

uff Universidade Federal Fluminense

FACULDADE DE VETERINÁRIA

VALÉRIA GARRIDO DE SOUZA

EFEITO DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA E
DO ÁCIDO LÁTICO SOBRE A VIDA ÚTIL DE LINGÜIÇA
FRESCAL DE FRANGO

NITERÓI - RJ
2003

VALÉRIA GARRIDO DE SOUZA

**EFEITO DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA E DO ÁCIDO
LÁTICO SOBRE A VIDA ÚTIL DE LINGÜIÇA FRESCAL DE FRANGO**

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

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Borges Mano

Co-orientador: Prof. Dr. Robson Maia Franco

NITERÓI - RJ
2003

VALÉRIA GARRIDO DE SOUZA

**EFEITO DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA E DO ÁCIDO
LÁTICO SOBRE A VIDA ÚTIL DE LINGÜIÇA FRESCAL DE FRANGO**

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

Aprovada em Agosto de 2003

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Borges Mano
Universidade Federal Fluminense - UFF

Prof. Dr. Robson Maia Franco
Universidade Federal Fluminense - UFF

Prof. Dr. Elci Dieckel
Universidade de Passo Fundo - UPF

NITERÓI - RJ
2003

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais João Batista de Souza e Marlene Garrido de Souza, pela incondicional doação de amor e carinho.

Ao meu amado Luciano Reis de Souza pelo incentivo e apoio durante todo o curso.

AGRADECIMENTOS

Neste momento em que alcanço mais uma vitória em minha vida, gostaria de fazer alguns agradecimentos:

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

Aos meus pais, por muitas vezes abdicarem de seus sonhos em prol da realização dos meus;

Aos meus irmãos, pelo apoio e encorajamento;

Ao meu esposo, por me incentivar e encorajar em mais uma conquista da minha vida;

Ao meu orientador professor Dr. Sérgio Borges Mano, por demonstrar prazer em dedicar atenção, conhecimento e amizade a todos os seus alunos e, pela participação em mais uma conquista na minha vida profissional;

Ao meu co-orientador professor Dr. Robson Maia Franco, pelo tempo e atenção a mim dispensados sempre que necessário;

Aos colegas Carlos Adam Conte e Márcia Martins Lopes, pelo auxílio técnico durante o experimento e pela amizade;

À CAPES, pelo auxílio financeiro;

A todos, muito obrigada!

BIOGRAFIA

Graduada na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense em 2000, Valéria Garrido de Souza, brasileira, natural do Rio de Janeiro, nascida em 1976, filha de João Batista de Souza e Marlene Garrido de Souza, efetuou estágios, durante seu período acadêmico, na área de Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal em Matadouros e Indústrias de Aves, no ES, RJ e MG, bem como no Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFF. Além disso, durante o período de setembro de 1998 a março de 2000, teve a oportunidade de participar do Programa de Iniciação Científica como bolsista do Cnpq, resultando no desenvolvimento de dois projetos de pesquisa: "Avaliação comparativa de metodologias para determinação de umidade em produtos salgados secos (charque e bacalhau)" e "Determinação do teor de umidade e presença de nitrito em amostras de charque".

O desfecho de sua graduação se estendeu ao Matadouro de Aves Rezende Alimentos em Uberlândia-MG, onde desenvolveu seu período de estágio supervisionado. Este estágio serviu de base para a apresentação de seu relatório final de conclusão de curso de graduação, que ocorreu no primeiro semestre de 2000.

Em continuidade, em 2001, ingressou no curso de mestrado, como bolsista da CAPES por um ano, e direcionou o seu conhecimento, com maior dedicação, para a área de Tecnologia de Aves e derivados, devido ao tema de sua tese: "Efeito da embalagem em atmosfera modificada e do ácido lático sobre a vida útil de lingüiça de frango".

Em 18 de fevereiro de 2002, após aprovação em concurso público, a autora assumiu o cargo de Fiscal Federal Agropecuário do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, junto ao SIF 1798, onde, atualmente, atua como veterinária responsável pela inspeção do abate e processamento de aves e derivados da Cooperativa Central Oeste Catarinense, Aurora, localizada em Quilombo/SC.

SUMÁRIO

página

LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 HISTÓRICO DA AVICULTURA BRASILEIRA.....	
2.2 EMBUTIDOS	
2.2.1 Embutidos em geral	
2.2.2 Lingüiça frescal	
2.3 VIDA ÚTIL DA CARNE FRESCA	
2.4 EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA.....	
2.5 ÁCIDO LÁTICO	
3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	
3.2 MATERIAL DE LABORATÓRIO.....	
3.3 MATERIAL DE EMBALAGEM DAS AMOSTRAS	
3.3.1 Embalagens Plásticas	
3.3.2 Gases	
3.3.3 Embaladora	
3.4 MEIOS DE CULTURA	
3.5 PREPARO DA LINGÜIÇA.....	
3.6 EMBALAGEM DAS LINGÜIÇAS	

3.7 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS.....	
3.7.1 Colheita de amostras do dia zero	
3.7.2 Preparo das diluições	
3.7.3 Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e psicotróficas em placa	
3.7.4 Contagem de enterobactérias em placa.....	
3.7.5 Contagem de bactérias ácido-láticas em placa	
3.7.6 Contagem de <i>Pseudomonas</i> em placa.....	
3.7.7 Contagem propriamente dita dos microrganismos viáveis	
3.8 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA.....	
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
7 APÊNDICES	
7.1 Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas presentes nas amostras de lingüiça frescal de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas de ácido láctico, realizadas em diferentes dias	
7.2 Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas presentes nas amostras de lingüiça frescal de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, sem adição de ácido láctico, realizadas em diferentes dias	
7.3 Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias ácido-láticas presentes nas amostras de lingüiça frescal de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas de ácido láctico, realizadas em diferentes dias	
7.4 Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias ácido-láticas presentes nas amostras de lingüiça frescal de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, sem adição de ácido láctico, realizadas em diferentes dias	
7.5 Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias psicotróficas presentes nas amostras de lingüiça frescal de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas de ácido láctico, realizadas em diferentes dias	

- 7.6 Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias psicrótróficas presentes nas amostras de lingüiça frescal de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, sem adição de ácido láctico, realizadas em diferentes dias
- 7.7 Representação gráfica dos resultados dos valores de pH das amostras de lingüiça frescal de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.....
- 7.8 Representação gráfica dos resultados dos valores de pH das amostras de lingüiça frescal de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, sem adição de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.....

LISTA DE TABELAS

página

- Tabela 1.** Produção de carne de frango (ton) em alguns países de importância na economia mundial como produtores e exportadores de frango
- Tabela 2.** Padrões microbiológicos para embutidos fixados pela legislação brasileira
- Tabela 3.** Especificações microbiológicas para matérias-primas cárneas utilizadas na produção de embutidos
- Tabela 4.** Resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas presentes nas amostras de lingüiça frescal de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas ou não de ácido láctico, realizadas em diferentes dias
- Tabela 5.** Resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias ácido-láticas presentes nas amostras de lingüiça frescal de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas ou não de ácido láctico, realizadas em diferentes dias
- Tabela 6.** Resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas presentes nas amostras de lingüiça frescal de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas ou não de ácido láctico, realizadas em diferentes dias
- Tabela 7.** Resultados dos valores de pH das amostras de lingüiça frescal de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas ou não de ácido láctico, realizadas em diferentes dias

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal 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 vida útil da lingüiça de frango. Para tanto, foram processadas duas massas de lingüiça, sendo a uma delas adicionado o ácido láctico (0,15%). A partir destas, foram obtidas as amostras, constituídas por quatro gomos de lingüiça, embaladas nas seguintes atmosferas: 100% de ar atmosférico, 100% de N₂, 100% de CO₂, 80% de CO₂ com 20% de N₂ (80/20), 40% de CO₂ com 60% de N₂ (40/60) e 20% de CO₂ com 80% de N₂ (20/80). As amostras foram estocadas em geladeira com temperatura oscilando entre 4±2°C e, submetidas às seguintes análises bacteriológicas: contagem em placa de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e psicrotróficas, bactérias ácido-láticas, enterobactérias e *Pseudomonas*. Tais análises foram realizadas nos dias zero, 1, 9 e 16. Nestes dias, também foi determinado o pH de todas as amostras. Os resultados obtidos foram dispostos em tabelas e gráficos para a realização das análises estatísticas descritivas. 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 contrapartida, a embalagem convencional (100% ar) e 100% N₂ alcançaram como valores máximos 8,8 e 9,4 Log UFC/g, respectivamente. Em relação à adição do ácido láctico, tal tratamento foi eficaz sob o aspecto de inibição microbiológica, acarretando valores inferiores aos das amostras sem adição do ácido em quase todas as atmosferas, exceto a 80/20

CO₂/N₂, onde os valores da contagem microbiana em ambos os tratamentos (com e sem ácido) foram muito próximos. Durante o experimento, não se observou o crescimento de enterobactérias e *Pseudomonas*. Em relação ao pH, pode-se observar que a adição de 0,15% 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. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se principalmente que a EAM a 80/20% de CO₂/N₂, com ou sem ácido, mostrou-se como o método de conservação mais eficaz quanto ao aumento da vida útil da lingüiça de frango; a adição de 0,15% de ácido láctico demonstrou ser uma alternativa eficaz para conservação de lingüiças de frango, embaladas ou não em atmosfera modificada e, diferente do que se esperava, não foi observado um sinergismo entre a embalagem em atmosfera modificada e a adição de ácido láctico.

Palavras-chave: ácido láctico; embalagem em atmosfera modificada; lingüiça de frango

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 psychophylic), 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 results showed that 80% enriched atmosphere, added or not with lactic acid, was the best method of conservation; likewise, modified atmosphere packaged in 40/60 and 80/20 CO₂/N₂ and 100% of CO₂, without lactic acid, delayed the microbial growth, comparatively to 20/80 CO₂/N₂, 100% N₂ and 100% air, increasing the shelf life of the product; the use of lactic acid demonstrated to be an effective additive in chicken sausage conservation, packaged or not in modified atmosphere; lactic acid used to 0.15% as a preservative additive in the poultry sausage show to be effective and, different than it was expected, the synergism was not observed among the modified atmosphere packaged and lactic acid addition. Therefore, it is suggested, that another studies are take place to: evaluate the behavior of the microorganisms under another MAP; evaluate the behavior of the microorganisms front to a pretreatment of raw material used in sausage processing, like a lactic acid solution washes of raw material and; analyze fresh poultry sausage submitted to the different treatments used in this experiment, also under the sensorial point of view.

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

1 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.

