂/O₂/N₂, stored in 3°C, with counts only up to one logarithmic cycle above the initial count. The association of CO₂ and O₂ tends to inhibit the growth of this pathogen, which can explain the differences between the results described above.

In 40/60 CO₂/N₂, *Y. enterocolitica* counts slightly increased until day 5, decreasing afterwards. In addition, it can be observed in Table 2 that the pathogen was not capable of growing. During the stationary phase it decreased in comparison with the initial counts. However, Doherty et al. [30] and Shenoy and Murano [33] detected *Y. enterocolitica* growth in MAP with 50/50 CO₂/N₂. The different gas concentrations, MAP with 50/50 CO₂/N₂ and 40/60 CO₂/N₂, and the different product (pork meat) used in the experiments might explain the disparity of results.

Hudson et al. [25] stated that to inhibit the growth of psychrotrophic pathogens it is necessary an atmosphere with more than 75% CO₂ and total absence of O₂. In the presence of O₂, higher concentrations of CO₂ are necessary. The effect of MAP with O₂ on the growth of *Y. enterocolitica* was not studied in the present work. The results exposed on Figure and Table 2 show that the pathogen was able to grow in MAP with 80/20 CO₂/N₂, which does not agree with Hudson et al. [25]. Nevertheless, it was a discrete growth, presenting a pretty long log-phase (108.5 hours) compared to the growth in samples packaged in 100% air (9.5 hours). These observations confirm the bacteriostatic effect of CO₂.

The influence of competitive microbial population was evidenced by the growth of aerobic mesophiles, which presented much higher counts when compared to *Y. enterocolitica*, during the 19 days of experiment in all the inoculated samples and MAP tested (Tables 1 and 2).

The infective dose of *Y. enterocolitica* in food is still unknown [37]. However, Bhaduri and Turner-Jones [38] stated that the virulent characteristics of this microorganism remain the same, even in anaerobiosis and in mixtures of CO₂ and other gases, being able to cause foodborne disease. The study of *Y. enterocolitica* in MAP food becomes significant to public health, provided that this pathogen can be present in food and is able to grow in those conditions, even in low levels.

5. Conclusions

According to this research, it can be concluded that MAP with 80/20 CO₂/N₂ is the best choice for fresh poultry sausage. This atmosphere controlled the growth of aerobic mesophiles. In those conditions, mesophiles showed a low growth rate and moderate counts. This MAP was also capable of inhibiting *Yersinia enterocolitica*, although other factors can influence its development. Therefore, it can be concluded that MAP itself is not able to eliminate this pathogen in fresh poultry sausage. However, it can collaborate, sometimes precisely, by controlling its development, avoiding its growth and even reducing its population.

Packaging in 100% air and in 100% N₂ should not be used for fresh poultry sausage. Moreover, it enhances the rapid growth of not only the natural microbiota, but also of *Y. enterocolitica*, being able to reach high counts and thus, representing a serious risk for public health.

Further research on the pathogen *Y. enterocolitica* and its behavior in different MAP is still necessary for the development of packaging of different animal origin products. It is likely that the effectiveness of the technique shall be optimized so that ideal concentrations of gases in MAP can be established for each type of product.

Acknowledgements This work was supported by the 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)'. The CAPES of the Brazil Government grants author B.T. Macedo. We are grateful to David Bailey for English critical reading of this manuscript.