Neste período, houve sucessivos ganhos de produtividade em nossa avicultura. Tivemos avanços na genética, na nutrição, na disponibilidade de grãos, no controle sanitário com desenvolvimento de novos produtos e no manejo em si. Hoje, o Brasil está entre os três países que mais produzem e exportam carne de frango no mundo.

Apesar de todos estes avanços científicos e tecnológicos da avicultura, a vida útil 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 vida útil 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.

Em virtude disto, há um crescente interesse por parte das indústrias e pesquisadores em desenvolver novas tecnologias que permitam um prolongamento da vida útil 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 com características conservantes frente às exigências atuais do mercado consumidor.

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 vida útil da lingüiça de frango. Para atingir tal meta, os seguintes objetivos específicos serão necessários:

- Acompanhar as variações de pH e bacteriológicas da lingüiça de frango com ácido láctico embalada em atmosfera modificada;
- Observar se ocorre sinergismo entre a mistura de gases e o aditivo ácido láctico na conservação da lingüiça de frango embalada em EAM;
- Estudar comparativamente a vida útil da lingüiça de frango embalada ou não em atmosfera modificada.
- Estudar comparativamente a vida útil da lingüiça de frango adicionada ou não de ácido láctico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir será feita uma breve revisão bibliográfica, onde serão abordados os seguintes aspectos: histórico da avicultura brasileira, embutidos, lingüiça fresca de frango, vida útil da carne fresca, embalagem em atmosfera modificada e ácido láctico.

2.1 HISTÓRICO DA AVICULTURA BRASILEIRA

A história da produção avícola no Brasil apresenta-se em fases bem definidas. É possível caracterizarmos cada momento da história deste setor nas últimas duas décadas. Atualmente, este segmento da produção brasileira atinge média de produtividade e competitividade inquestionáveis no contexto econômico mundial.

O crescimento da avicultura se deu a partir de 1940, onde até então, a produção era artesanal. Por ocasião da II Guerra Mundial, surgiu a necessidade de abastecimento de carne para os soldados, o que contribuiu decisivamente para o desenvolvimento da produção de carne de pequenos animais de curto ciclo biológico e criados em menor espaço físico. A partir desta data, os Estados Unidos e a Europa iniciaram estudos nos campos da genética, nutrição, manejo e sanidade (Mano et al., 1999; Brasil, 2001a).

Ainda segundo as referências citadas no parágrafo anterior, a partir dos anos 50, houve sucessivos ganhos de produtividade, pois o complexo industrial investiu alto para sair da fase caseira, quando a criação de aves, estilo “fundo de quintal” era incipiente e de inexpressiva produção. Geneticamente, o frango ganhou mais peso e teve sua idade reduzida para o abate. A nutrição obteve

grandes avanços que proporcionaram o máximo aproveitamento dos ganhos genéticos. O manejo também foi aperfeiçoado, sendo que, o controle de ambiente com automação, melhorou a eficiência da atividade.

Atualmente, o sistema integrado de produção de frangos é altamente difundido em todo o país, sendo o Brasil, o segundo maior produtor e exportador mundial de carne de frango. Por meio da incorporação de tecnologias modernas em nutrição, manejo, sanidade e genética, o avanço da importância da carne de frango como uma fonte de proteína animal barata para a população brasileira foi notável. O consumo *per capita* brasileiro saltou de 2 kg, em 1970, para 24 kg, em 1999. O preço pago pelo consumidor brasileiro, em São Paulo, que em 1970 era de R\$ 4,10/kg, em 1998 foi de R\$ 0,98 (Talamini, 1999).

O desenvolvimento do mercado interno também ocorreu em função da industrialização da carne de frango a partir da implantação de técnicas mais aperfeiçoadas de desossa manual que favoreceram a adequação da produtividade e o lançamento de linhas de produtos tradicionais similares aos obtidos pelas indústrias de carnes bovina e suína, tais como: lingüiças, salsichas, hambúrgueres, mortadela entre outros (Mano, 1999).

Depois de passarmos anos crescendo a taxas elevadas, com média de 8,34%, aumentamos o consumo interno chegando a 32,3kg/hab. Criamos novos produtos: de um frango inteiro surgiram centenas de dezenas de novos produtos “in natura”. Após, começamos a temperar, marinar, industrializar e empanar pratos que antes eram preparados em casa pelas nossas mães e esposas. Esses pratos passaram a ser preparados industrialmente e alcançaram todos os pontos do Brasil (Mastrogiácomo, 2003).

Ainda segundo Mastrogiácomo (2003), a produção aumentou, o consumo interno estava abastecido, então o Brasil começou a conquistar o mundo, exportando o frango inteiro para diversas nações, principalmente os países árabes. Depois, surgiu o frango em partes e conquistamos a Europa, enviando o peito desossado a vários países. Veio a perna desossada, classificada e embalada para o Japão; as asas para o Extremo Oriente; os miúdos e as patas para Hong Kong. O nosso frango conquistava o mundo pela sua qualidade,

quantidade e preço. No "ranking" mundial, chegamos à segunda posição como país produtor e exportador, somente abaixo dos Estados Unidos, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Produção de carne de frango (toneladas), de 1997 a 2002, em alguns países de importância na economia mundial como produtores e exportadores de frango.

País / Ano	1997	1998	1999	2000	2001	2002
Estados Unidos	12.497	12.763	13.618	13.944	14.267	14.764
Brasil	4.461	4.875	5.526	5.976	6.736	7.517
União Européia	6.501	6.754	6.692	6.686	6.756	6.715
China	2.650	3.450	4.400	5.050	5.200	5.400
México	1.442	1.599	1.732	1.825	1.928	1.915

Fonte: ABEF - Associação brasileira dos produtores e exportadores de frangos (2003).

2.2 EMBUTIDOS

Os tópicos a seguir trazem uma breve revisão bibliográfica sobre os embutidos de um modo geral e, um pouco mais detalhada, sobre a microbiota presente na lingüiça frescal.

2.2.1 Embutidos em geral

A origem do processamento de carnes é muito remota e, provavelmente, surgiu a partir do momento em que a humanidade aprendeu a trabalhar com o sal como agente de preservação.

Alguns povos da Ásia Menor moíam carnes parcialmente desidratadas e faziam embutidos com adição de condimentos. Mais tarde, de forma independente, esta descoberta foi feita pelos chineses e, então, vários tipos de embutidos foram produzidos 2000 anos antes da Era Cristã (Borgstron, 1976).

De acordo com a mesma fonte, no Século XIX, a indústria de embutidos começou a adquirir capacitação tecnológica para o desenvolvimento de produtos, tanto artesanais como os de grande escala. O progresso foi acelerado a partir do

conhecimento sobre o efeito do tratamento térmico na preservação de alimentos, publicado por Nicolas Appert em 1810, e pela construção dos primeiros compressores de refrigeração em 1874.

Antes considerada uma arte, a elaboração de embutidos é agora uma ciência altamente sofisticada. A cada dia surgem novos conhecimentos na indústria de alimentos, nos laboratórios e nas universidades. Além disso, as inovações provenientes da engenharia mecânica em todos os pontos do processo de produção, desde a manufatura até a embalagem, fazem desta ciência uma das áreas mais dinâmicas da indústria de carnes (Price, 1994).

O conceito atual de embutidos entende-se como sendo todo produto elaborado com carne ou órgãos comestíveis, curado ou não, condimentado, cozido 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 DIPOA (Brasil, 1997).

Vários tipos dos embutidos conhecidos atualmente foram desenvolvidos em determinadas regiões européias por causa das condições climáticas locais e receberam denominações da origem. Climas frios deram origem às variedades frescas (cruas ou defumadas). Climas mais quentes, como na Itália, parte sul da França e da Espanha, estimularam o desenvolvimento dos embutidos desidratados, especialmente os diversos tipos de salame (italiano, milano, etc.). Algumas lingüiças também são conhecidas conforme origem, como a calabresa, a toscana e portuguesa (Terra, 1998).

Acredita-se que a tendência deste mercado de produtos industrializados seja de aumentar cada dia mais à medida que conveniência e variedade se tornam importantes para o consumidor. Hoje, todos os grandes produtores de produtos de salsicharia possuem no mínimo um embutido de frango na sua linha de embutidos (Madava, 1999).

A moderna indústria de embutido conta com embutideira a vácuo, envoltórios dos mais diversos tipos, estufas de cozimento/defumação programadas por computador, instalações frigoríficas adequadas, embalagens e

condimentos necessários para a fabricação de produtos seguros e de fácil preparação para consumo. Estes são requisitos encontrados no atual estilo de vida, seja em ocasiões de entretenimento ou na rotina da alimentação (Gonçalves, 2002).

Atualmente, os embutidos cárneos, considerando-se o volume de produção, constituem-se na categoria de maior importância para o segmento de carnes no Brasil, sendo inúmeras as classes de produtos aí incluídas. Embora os embutidos cárneos sejam constituídos basicamente de tecido muscular, tecido adiposo e água, quando se consideram os processos bioquímicos, químicos e físicos envolvidos durante a elaboração, pode-se constatar que se trata de um alimento complexo. Inclusive no campo da pesquisa científica, vários pontos ainda permanecem pouco conhecidos (Lemos & Yamada, 2002).

2.2.2 Lingüiça frescal

Os embutidos cárneos crus mais comumente encontrados são as lingüiças frescas, as quais podem ser processadas com carne suína, bovina e de aves.

No contexto atual, a lingüiça frescal é um embutido de massa crua ou semicruda, de consumo imediato e de guarda sob refrigeração. Os embutidos crus frescos não são maturados nem dessecados sob qualquer forma e são lançados no mercado na mesma forma em que são produzidos ou com gomos envoltos em material plástico sob vácuo. Os envoltórios plásticos e a conservação destes produtos sob refrigeração prolongam seu prazo de vida comercial (Pardi, 1996).

De acordo com Johnston & Tompkin (1992), o método de acondicionamento dos produtos cárneos crus constitui um dos fatores de seleção da microbiota predominante nestes produtos. Segundo os autores, lingüiças frescas comercializadas em bandejas ou embutidas em tripas comestíveis apresentam vida útil relativamente curta (dias), sendo a microbiota deteriorante constituída por uma variedade de psicrotóxicos, incluindo-se as *Pseudomonas*. Já as lingüiças frescas comercializadas em filmes impermeáveis ao oxigênio apresentam uma predominância da microbiota constituída por bactérias lácticas.

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

Devido a essa alta incidência de contaminantes nos produtos cárneos embutidos frescos, já se espera que tais produtos apresentem uma vida útil curta. Em função disto, trabalhos como o de Rondini et al. (1997) vêm sendo desenvolvidos na tentativa de buscar alternativas que visem prolongar a vida útil destes produtos. Tais autores, a partir dos resultados obtidos em experimento, recomendam o uso do lactato de sódio como aditivo conservante e da embalagem em atmosfera modificada como métodos de prolongar a vida útil de lingüiças frescas.

As análises que se realizam nestes produtos cárneos indicam que uma grande variação no perfil microbiológico pode ocorrer dentre os vários processadores de alimentos, especialmente no que diz respeito ao número de microrganismos presentes e à incidência de patógenos. Em muitos casos, esses dados refletem as práticas de higiene adotadas nos matadouros e o manuseio dos ingredientes. A presença de números elevados de microrganismos deteriorantes, na maioria das vezes, é decorrente das condições impróprias de refrigeração ou tempo de armazenamento muito prolongado dos ingredientes, sobretudo, os cortes cárneos. No caso da presença de patógenos, a principal causa pode ser atribuída às práticas adotadas durante a criação dos animais ou à contaminação cruzada durante o processamento (Bromberg, 2002).

Segundo a mesma fonte, dentre os diversos produtos cárneos que são submetidos ao processo de embutimento, verifica-se que uma gama de tratamentos distintos os difere sob o ponto de vista microbiológico. Alguns, como as lingüiças, são produtos crus, contam com a presença de agentes conservadores (sal de cura) e necessitam de tratamento térmico antes do consumo. Destacam-se aqueles que além da adição de agentes conservadores, são submetidos a tratamento térmico, tais como as salsichas e as mortadelas, diferindo entre si, devido à intensa manipulação recebida pelas primeiras logo após a realização de seu cozimento. As mortadelas, por sua vez, permanecem acondicionadas em embalagens após o tratamento térmico. Os produtos dessecados, como as lingüiças calabresa, podem contar com a baixa atividade de água como barreira ao crescimento microbiano. Finalmente, os produtos fermentados, como os salames, constituem-se em produtos nos quais a adição de culturas “starter” atua no abaixamento dos valores de atividade de água e pH, além da produção de substâncias antimicrobianas pelas mesmas. Já a lingüiça, por ser um produto frescal, não é submetida ao tratamento térmico que reduziria a sua microbiota. Além disso, o alto teor de água livre (alta atividade de água) faz com que o produto tenha vida útil curta, apesar da utilização da barreira do frio.

Pelas razões expostas acima, já se espera uma microbiota inicial na lingüiça. Em função disso, a ANVISA (Brasil, 2001b) estabeleceu padrões microbiológicos para embutidos (Tabela 2) de acordo com o tipo de processamento ao qual o embutido é submetido.

Tabela 2. Padrões microbiológicos para embutidos fixados pela legislação brasileira.

PRODUTO	Coliformes (45°C/g)	Estafilococos coagulase positiva/g	<i>Clostridium</i> sulfito reductor (46°C/g)	<i>Salmonella</i> (25g)
Embutidos frescos (lingüiças cruas e similares)	5×10^3	5×10^3	3×10^3	ausência
Embutidos cozidos (mortadela, salsicha, etc.)	10^3	3×10^3	5×10^2	ausência
Embutidos maturados (salames, lingüiças dessecadas, etc.)	10^3	5×10^3	—	ausência

Fonte: Resolução – RDC/ ANVISA nº 12, de 02 de janeiro de 2001.

2.3 VIDA ÚTIL DA CARNE FRESCA

A carne fresca é um produto muito perecível. São os microrganismos, sobretudo as bactérias, os agentes responsáveis pela deterioração deste alimento quando mantido em refrigeração e aerobiose. Os microrganismos descritos na carne pertencem a diversos gêneros, destacando *Lactobacillus*, alguns gêneros da família *Enterobacteriaceae*, entre outros. O grau de alteração da carne não depende somente da quantidade de microrganismos presentes originalmente, mas também do tipo e da capacidade de produção, a partir de substratos, de compostos odoríficos como H₂S, aminas voláteis, ésteres, compostos amoniacaais, dentre outros. Para que o aroma desagradável destas substâncias seja perceptível, é necessário que os microrganismos que as produzem alcancem taxas em torno de 10^7 UFC/cm². Quando se chega a uma quantidade em torno de 10^8 UFC/cm², aparece uma limosidade superficial. Também alterações de coloração da carne podem ser detectadas quando a população bacteriana alcança valores de 10^6 UFC/cm² (Ingram & Dainty, 1971).

A carne vermelha crua e a carne de aves, derivadas de animais homeotérmicos possuem uma microbiota heterogênea, consistindo de bactérias mesófilas e psicrófilas autóctones, da microbiota do solo e da água do meio ambiente, além de espécies bacterianas introduzidas pelo homem e equipamentos durante o processamento. Além disso, existem diversos fatores

físico-químicos que influenciam nos tipos de degradação microbiana que ocorrem na carne de aves e 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 são também influenciados pelo tipo de empacotamento, temperatura de estocagem, composição final do produto e sobrevivência dos microrganismos (Johnston & Tompkin, 1992).

A Tabela 3 apresenta as especificações sugeridas por Gil & Dominguez (1992) para a matéria-prima cárnea que será utilizada para o processamento de produtos cárneos embutidos.

Tabela 3. Especificações microbiológicas para matérias-primas cárneas utilizadas na produção de embutidos.

Grupo de microrganismo	Produto refrigerado	Produto congelado
Mesofílicos aeróbios	<1x10 ⁶ (UFC/g)	<1x10 ⁶ (UFC/g)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<1x10 ² (UFC/g)	<1x10 ¹ (UFC/g)
<i>Escherichia coli</i>	<1x10 ¹ (UFC/g)	<1x10 ¹ (UFC/g)
<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g	Ausência em 25g
Enterobactérias	<1x10 ² (UFC/g)	<1x10 ² (UFC/g)
<i>Clostridium perfringens</i>	<1x10 ² (UFC/g)	<1x10 ² (UFC/g)
pH	<6,2	<6,2

Fonte: Gil & Dominguez (1992).

A fonte da maioria dos microrganismos patogênicos é o intestino dos animais, no entanto, a microbiota intestinal não está envolvida na deterioração da carne. A contaminação da carne por patógenos pode ocorrer indiretamente através do contato com fezes, couro ou penas durante o processo de abate. O couro e penas, contaminados por meio do solo e água, podem ser considerados como fontes principais de microrganismos psicrótróficos. A possibilidade do ambiente da planta de processamento ou dos equipamentos permitirem a sobrevivência de patógenos, atuando assim como fonte de contaminação, deve ser considerada (Varnam & Sutherland, 1995).

A deterioração ou colonização do alimento por bactérias patogênicas é mais rápida e evidente em produtos ricos em proteínas como as carnes e derivados. Estes alimentos são altamente nutritivos, possuem valores neutros de pH e alta atividade de água, permitindo o crescimento de uma grande variedade de microrganismos. No início da vida útil do alimento, os microrganismos deteriorantes se encontram presentes em pequenas concentrações e constituem apenas a minoria da microbiota original. Em geral, durante o período de estocagem do produto, os deteriorantes se desenvolvem mais rapidamente do que os demais membros da microbiota presente. Além disso, estes produzem metabólitos responsáveis pela alteração do odor e "flavor" ou atuam na produção de limosidade, fazendo com que o alimento seja rejeitado sob o ponto de vista sensorial. As alterações ocorridas nas condições extrínsecas dos produtos (refrigeração, atmosfera modificada, etc.) são as únicas maneiras de retardar a deterioração. Contudo, o armazenamento a temperaturas baixas e adequadas não irá evitar a deterioração, mas irá apenas retardar a ação de microrganismos psicrotróficos deteriorantes (Veld, 1996).

Outras possíveis fontes de contaminação da carne fresca são os biofilmes que alojam patógenos, tais como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *Yersinia enterocolitica*, que podem se desenvolver rapidamente sobre equipamentos logo após sua limpeza, podendo atuar como foco de contaminação nas plantas de processamento de carnes. Neste contexto, este problema pode tornar-se mais grave em plantas com alto grau de automação. Outro aspecto a ser destacado, diz respeito a manipulação inadequada durante o processamento dos embutidos cárneos que pode resultar na disseminação de patógenos. A ocorrência de contaminação microbiológica em decorrência da utilização de água não potável é uma outra possibilidade. Além disso, a sanitização inadequada das câmaras de armazenamento parece ser um problema freqüente, permitindo o desenvolvimento da microbiota deteriorante psicrotrófica (Bromberg, 2002).

2.4 EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA

A reorganização da economia mundial, a globalização e a redução de barreiras ao comércio entre países colocam a questão da competitividade no

centro das discussões das estratégias empresariais. A obtenção e a preservação de vantagens competitivas, que mantêm ou ampliam a participação das organizações no mercado vão depender da capacidade de identificação, criação ou de mudanças das variáveis: preço, qualidade, regularidade da oferta e inovação. O lançamento de novos produtos tornou-se a chave da competitividade. A variável relevante da competição, neste caso, é a qualidade atribuída pelo consumidor ao produto. Dentro deste contexto destaca-se o rápido crescimento de produtos embalados em atmosfera modificada. Estes produtos vêm atender à demanda por produtos frescos ou pouco processados, de vida útil mais longa e que oferecem grande conveniência para o preparo e consumo. No final do século XIX, atmosferas modificadas com elevado teor de gás carbônico eram usadas para conservar carnes frescas durante 4 a 5 semanas. Em 1889, o efeito bacteriostático do CO₂ estava sendo sistematicamente estudado. Em 1910, já havia considerável aplicação da atmosfera modificada para preservar alimentos. No final da década de 30, mais de 50% do transporte marítimo de carne fresca da Austrália era feito sob atmosfera modificada. Na década de 60, começou-se a estudar a aplicação desta técnica para conservação de aves, tendo em vista a tecnologia de estocagem (Sarantópoulos, 1998).

Entretanto, somente a partir dos anos 70, foram introduzidas comercialmente nos Estados Unidos as embalagens contendo carne de frango adicionada de CO₂ ao invés de ar, com intuito de aumentar a vida útil de armazenagem sob refrigeração até 18-21 dias (Parry, 1993).

Ainda de acordo com o mesmo autor, o acondicionamento em atmosfera modificada consiste em embalar um alimento numa atmosfera, com uma composição gasosa diferente da do ar atmosférico e, em manter essa embalagem hermeticamente fechada. Com este sistema, no momento da embalagem, se substitui o ar que rodeia o alimento por uma atmosfera especialmente desenhada, para que se evite, minimize ou ao menos retarde as reações químicas, enzimáticas ou microbiológicas que ocasionam a alteração do alimento.