References

- [1] Rust RE. Productos embutidos. In: Price JF, Schweigert BS, eds. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Zaragoza: Acribia Press; 1994:415-439.
- [2] Lopes MM, Silva LP, Conte-Junior CA, Teodoro AJ, Mano SB, Freitas MQ, Franco RM, Pardi HS. Aspectos bacteriológicos e físico-químicos da lingüiça fresca de frango. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 2007;102:331-338.
- [3] Associação Brasileira dos Exportadores de Frango. The ABEF page. Available at: <http://www.abef.com.br/estatisticas>. 08. Accessed May 26, 2010.
- [4] Madava R, Hoogenkamp H. The role of processed products in the poultry meat industry. In: Richardson IR, Mead GG, eds. *Poultry Meat Science*. Wallingford: CABI Publishing; 1999:396-410.
- [5] Silva LP, Lopes MM, Mano SB, Mársico ET, Conte-Junior CA, Teodoro AJ, Guedes WS. Influência da adição de polifosfato em lingüiça de frango. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 2008;15:50-55.
- [6] Mano SB, Garcia de Fernando GD, López-Gálvez D, Selgas MD, Garcia ML, Cambero MI, Ordoñez JA. Growth/survival of natural flora and *Listeria monocytogenes* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged under modified atmosphere. *J. Food Safety*. 1995;15:305-319.
- [7] García de Fernando GD, Nychas GJE, Peck MW, Ordoñez JA. Growth/survival of psychrotrophic pathogens on meat packaged under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*. 1995;28:221-231.
- [8] Conte-Junior CA, Fernández M, Mano SB. Use of carbon dioxide to control the microbial spoilage of bullfrog (*Rana catesbeiana*) meat. In: Méndez-Vilas A, ed. *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and their Interactions*. Weinheim: Wiley-VCH; 2006:356-361.
- [9] Sarantópoulos CIGL, Alves RMV, Contreras CJC, Galvão MTEL, Gomes TC. Use of a modified atmosphere masterpack for extending the shelf life of chicken cuts. *Packaging Technology and Science*. 1998;11:217-229.
- [10] Mano SB, Ordoñez JA, Garcia de Fernando GD. Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres. *Food Microbiology*. 2000;17:657-669.
- [11] Church N. Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies. *Trends in Food Science & Technology*. 1994;5:345-352.
- [12] Phillips CA. Review: modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science and Technology*. 1996;31:463-479.
- [13] Woods LFJ, Church P N. Strategies for extending the shelf-life of poultry meat and products. In: Richardson IR, Mead GG, eds. *Poultry Meat Science*. Wallingford: CABI Publishing; 1999:297-310.
- [14] Nortjé GL, Vorster SM, Greebe RP, Steyn PL. Occurrence of *Bacillus cereus* and *Yersinia enterocolitica* in South Africa retail meats. *Food Microbiology*. 1999;16:213-217.
- [15] Tompkin RB, Mcnamara AM, Acuff GR. Meat and poultry products. In: Downes FP, Ito K, eds. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: American Public Health Association; 2001:421-428.
- [16] Bourgeois C. Conservación en atmósferas modificadas. In: Bourgeois MC, Mesle FJ, Zucca J, eds. *Microbiología alimentaria aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*. Zaragoza: Acribia; 1994:409-421.
- [17] Dromigny E. *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*. In: Bourgeois MC, Mesle FJ, Zucca J, eds. *Microbiología alimentaria aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*. Zaragoza: Acribia Press. 1994:113-129.
- [18] Center for Disease Control and Prevention. The CDC page. *Yersinia enterocolitica*. Available at: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/yersinia_g.htm. Accessed May 27, 2010.
- [19] United States Food & Drug Administration. The FDA page. *Yersinia enterocolitica*. In: *Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook*. Available at: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070040.htm>. Accessed May 27, 2010.
- [20] Krieg NR, Holt JG. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Baltimore, Md: Williams and Wilkins; 1984.
- [21] Vanderzant C, Splittstoesser DF. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3rd ed. Washington, Md: American Public Health Association; 1992.
- [22] Baranyi J, Roberts TA. A dynamic to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*. 1994;23:277-294.
- [23] Kakouni A, Nychas GJE. Storage of poultry meat under modified atmospheres or vacuum packs: possible role of microbial metabolites as indicator of spoilage. *Journal of Applied Bacteriology*. 1994;76:163-172.
- [24] Mano SB, Ordoñez JA, Fernando, GDG. Aumento de la vida útil y microbiología de la carne de pavo envasada en atmósferas modificadas. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 1999;6:55-65.

- [25] Hudson AJ, Mott SJ, Penney N. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. *Journal of Food Protection*. 1994;57:204-208.
- [26] Bell GR, Penney N, Moorhead SM. Growth of the psychrotrophic pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, and *Yersinia enterocolitica* on smoked blue cod (*Paraperis colias*) packed under vacuum or carbon dioxide. *International Journal of Food Science and Technology*. 1995;30:515-521.
- [27] Zeitoun AAM, Debevere JM, Mossel DAA. Significance of Enterobacteriaceae as index organisms for hygiene on fresh poultry, poultry treated with lactic acid and poultry stored in modified atmosphere. *Food Microbiology*. 1994;11:169-176.
- [28] Guynot ME, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ. Modified atmosphere packaging of mold spoilage of bakery products with different pH and water activity levels. *Journal of Food Protection*. 2003;66:1864-1872.
- [29] Sarantópoulos CIGL, Alves RMV, Oliveira LM, Gomes TC. *Embalagens com atmosfera modificada*. 2nd ed. Campinas, Md: CETEA/ITAL Press; 1998.
- [30] Doherty A, Sheridan JJ, Allen P, McDowell DA, Blair YS, Harrington D. Growth of *Yersinia enterocolitica* O:3 on modified atmosphere packaged lamb. *Food Microbiology*. 1995;12:251-257.
- [31] Bodnaruk PW, Draughon, FA. Effect of packaging atmosphere and pH on the virulence and growth of *Yersinia enterocolitica* on pork stored at 4°C. *Food Microbiology*. 1998;15:129-136.
- [32] Tassou CC, Lambropoulou K, Nychas GJE. Effect of prestorage treatments and storage conditions on the survival of *Salmonella enteritidis* PT4 and *Listeria monocytogenes* on fresh marine and freshwater aquaculture fish. *Journal of Food Protection*. 2004;67:193-198.
- [33] Shenoy K, Murano EA. Effect of storage conditions on growth of heat-stressed *Yersinia enterocolitica* in ground pork. *Journal of Food Protection*. 1996;59:365-369.
- [34] Wei QK, Fang TJ, Chen WC. Development and validation of growth model for *Yersinia enterocolitica* in cooked chicken meats packaged under various atmosphere packaging and stored at different temperatures. *Journal of Food Protection*. 2001;74:987-993.
- [35] Manu-Tawiah W, Myers DJ, Olson DG, Molins RA. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in pork chops packaged under modified gas atmospheres. *Journal of Food Science*. 1993;58:475-479.
- [36] Van den Elzen AMG, Houben JH, Smeijers JMA. Effect of modified atmosphere packaging on the survival of pathogens on artificially contaminated pork. Proceedings of the 40th International Congress of Meat Science Technology. The Hague, Holland; 1994.
- [37] Long C, Jones TF, Vugia DJ, Scheffel J, Strockbine N, Ryan P, Shiferaw B, Tauxe RV, Gould LH. *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* infections, FoodNet, 1996–2007. *Emerging Infectious Diseases*. 2010;16:566-567.
- [38] Bhaduri S, Turner-Jones C. The effect of anaerobic atmospheres on the stability of the virulence-related characteristics in *Yersinia enterocolitica*. *Food Microbiology*. 1993;10:239-242.