A atmosfera modificada pode ser criada por meios ativos ou passivos. Na modificação passiva, a atmosfera é criada por meio da própria respiração do

produto dentro da embalagem, até que se atinja um equilíbrio. No caso de uma modificação ativa, a atmosfera é criada inflando-se o espaço livre da embalagem com uma mistura gasosa predeterminada, ou ainda por meio de um material, contido em um sachê ou incorporado diretamente à embalagem, capaz de promover alterações na composição gasosa. Em ambos os casos, uma vez que a atmosfera modificada se estabeleça, ela é mantida por um equilíbrio dinâmico entre respiração e permeação (Hotchkiss, 1995; Yam & Lee, 1995).

Vários gases têm potencial para aumentar a vida útil de alimentos perecíveis, porém, três são os de maior interesse para sistemas de embalagens em atmosfera modificada em alimentos: gás carbônico (CO_2), nitrogênio (N_2) e oxigênio (O_2) (Parry, 1993; Sarantópoulos, 1998). O CO_2 é o gás mais utilizado e possui efeito bacteriostático e fungistático, agindo pela inibição direta das enzimas ou diminuição da velocidade das reações. Os gases ozônio, SO_2 e CO são gases potenciais, mas ainda com dificuldades de aplicação (Schmidt, 2002).

De acordo com Parry (1993), o N_2 é um gás quimicamente inerte e, normalmente, está presente na composição das misturas gasosas utilizadas na conservação de alimentos. Pela sua característica química, não interage diretamente com os microrganismos ou com o produto. Porém, indiretamente, influi no crescimento dos microrganismos e na oxidação ao substituir quase completamente o O_2 . Devido a sua baixa solubilidade e menor permeabilidade através da embalagem (comparativamente ao O_2 e ao CO_2), o N_2 é principalmente utilizado como gás de enchimento para evitar o colapso da embalagem.

Ainda segundo o autor referenciado no parágrafo anterior, sabe-se, que o gás carbônico é um gás ativo e altamente solúvel em água e gordura. Desta forma, a embalagem flexível tende a colapsar sobre o alimento à medida que o CO_2 for sendo absorvido. É o gás mais importante relacionado à tecnologia de preservação em embalagens com atmosfera modificada devido ao seu efeito bacteriostático e fungistático sobre muitos tipos de microrganismos, agindo como conservante de alimentos. Entretanto, não retardam o crescimento de todos os microrganismos. Por exemplo, o crescimento de bactérias ácido-láticas é

favorecido na presença do CO₂ acompanhado de baixos níveis de O₂. O efeito inibidor do CO₂ aumenta em baixas temperaturas devido ao aumento de sua solubilidade.

Cegiolda & Pikul (2000) em seu trabalho "Embalagem em atmosfera modificada (75/20/5 CO₂/N₂/O₂) como um meio de prolongamento da vida útil da lingüiça de frango fatiada", confirmaram essa ação inibidora do gás carbônico em relação aos microrganismos. Com base neste experimento, tais autores recomendam que lingüiças com alto grau de cominuição e de carne desossada mecanicamente sejam embaladas em EAM, pois tal tratamento resultou numa vida útil duas a cinco vezes maior do que as lingüiças embaladas em ar e, uma semana a mais do que as embaladas a vácuo. Ainda Mano et al. (2002) avaliando o efeito da EAM sobre a conservação de lingüiça frescal de frango, afirmaram que, sob o ponto de vista microbiológico, as embalagens enriquecidas com CO₂ são muito eficazes como método de conservação.

Apesar da utilização de embalagem em atmosfera modificada demonstrar ser mais uma alternativa de método de conservação de alimentos, apresenta vantagens, mas também desvantagens, como toda tecnologia. Dentre as desvantagens podemos citar: o custo adicional com embalagem, equipamentos e gases; a necessidade de controle de temperatura durante o acondicionamento, distribuição, estocagem e venda; a necessidade de controle de qualidade da matéria-prima e do acondicionamento; o fato da técnica não ser universalmente efetiva e exigir a otimização de um sistema específico de embalagem em relação ao produto e condições de estocagem, distribuição e comercialização. Além disso, a tecnologia não substitui a estocagem refrigerada (Sarantópolos, 1998; Schmidt, 2002). Dentre as vantagens podemos citar: o aumento da vida útil do produto; a possibilidade de comercialização de produtos de alta qualidade, onde se conserva a cor, o aroma e o frescor dos alimentos; a redução de perdas na distribuição; a possibilidade de economia (redução de manuseio e distribuição de produtos inadequados para venda); o aumento da margem de lucro; a melhor apresentação do produto; a eliminação ou redução de conservantes e outras (Emplal, 2003).

As exigências de permeabilidade da embalagem variam em função das características do produto a ser acondicionado. Os produtos com altas taxas de respiração, como verduras e hortaliças *in natura*, requerem o uso de embalagens com alta permeabilidade (Zagory & Kader, 1998). Tais produtos são sistemas vivos que continuam a respirar após a colheita, consumindo oxigênio e produzindo gás carbônico. Quando acondicionados em embalagem plástica, a atmosfera pode ser modificada de forma passiva com o uso de materiais de embalagem permeáveis a gases ou de forma ativa, usando uma mistura gasosa específica ou uma evacuação parcial juntamente com materiais de embalagem permeáveis. Em ambos os casos, o objetivo é criar um balanço de gases ótimo dentro da embalagem, de forma que a taxa de respiração do produto seja a menor possível, mas que por outro lado os teores de oxigênio e gás carbônico não causem problemas ao produto. Entretanto, as embalagens de produtos que não respiram, tais como carnes e derivados e massas, devem ser barreira aos gases para manter a atmosfera modificada ao redor do produto (Emplal, 2003).

Atualmente, existe uma tendência no setor de alimentos de substituição dos métodos de preservação que alteram química e fisicamente os alimentos para métodos menos severos. 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 em atmosfera modificada porque atende à crescente demanda dos consumidores por alimentos frescos e de boa qualidade, com maior vida útil, porém, sem conservantes e aditivos. A substituição do ar atmosférico ao redor do produto por uma mistura otimizada de CO₂, N₂ e O₂ pode propiciar um aumento de vida útil, pois a degradação de alimentos devido à oxidação, crescimento de fungos, bactérias e enzimas pode ser retardada. É imprescindível que a qualidade inicial do produto em termos sensoriais e microbiológicos seja boa, pois a embalagem com atmosfera modificada não irá melhorar a qualidade inicial, apenas retardará a deterioração, mantendo essa mesma qualidade por um período maior. Desta forma, esta tecnologia não deve ser utilizada para corrigir deficiências das operações de produção e comercialização (Sarantópoulos, 1998).

O sucesso da tecnologia depende da qualidade inicial da matéria-prima, da mistura gasosa, da temperatura, das propriedades de barreira de embalagem, da relação espaço-livre frente à massa do produto e do equipamento de acondicionamento (Schmidt, 2002).

2.5 ÁCIDO LÁTICO

O uso de aditivos na alimentação humana é uma prática utilizada há 3000 anos. No final do século XIX e princípio do século XX surgiram as primeiras regulamentações referentes aos aditivos. Entretanto, somente no fim da Segunda Guerra, que várias organizações mundiais iniciaram ações voltadas para a avaliação e controle dos aditivos e seu uso. O ácido láctico é um sal orgânico comestível que tem características semelhantes ao sal comum, com exceção ao que se refere ao sabor. O seu uso é apreciado na alimentação pelo seu sabor ácido e por não mascarar outros componentes (Bejarano, 1992). Em função disto, o seu uso como uma alternativa de conservação dos alimentos tem sido avaliado.

Alguns autores como Zeitoun (1992), Zeitoun & Debevere (1992), Zeitoun et. al (1994) e Sawaya et al. (1995), desenvolveram trabalhos utilizando uma solução de ácido láctico, em diferentes concentrações, como uma forma de promover uma descontaminação da matéria-prima. Em função dos resultados que tais autores obtiveram, estes recomendam o uso do ácido láctico em carne de frango como uma forma de prolongar a vida útil do produto.

À temperatura ambiente, o ácido láctico é um líquido incolor ou ligeiramente amarelado, miscível com água em todas as proporções. Grande parte de sua atividade antimicrobiana é devida à queda do pH que ele provoca. Sua ação antimicrobiana é relativamente pequena, agindo como conservador a partir de concentrações superiores a 0,5%. Sua ação antibacteriana é, sobretudo, em relação aos anaeróbios. Tendo em conta que muitas leveduras e fungos podem utilizar-se do ácido láctico em seu metabolismo, há quem apele para sua associação com o sal comum, com ácido benzóico e/ou com o ácido sórbico. O ácido láctico é muito estável em relação ao calor, resistindo a temperaturas elevadas. Possui um suave sabor ácido e não sofre limitações quanto ao seu

emprego como alimento. Por outra, não mascara outros componentes odoríferos e, enquanto líquido, tem seu uso industrial favorecido (Pardi, 1996).

A busca por produtos naturais e saudáveis tem se constituído em um dos principais desafios para a indústria de carnes, que vem sendo solicitada a substituir os tradicionais condimentos e conservantes por similares naturais, sem comprometer com isso a vida de prateleira dos produtos finais. O ácido láctico vem sendo utilizado para atender essas exigências, proporcionando controle microbiológico, além de atuar nas características sensoriais e, em alguns casos, aumentar o rendimento do processo. O nível de utilização recomendado é de 2,0% com base no peso total da formulação do produto final. Desta forma, atuam sobre um variado espectro de microrganismos, possibilitando um controle microbiológico, não só durante a fase de processamento, como também durante a fase de distribuição e comercialização do produto. Sua ação se deve ao fato de diminuir a atividade de água (a_w) e pelo efeito do íon lactato que atravessa facilmente a membrana celular, provocando com isso um desequilíbrio intracelular, retardando o crescimento celular e, em alguns casos, provocando até a morte do microrganismo. Desta forma, podemos dizer que o ácido láctico é possuidor tanto de um efeito bacteriostático quanto bactericida. Os aumentos de vida-de-prateleira usualmente observados com a adição de 1,8% desse aditivo são de 30% a 60% em produtos não-cozidos, entre 50% a 110% em produtos cozidos e curados e de 30% a 50% em produtos não-cozidos e não-curados. No Brasil, o uso de ácido láctico e de seus derivados está aprovado desde a década de 80 e as publicações mais recentes como a portaria SVS/MS Nº 35 de 28 de abril de 1995 e a portaria SVS/MS Nº 1004 de 14 de dezembro de 1998 permitem o uso desse produto em produtos cárneos sem limite máximo de dosagem, podendo ser utilizado em quantidade suficiente para obter o efeito desejado (Ferreira, 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todo material e metodologia utilizados neste trabalho serão detalhadamente abordados a seguir, tais como: a matéria-prima utilizada, materiais de laboratório, tipos de embalagens, diferentes misturas gasosas, processamento da lingüiça, análises bacteriológicas e determinação de pH.

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras de carne de aves (*Gallus gallus*) utilizadas no experimento eram compostas pelo músculo peitoral desossado e sem pele, congelado, cuja embalagem primária era uma bandeja de isopor recoberta por um filme plástico. Os outros componentes da formulação também se encontravam devidamente embalados de forma a garantir o mínimo possível de contaminação. Pelo mesmo motivo, a matéria-prima citada para a produção da lingüiça de frango foi comprada apenas de marcas comprovadamente conhecidas e com serviço de inspeção federal.

3.2 MATERIAL DE LABORATÓRIO

Todo o material de laboratório utilizado, a seguir descrito, pertence ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da UFF.

- Pipetas automáticas da marca Genex Beta (100-1000 μ L).
- Placas de Petri descartáveis e estéreis de 65cm².

- Autoclave elétrica de dupla camisa da marca Fabbe (utilizado a 121°C por 15 minutos).
- Balança eletrônica de precisão da marca Marte, modelo AS 2000C.
- pHmetro automático da marca Horiba, modelo M-13.
- Vidraria de laboratório do tipo “pyrex”.
- Banho-maria da marca Fanem (regulado a 45°C).
- Estufa tipo 42000 incubator, da marca Thermolyne (regulada a 35°C).
- “Stomacher” modelo 80, da marca Seward e plásticos estéreis descartáveis da marca Plastisteril.
- Geladeira da marca Eletrolux, modelo Double D440 para estocagem das amostras.
- Contador de colônias tipo Quebec.

3.3 MATERIAL DE EMBALAGEM DAS AMOSTRAS

Foi utilizado um tipo específico de embalagem e embaladora, bem como diferentes concentrações de gases, conforme descrito abaixo.

3.3.1 Embalagens Plásticas

Foram utilizadas 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.

3.3.2 Gases

Os cilindros utilizados no experimento foram adquiridos da empresa White Martins LTDA. Foram utilizados 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).

3.3.3 Embaladora

A embaladora utilizada no experimento também pertence à Faculdade de Veterinária, sendo da marca Famabras, modelo TEC MAQ-Seladora a Vácuo AP 450. Esta é uma embaladora que pode tanto embalar a vácuo como em atmosfera modificada, bastando para isso acoplar o cilindro de gás desejado a mesma. Seu funcionamento é por substituição mecânica do ar (técnica do vácuo compensado), isto é, primeiro ela faz o vácuo, retirando todo o ar da embalagem e, a seguir, injeta o gás. Por último, é feita a termoselagem.

3.4 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados foram preparados de acordo com as instruções do próprio fabricante.

Para a contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e psicotróficas, utilizou-se o Agar Padrão para Contagem-APC (ágar peptona de caseína-glucosa-extrato de levedura para microbiologia) da marca Merck.

Para a contagem de bactérias ácido-láticas em placa, utilizou-se o meio ágar MRS (segundo De Man, Rogosa e Sharpe) da marca Merck.

Para contagem de Enterobactérias em placa, utilizou-se o meio ágar VRBD (ágar cristal violeta vermelho-bile-glucosa, segundo Mossel) da marca Merck.

Para contagem de *Pseudomonas* em placa, utilizou-se o meio ágar Cetrimide da marca Merck.

3.5 PREPARO DA LINGÜIÇA

A lingüiça frescal de frango foi elaborada na própria Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, utilizando o Laboratório de Tecnologia de Carnes. Procurou-se utilizar uma formulação simples 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 feitas duas massas de lingüiça, sendo a uma delas adicionado o ácido láctico (0,15%) de acordo com os objetivos do experimento.

A principal preocupação durante essa fase do experimento foi com a contaminação das amostras, para isso foram tomados alguns cuidados: a carne de filé de frango utilizada era congelada e provinha de uma indústria comprovadamente conhecida e com serviço de inspeção federal, os condimentos (sal, alho e pimenta branca) ficaram expostos durante aproximadamente 3 horas à luz ultravioleta e a água destilada utilizada na massa da lingüiça foi esterilizada a 121°C durante 15min.

Da mesma forma, também procurou-se higienizar adequadamente todo o equipamento utilizado na confecção da lingüiça frescal de frango (moedor, facas, bandejas, embutideira). Nesse processo de higienização foi realizada uma lavagem inicial com detergente seguida de uma imersão temporária do equipamento citado em água hiperclorada a 10ppm. Por último, este foi rinsado com água destilada.

No processo de fabricação, inicialmente, moeu-se o filé de frango congelado 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. Nessa mistura foram utilizadas luvas e bandejas esterilizadas. 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. Ambas foram embutidas numa embutideira da marca Picelli, com

embutidor de 5mm de diâmetro. Para o embutimento, utilizou-se uma tripa artificial de colágeno da marca Coria FSC, com tamanho de 21X40mm.

3.6 EMBALAGEM DAS LINGÜIÇAS

As amostras eram constituídas, tanto as controle como as adicionadas de ácido láctico, por cerca de quatro gomos de lingüiça, que eram embalados nas diferentes atmosferas modificadas, conforme a quantidade de análises propostas pelo experimento.

Todos os gomos de lingüiça já embalados foram estocados em geladeira com temperatura oscilando entre $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.7 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

A seguir, será abordada detalhadamente cada etapa necessária à realização das análises bacteriológicas, desde a colheita das amostras do dia 0 e preparo das diluições, até a contagem em placa das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

3.7.1 Colheita de amostras do dia zero

Durante o preparo da lingüiça, ou seja, no dia zero do experimento, várias amostras controles foram coletadas para a realização das contagens iniciais de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, psicrotróficas, bactérias ácido-láticas, enterobactérias e *Pseudomonas*. Através dessas contagens, obtínhamos 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 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, coletou-se uma amostra de aproximadamente 10g desta massa misturada e adicionada do conservante ácido láctico. Dessa forma, foi constituído um total de quatro amostragens para realização de contagem total de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, psicrotróficas, bactérias ácido-láticas, enterobactérias e *Pseudomonas*. As amostras foram: a) da matéria prima descongelada; b) da matéria prima moída acrescida de toucinho; c) da massa controle, e; d) da massa adicionada de ácido láctico.

Estas quatro subamostras foram colhidas em embalagem plástica esterilizada para “Stomacher” e depois pesadas assepticamente (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 foi realizada da mesma forma que as anteriores, em embalagem plástica estéril. Posteriormente, cada uma foi pesada, de maneira asséptica, até que se obtivesse 10g de amostra dentro da embalagem para “Stomacher”.

3.7.2 Preparo das diluições

Sendo assim, no dia zero do experimento, colheu-se um total de seis amostras: uma da matéria prima, uma da matéria prima moída com toucinho, uma da massa controle, uma da massa adicionada de ácido láctico, uma da lingüiça controle dia zero e outra da lingüiça adicionada de ácido láctico dia zero. Todas as embalagens plásticas estéreis para “Stomacher” contendo as 10g de amostra em seu interior foram devidamente identificadas. Em seguida, foram adicionados assepticamente 90mL solução salina peptonada a 0,1% em cada uma das embalagens plásticas contendo as amostras. As seis amostras foram então levadas ao “Stomacher”, onde foram homogeneizadas em velocidade normal durante 60 segundos, constituindo-se aí a diluição 10^{-1} de cada uma das seis amostras colhidas.

A partir da diluição 10^{-1} pipetou-se, em condições de esterilidade, 1mL com auxílio de pipeta automática regulada para $1000\mu\text{l}$, com ponteiros esterilizados, para um tubo contendo 9mL de solução salina peptonada a 0,1%, previamente esterilizada, constituindo a diluição 10^{-2} . O mesmo procedimento foi realizado para a diluição 10^{-3} e sucessivamente. Diluíram-se as amostras até a diluição 10^{-5} .

3.7.3 Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e psicrotróficas em placa

Para a realização da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e psicrotróficas utilizou-se à técnica "Pour Plate", onde se pipeta, assepticamente, 1mL da diluição a ser pesquisada para uma placa de Petri estéril e, posteriormente, se adiciona o Agar Padrão para Contagem, fundido e mantido a 45°C em banho-maria. Depois de acrescido o meio de cultura na placa, homogeneizava-se o meio de cultura com a alíquota da diluição através de movimentos de rotação da placa sobre a bancada de trabalho. Três placas eram semeadas das últimas diluições consecutivas realizadas. Após a solidificação do meio de cultura, incubavam-se as placas semeadas em posição invertida em estufa à $35-37^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48h (mesófilos) e na geladeira com temperatura em torno de $7-10^{\circ}\text{C}$ durante 7 a 10 dias (psicrotróficos).

A cada contagem de mesófilos e psicrotróficos eram semeadas três placas referentes às três últimas diluições consecutivas. Foram realizadas contagens totais de mesófilos e psicrotróficos em todas as seis amostras coletadas no dia zero.

A contagem em placa de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e psicrotróficas viáveis foi realizada em todas as amostras coletadas durante o experimento. Realizou-se um acompanhamento do crescimento dessas bactérias no decorrer de 16 dias, realizando-se a contagem nos dias 1, 9 e 16 em todos os gomos de lingüiça, tanto controle quanto adicionados de ácido láctico, embaladas nas diferentes atmosferas modificadas (100% ar atmosférico, 100% N_2 , 100% CO_2 , 80/20, 40/60 e 20/80 CO_2/N_2) utilizadas no experimento, as quais foram estocadas em geladeira. Portanto, somou-se um total de três dias de análise, não contando com o dia zero, havendo então, no decorrer de todo o experimento, três

contagens de mesófilos e psicrotróficos em cada gomo de lingüiça controle e adicionada de ácido láctico de acordo com cada atmosfera modificada: a) três contagens (1, 9 e 16) de mesófilos e psicrotróficos na amostra controle embalada em 100% ar; b) três contagens de mesófilos e psicrotróficos na amostra com ácido láctico embalada em 100% ar; c) três contagens de mesófilos e psicrotróficos na amostra controle embalada em 100% N₂; d) três contagens de mesófilos e psicrotróficos na amostra com ácido láctico embalada em 100% N₂; e) três contagens de mesófilos e psicrotróficos na amostra controle embalada em 100% CO₂; f) três contagens de mesófilos e psicrotróficos na amostra com ácido láctico embalada em 100% CO₂; g) três contagens de mesófilos e psicrotróficos na amostra controle embalada em 80/20 CO₂/N₂; h) três contagens de mesófilos e psicrotróficos na amostra com ácido láctico embalada em 80/20 CO₂/N₂; i) três contagens de mesófilos e psicrotróficos na amostra controle embalada em 40/60 CO₂/N₂; j) três contagens de mesófilos e psicrotróficos na amostra com ácido láctico embalada em 40/60 CO₂/N₂; k) três contagens de mesófilos e psicrotróficos na amostra controle embalada em 20/80 CO₂/N₂; l) três contagens de mesófilos e psicrotróficos na amostra com ácido láctico embalada em 20/80 CO₂/N₂.

3.7.4 Contagem de enterobactérias em placa

Para a realização da contagem em placa de Enterobactérias também se utilizou a técnica já descrita de "Pour Plate". As placas eram incubadas em posição invertida em estufa à 35-37°C por 24 a 48 horas.

O meio de cultura utilizado para esta contagem também já foi citado anteriormente (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.

3.7.5 Contagem de bactérias ácido-láticas em placa

Para a realização da contagem de bactérias ácido-láticas em placa também se utilizou a técnica já descrita de “Pour Plate”, porém, com uma diferença. Nessa contagem, o meio de cultura era acrescentado em dupla camada, isto é, após o acréscimo da diluição, vazava-se uma camada inicial do meio e, a seguir, procedia-se a técnica citada, até a solidificação do meio. Por último, vazava-se uma outra camada do meio por cima da primeira e, após nova solidificação do meio, incubavam-se as placas em posição invertida à 35-37°C por 24 a 48 horas.

O meio de cultura utilizado para esta contagem também já foi citado anteriormente (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 psicotróficas.

3.7.6 Contagem de *Pseudomonas* em placa

Para a realização da contagem de *Pseudomonas* em placa, foi utilizada a técnica de espalhamento superficial, onde, com o auxílio de bastão de vidro, espalha-se 0,1mL da diluição correspondente sobre o meio previamente solidificado na placa (preparado conforme instrução do fabricante). A placa era incubada invertida em estufa a 35-37°C por 24 a 48 horas. A leitura da placa era feita com o auxílio de uma lâmpada ultravioleta, evidenciando as UFC através da fluorescência.

O meio de cultura utilizado para esta contagem também já foi citado anteriormente (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 psicotróficas.

3.7.7 Contagem propriamente dita dos microrganismos viáveis

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 eram anotados em tabelas previamente preparadas para melhor organização dos dados.

3.8 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

A única análise físico-química realizada foi a determinação do pH. Para tanto, introduzia-se o eletrodo do pHmetro na própria embalagem plástica para “Stomacher”, onde se havia homogeneizado 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.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

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.

4 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 vida útil de um alimento. Contudo, deve-se ressaltar que a vida útil de um alimento não pode ser determinada somente sob ponto de vista microbiológico, mas também pelas suas propriedades sensoriais, as quais não foram alvo de estudo neste trabalho.

De modo geral, analisando as Tabelas 4, 5 e 6, pode-se observar 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 lático, tanto os mesófilos, como os psicotróficos tiveram os valores das contagens do dia um (01) inferiores aos valores do dia zero. Tais resultados poderiam sugerir uma ação bactericida do ácido lático, pois segundo citação bibliográfica (Ferreira, 1999), este ácido pode ter tanto um efeito bacteriostático, como 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 Tabela 4 e dos Apêndices 7.1 e 7.2, 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 lático (4,3). Tais resultados comprovam a ação bacteriostática do ácido lático. 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 lático (5,0) em relação ao tratamento com adição do mesmo (6,0).

Tabela 4. Resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas presentes nas amostras de lingüiça frescal de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas ou não de ácido lático, realizadas em diferentes dias.

Dia	100% Ar		100% N ₂		20/80 CO ₂ /N ₂		40/60 CO ₂ /N ₂		80/20 CO ₂ /N ₂		100% CO ₂	
	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A
0	3,4	3,6	3,4	3,6	3,4	3,6	3,4	3,6	3,4	3,6	3,4	3,6
1	3,1	3,8	3,2	3,9	3,4	3,5	3,3	3,6	3,2	3,7	3,2	3,5
9	4,6	6,4	4,3	8,5	4,0	8,5	4,5	5,2	3,9	5,0	6,0	5,0
16	6,2	8,6	6,8	9,0	7,1	8,9	6,8	7,2	6,0	6,0	6,6	7,7

C/A – Adicionadas de ácido lático

S/A – Sem adição de ácido lático

No décimo sexto (16^o) dia, a ação bacteriostática do ácido lático continua efetiva, fato este demonstrado através dos menores valores atingidos nas amostras submetidas ao ácido lático 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 lático não foi significativa do ponto de vista de inibição do crescimento microbiano.

Em suma, em 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.

Quanto às bactérias ácido-láticas (Tabela 5 e Apêndices 7.3 e 7.4), em função de problemas de contaminação durante o desenvolvimento das análises bacteriológicas, algumas contagens não puderam ser realizadas. Entretanto, pelos resultados que puderam ser obtidos, pode-se perceber que o ácido láctico também teve uma ação inibitória sobre os microrganismos. Analisando os dados do tratamento sem o ácido, pode-se observar 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 encontramos a contagem de 5,0 Log UFC/g no tratamento sem o ácido e 5,8 no tratamento com ácido no nono dia.

Tabela 5. 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 ou não de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

Dia	100% Ar		100% N ₂		20/80 CO ₂ /N ₂		40/60 CO ₂ /N ₂		80/20 CO ₂ /N ₂		100% CO ₂	
	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A
0	3,2	3,7	3,2	3,7	3,2	3,7	3,2	3,7	3,2	3,7	3,2	3,7
1	3,4	3,5	3,3	3,9	*	3,4	*	3,3	3,1	3,4	3,0	3,2
9	4,2	6,6	4,0	8,5	*	7,6	*	5,0	*	3,9	5,8	5,0
16	*	8,5	*	9,1	*	9,0	*	7,1	*	5,0	*	8,1

C/A – Adicionadas de ácido láctico

S/A – Sem adição de ácido láctico

* - Dados prejudicados

Com relação aos psicrotóxicos (Tabela 6 e Apêndices 7.5 e 7.6), 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 psicrotróficos 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).

Tabela 6. Resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas presentes nas amostras de lingüiça frescal de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas ou não de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

Dia	100% Ar		100% N ₂		20/80 CO ₂ /N ₂		40/60 CO ₂ /N ₂		80/20 CO ₂ /N ₂		100% CO ₂	
	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A
0	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
1	3,3	3,9	3,4	4,3	3,3	3,7	2,8	3,5	3,2	4,0	3,0	3,5
9	4,5	7,2	4,6	8,2	4,0	6,6	4,6	5,1	4,1	4,3	6,2	4,4
16	6,0	8,8	6,8	9,4	6,0	9,0	6,8	7,6	5,8	5,3	7,3	8,6

C/A – Adicionadas de ácido láctico

S/A – Sem adição de ácido láctico

No nono (9º) 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 (16º) 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 forma geral, pode-se observar que o comportamento dos psicrotróficos 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 psicrotróficos, 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 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 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 ao valores da embalagem 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, neste experimento, não se encontraram 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. Entretanto, neste experimento, não se encontrou uma possível explicação para tal comportamento.

A EAM com 20/80 CO₂/N₂ foi menos efetiva do que a embalagem convencional (100% ar) em relação à inibição do crescimento dos microrganismos. A possível explicação pode estar no fato de tal concentração de CO₂ (20%) ser inferior a concentração de composição do ar atmosférico (cerca de 21% de CO₂).

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 & Pikul (2000) processaram três tipos de lingüiça de frango fatiada, diferindo na composição, no grau de cominuição e quantidade de bactérias psicotóficas e ácido lácticas. 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 vida útil duas a cinco vezes maior 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 vida útil 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 vida útil do produto. Sawaya et al. (1995) estudaram a vida útil 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 vida útil 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 vida útil 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 vida útil era 1, 2.3 e 4 dias mais curta. Diferentemente, Zeintoun (1992) concluiu que o uso combinado de uma solução de ácido láctico com EAM proporcionou melhor vida útil à carne de frango do que o uso de tais métodos de conservação isoladamente.

Mano et al. 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 vida útil.

Assim como o ácido láctico, há alguns trabalhos como o de Rondini et al. (1997), que comprovam o uso do lactato de sódio para prolongamento da vida útil 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 vida útil do produto. Além disso, a EAM proporcionou melhor vida útil 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 pode 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, Zeiton 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 (Tabela 7 e Apêndices 7.7 e 7.8), 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 recomende concentrações de 0,5 a 2,0% de ácido láctico como agente conservador (Pardi, 1996; Ferreira, 1999), neste trabalho, foi utilizada uma concentração inferior (0,15%), uma vez que mais dois outros tratamentos estariam sendo utilizados concomitantemente, EAM e refrigeração. Ao final do experimento, pode-se observar que, a concentração de 0,15% de ácido láctico à massa da lingüiça de frango, foi, por si só, suficiente para acarretar uma inibição dos microrganismos, demonstrando que, em concentrações inferiores a 0,5%, a ação do ácido láctico também é efetiva.

Tabela 7. Resultados dos valores de pH das amostras de lingüiça frescal de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas ou não de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.

Dia	100% Ar		100% N ₂		20/80 CO ₂ /N ₂		40/60 CO ₂ /N ₂		80/20 CO ₂ /N ₂		100% CO ₂	
	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A
0	5,89	5,89	5,89	5,89	5,89	5,89	5,89	5,89	5,89	5,89	5,89	5,89
1	5,59	5,80	5,55	5,74	5,45	5,73	5,48	5,72	5,50	5,77	5,48	5,74
9	5,47	5,81	5,47	5,68	5,46	5,78	5,44	5,81	5,40	5,80	5,45	5,81
16	5,52	5,68	5,26	5,68	5,31	5,64	5,49	5,89	5,49	5,93	5,51	5,70

C/A – Adicionadas de ácido láctico

S/A – Sem adição de ácido láctico

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, sob o ponto de vista microbiológico, pode-se concluir que:

- a) a embalagem em atmosfera modificada (EAM) a 80/20 CO₂/N₂, com ou sem ácido, mostrou-se como o método de conservação mais eficaz;
- b) as EAM a 40/60, 80/20 CO₂/N₂ e 100% de CO₂, sem ácido lático, retardaram o crescimento microbiano, comparativamente às EAM a 20/80 CO₂/N₂, 100% N₂ e 100% ar, aumentando a vida útil do produto;
- c) a utilização do ácido lático demonstrou ser um aditivo eficaz na conservação de lingüiça de frango, embaladas ou não em atmosfera modificada;
- d) a utilização do ácido lático, a 0,15%, como conservante na lingüiça frescal de frango, mostrou-se efetivo para obtenção dos resultados esperados, e;
- e) não houve o sinergismo esperado entre EAM e ácido lático, pois quando da adição do ácido lático, o comportamento dos microrganismos frente às diferentes atmosferas foi semelhante, inclusive na EAM a 100% de ar e 100% de N₂.

Sugere-se, de acordo com as conclusões acima e com apoio na literatura compulsada, que mais estudos sejam realizados no sentido de:

- a) avaliar o comportamento dos microrganismos frente a outras atmosferas modificadas;

- b) avaliar o comportamento dos microrganismos frente a um pré-tratamento da matéria-prima cárnea a ser utilizada no processamento da lingüiça, realizando-se lavagens dessa matéria-prima com uma solução de ácido láctico, resultando numa redução da carga microbiana inicial e;
- c) analisar o produto (lingüiça frescal de frango), submetido aos diferentes tratamentos avaliados neste experimento, também sob o ponto de vista sensorial, pois a vida útil de um alimento não pode ser determinada apenas sob o aspecto microbiológico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS – ABEF. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/>>. Acesso em: 12 maio 2003.

BEJARANO, S.M. *Manual práctico de la carne*. Madrid: Martín & Macias, 1992.

BORGSTRON, G. *Principles of Food Science*. V. 1. Food T & Nutrition Press, Inc. Westport Connecticut. USA. 1976, 397p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RI/SPOA)*. Aprovado pelo Decreto n. 30.691, 29/03/52, alterado pelos Decretos nº 1255 de 25/06/62, 1236 de 02/09/94, 1812 de 08/02/96 e 2244 de 04/06/97. Brasília, 1997. 241p.

_____. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Apostila de Treinamento de Agentes de Inspeção de Aves*. Passo Fundo/RS. 16 a 20 de julho de 2001a. 170p.

_____. Resolução – RDC/ ANVISA nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, p. 54, jan. 2001b. Seção 1.

BROMBERG, R. Microbiologia de produtos embutidos. In: LEMOS, A.L.S.C; YAMADA, E.A. *Princípios do processamento de embutidos cárneos*. Campinas: CTC/ITAL, 2002. 164p. p. 121-135.

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.

EMPLAL. *Embalagem para acondicionamento de alimentos com atmosfera modificada*. Disponível em: <http://www.emplal.com.br/extra.htm>>. Acesso em: 13 janeiro 2003.

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.

GIL, A.Y.; DOMINGUEZ, F.Y. *Preparación, fabricación y defectos de los embutidos curados*. Madrid: Ediciones Ayala S.L., 1992, 194p.

GONÇALVES, J.R. Classificação dos embutidos cárneos. In: LEMOS, A.L.S.C; YAMADA, E.A. *Princípios do processamento de embutidos cárneos*. Campinas: CTC/ITAL, 2002. 164p. p. 3-10.

HOTCHKISS, J. H. Safety considerations in active packaging. In: ROONEY, M. L. *Active food packaging*. Glasgow: Chapman & Hall, 1995. p.238-255.

INGRAM, M.; DAINTY, R. H. Changes caused by microbes in spoilage meat. *J. Appl. Bacteriol.* n. 34, p.21-39, 1971

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.

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

MADAVA, R.; HOOGENKAMP, H. The Role of Processed Products in the Poultry Meat Industry. In: RICHARDSON, I. R. & MEAD, G. G. *Poultry Meat Science*. CABI Publishing, 1999. p. 396-410.

MANO, S.B.; QUEIROZ, M.; PARDI, H. et al. *Apostila de Tecnologia de aves, ovos e derivados* (M.T.A – Departamento de Tecnologia dos Alimentos). Niterói: Universidade Federal Fluminense, 1999. 94p.

MANO, S.B.; LOPES, M.M.; CONTE-JÚNIOR, C.A. Efeito da embalagem em atmosfera modificada sobre a conservação de lingüiça frescal de frango. In: 12º Seminário de Iniciação Científica e Prêmio UFF Vasconcellos Torres de Ciência e Tecnologia, **dias do evento**, Niterói/RJ. *Anais...*Niterói: UFF, 2002. **Número de páginas**, p.240.

MASTROGIÁCOMO, V. F. Os desafios da avicultura brasileira em 2003. In: IV Simpósio Brasil Sul de Avicultura, 08, 09 e 10 de abril de 2003, Chapecó/SC. *Anais...* Chapecó : Núcleo Oeste de Médicos Veterinários, 2003. 131p., p. 12-19.

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

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

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Zaragoza: Acribia, 1994.

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.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; ALVES, R. V. M.; OLIVEIRA, L. M.; OMES, T.C. *Embalagens com Atmosfera Modificada*. 2 ed. Campinas: CETEA/ITAL, 1998. 114p.

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.

SCHIMIDT, F. L. Tecnologias emergentes para aumentar a vida útil de alimentos (ênfase em carnes). *In: Simpósio de tecnologias de intervenção para manter a qualidade da carne e derivados*, 22 e 23 de agosto de 2002, Campinas/SP. *Anais...* Campinas: Centro de Tecnologia de Carnes, 2002. 64p., p.23-28.

TALAMINI, D. J. D. Mudanças na distribuição geográfica da produção de frangos no Brasil nos últimos 10 anos. *Revista Avicultura Industrial*, local: editora, n.1067, p. 56-59, 1999.

TERRA, N.N. *Apontamentos de Tecnologia de Carnes*. São Leopoldo: Editora da Universidade do Vale do Rio dos Sinos - Unisinos, 1998, 216p.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. *Meat and Meat Products: Technology, Chemistry and Microbiology*. 1 ed. London: Chapman & Hall, 1995, 430 p.

VELD, J. H. J. H. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of food Microbiology*, v.33, p.1-18, 1996.

YAM, K. L.; LEE, D. S. Design of modified atmosphere packaging for fresh produce. *In: ROONEY, M. L. Active food packaging*. Glasgow: Chapman & Hall, 1995. p. 55-73.

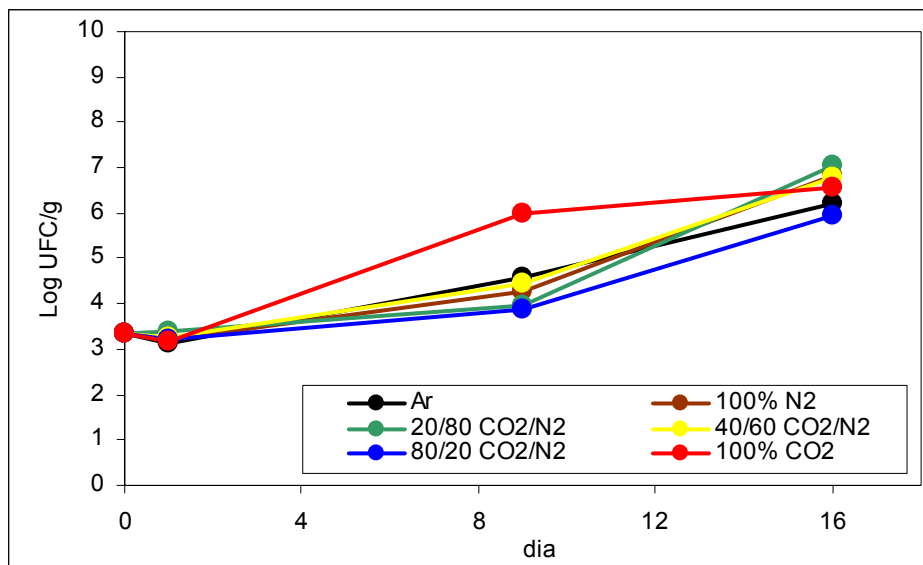
ZAGORY, D.; KADER, A. A. Modified atmosphere packaging for fresh produce. *Food Technology*, v.42, n.9, p.70-77, 1998.

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.

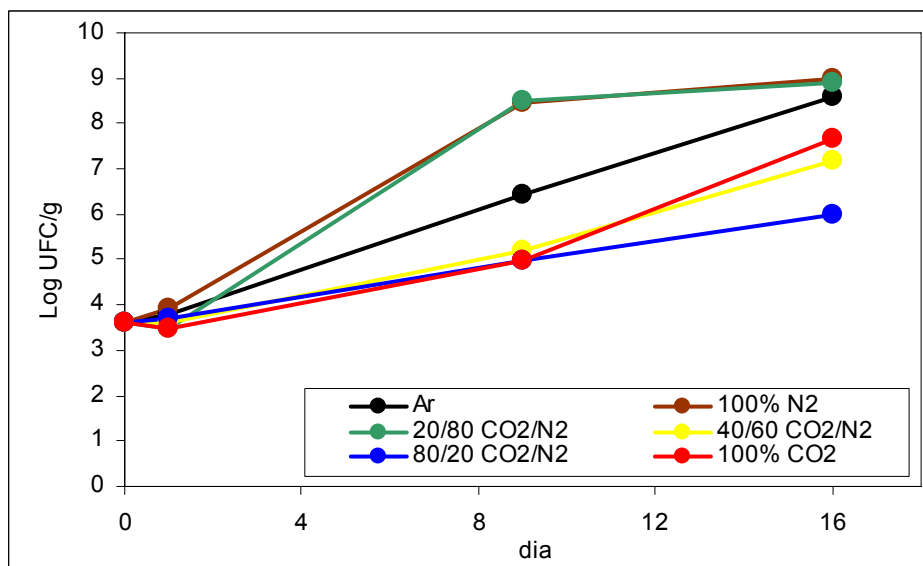
ZEITOUN, A. A. M.; DEBEVERE, J. M. Decontamination with lactic acid/sodium lactate buffer in combination with modified atmosphere packaging effects on the shelf life of fresh poultry. *International Journal of Food Microbiology*, v.16, n.2, p.89-98. 1992.

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.

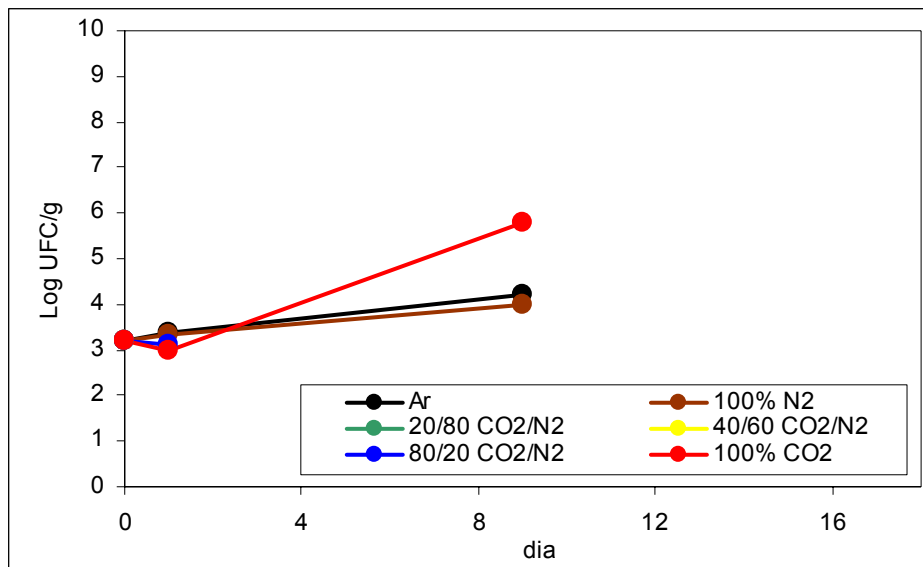
7 APÊNDICES



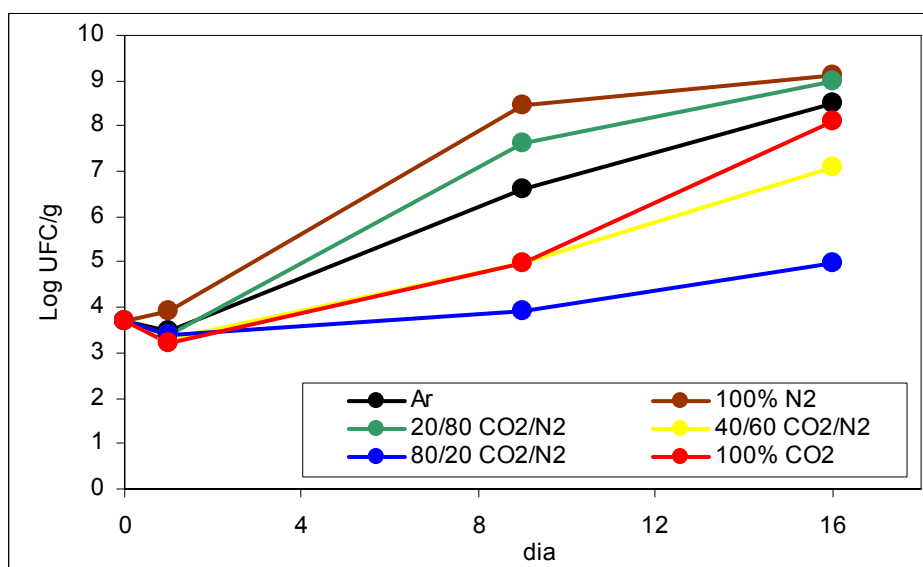
7.1 Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas presentes nas amostras de lingüiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.



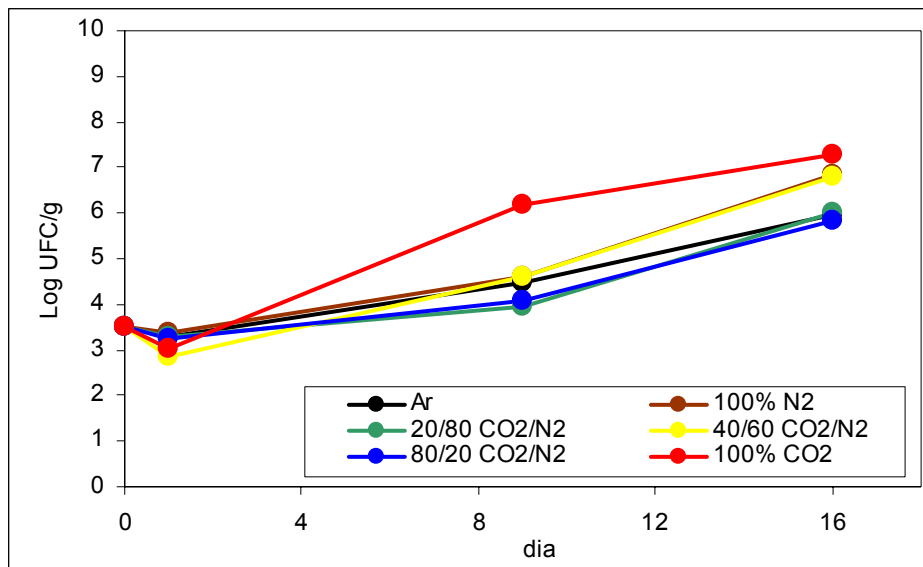
7.2 Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas presentes nas amostras de lingüiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, sem adição de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.



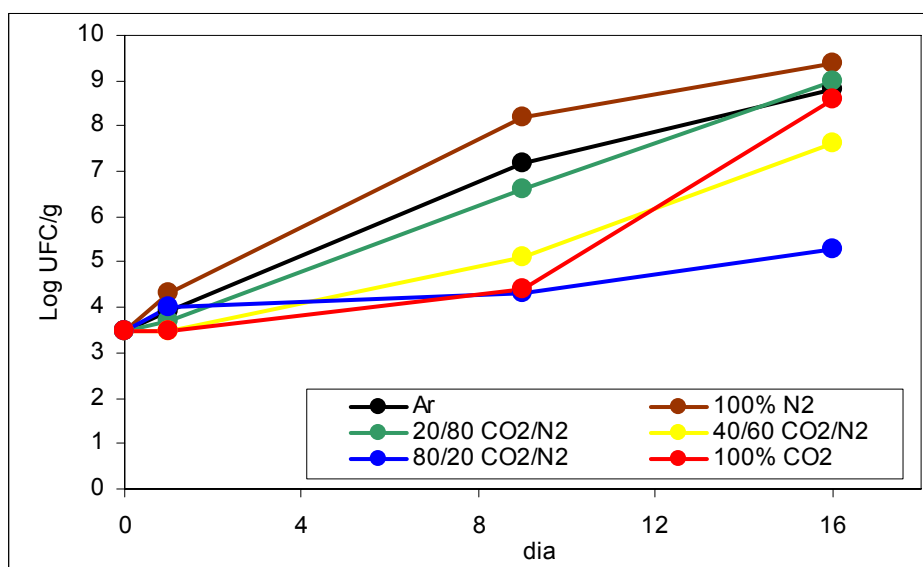
7.3 Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias ácido-láticas presentes nas amostras de lingüiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.



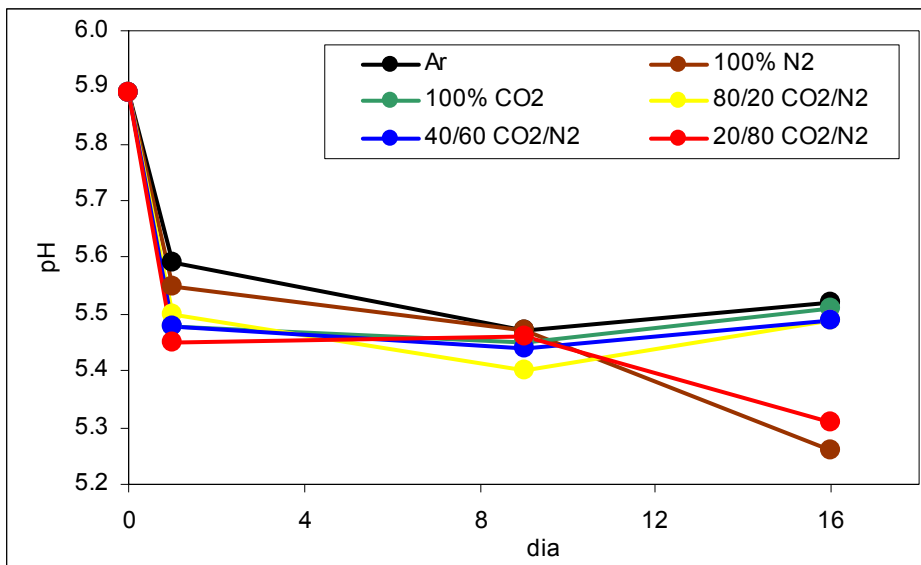
7.4 Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias ácido-láticas presentes nas amostras de lingüiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, sem adição de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.



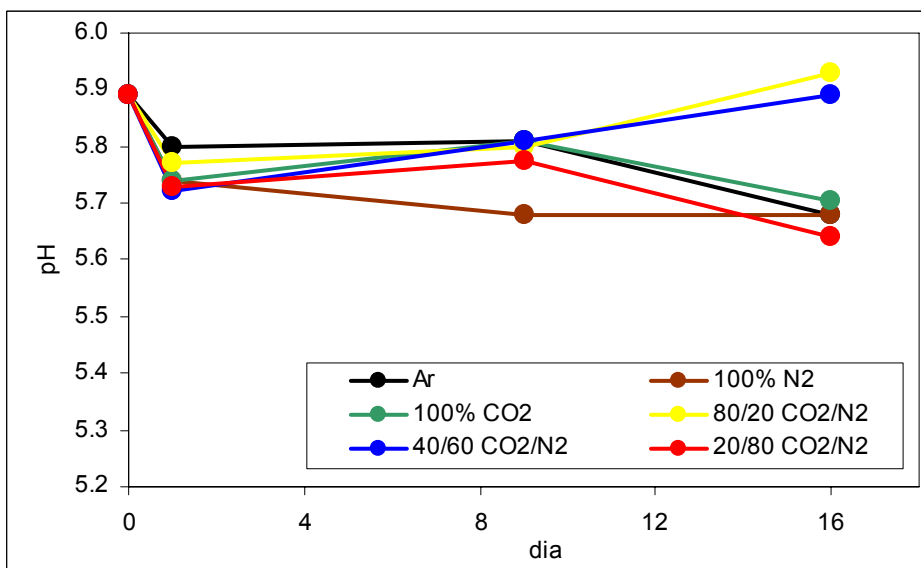
7.5 Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas presentes nas amostras de lingüiça fresca de frango, embaladas em ar e em diferentes atmosferas modificadas, adicionadas de ácido láctico, realizadas em diferentes dias.



7.6 Representação gráfica dos resultados das contagens em placas (Log UFC/g) de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas 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.



7.7 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.



7.8 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.