

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA
E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS
DE ORIGEM ANIMAL**

VANESSA PEREIRA RANGEL

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BACTERIOLÓGICOS E pH
EM FILÉS DE PEITO DE FRANGO EMBALADOS EM ATMOSFERA
MODIFICADA**

**Niterói
2009**

VANESSA PEREIRA RANGEL

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BACTERIOLÓGICOS E pH EM
FILÉS DE PEITO DE FRANGO EMBALADOS EM ATMOSFERA
MODIFICADA**

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. LUIZ ANTÔNIO TRINDADE DE OLIVEIRA (MTA/ UFF)

Co-orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BORGES MANO (MTA/ UFF)

Niterói
2009

VANESSA PEREIRA RANGEL

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BACTERIOLÓGICOS EM FILÉS
DE PEITO DE FRANGO EMBALADOS EM ATMOSFERA
MODIFICADA**

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: ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. LUIZ ANTÔNIO TRINDADE DE OLIVEIRA - Orientador
(MTA/ UFF)

Prof. Dr. SÉRGIO BORGES MANO - Co-orientador
(MTA/ UFF)

Prof. Dr. JOSÉ CARLOS ALBUQUERQUE DO PRADO CARVALHO
(CENTRO UNIVERSITÁRIO PLÍNIO LEITE)

Niterói
2009

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio, atenção e carinho.

Ao meu orientador (Luiz Antônio) e co-orientador (Sérgio Mano) pelos ensinamentos.

Ao professor Robson pela boa vontade, atenção, carinho nos momentos que precisei e também pela ajuda técnica.

À doutoranda Samira pelo incentivo e ajuda durante o experimento.

Ao Draúcio pela paciência e boa vontade em ajudar-me nos momentos que precisei.

Aos colegas do mestrado e funcionários da UFF que direta e/ou indiretamente me ajudaram durante o período do mestrado.

Aos amigos pelas palavras de incentivo, carinho e atenção.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Evolução das bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e das psicrotólicas, em filés de peito de frango, armazenados a $3,0\pm 1,0$ °C (A e B, respectivamente - Experimento 1: amostras obtidas em um matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual/RJ), a $5,0\pm 1,0$ °C (C e D, respectivamente - Experimento 2: amostras obtidas em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ) e a $6,0\pm 1,0$ °C (E e F, respectivamente - Experimento 3: amostras obtidas em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ e inoculadas com *Staphylococcus aureus* coagulase positiva) embalados em ar atmosférico (◆), vácuo (□), 20/80 CO₂/N₂ (▲) e 40/60 CO₂/N₂ (x), durante o período de armazenamento utilizado nos experimentos, p. 40.

Figura 2. Evolução do *Staphylococcus aureus* coagulase positiva inoculado em filés de peito de frango, obtidos em um estabelecimento comercial do município de Niterói/RJ, armazenados a $6,0\pm 1,0$ °C (Experimento 3) embalado em ar atmosférico (◆), vácuo (□), 20/80 CO₂/N₂ (▲) e 40/60 CO₂/N₂ (x), durante 14 dias, p. 49.

Figura 3. Evolução das bactérias do grupo coliforme, em filés de peito de frango, armazenados a $3,0\pm 1,0$ °C (A - Experimento 1: amostra obtida em um matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual/RJ), a $5,0\pm 1,0$ °C (B - Experimento 2: amostra obtida em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ) e a $6,0\pm 1,0$ °C (C - Experimento 3: amostra obtida em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ e inoculada com *Staphylococcus aureus* coagulase positiva) embalados em ar atmosférico (◆), vácuo (□), 20/80 CO₂/N₂ (▲) e 40/60

CO₂/N₂ (x), durante o período de armazenamento utilizado nos experimentos, p. 51.

Figura 4. Evolução do pH em filés de peito de frango, armazenados a 3,0± 1°C (A- Experimento 1: amostra obtida em um matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual/RJ), a 5,0±1,0 °C (B- Experimento 2: amostra obtida em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ) e a 6,0±1,0 °C (C- Experimento 3: amostra obtida em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ e inoculada com *Staphylococcus aureus* coagulase positiva) embalados em ar atmosférico (◆), vácuo (□), 20/80 CO₂/N₂ (▲) e 40/60 CO₂/N₂ (x), durante o período de armazenamento utilizado nos experimentos, p. 54.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Validade comercial e parâmetros de crescimento (TD e FL) da microbiota dos filés de peito de frango obtidos em um matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual/RJ (Experimento 1) embalados em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada (20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂), mantidos a 3,0±1,0 °C, durante 13 dias, p.41.

Tabela 2. Validade comercial e parâmetros de crescimento (TD e FL) da microbiota dos filés de peito de frango obtidos em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ (Experimento 2) embalados em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada (20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂), mantidos a 5,0±1,0 °C, durante 13 dias, p.42.

Tabela 3. Validade comercial e parâmetros de crescimento (TD e FL) da microbiota dos filés de peito de frango obtidos em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/ RJ (Experimento 3), inoculados com *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, embalados em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada (20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂), mantidos a 6,0±1,0 °C, durante 13 dias, p.43.

Tabela 4. Comparação entre a validade comercial das amostras embaladas em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada (20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂) das amostras, de mesma origem, obtidas em um matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual/RJ (Fase 1) e em um estabelecimento comercial do

Município de Niterói/RJ (Experimento 2 e Experimento 3), armazenadas, respectivamente, a $3,0\pm 1,0$ °C, a $5,0\pm 1,0$ °C e a $6\pm 1,0$ °C durante o período de armazenamento utilizado nos experimentos, p. 44.

Tabela 5. Aumento relativo das contagens (diferença entre as contagens finais e iniciais) de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (Log UFC/g) das amostras, de mesma origem, embaladas em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada (20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂) obtidas em um matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual/RJ (Experimento 1) e em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ (Experimento 2 e Experimento 3), armazenadas durante o período de realização dos experimentos, respectivamente, a $3,0\pm 1,0$ °C, a $5,0\pm 1,0$ °C e a $6,0\pm 1,0$ °C, p. 45.

Tabela 6. Aumento relativo das contagens (diferença entre as contagens finais e iniciais) de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas (Log UFC/g) das amostras, de mesma origem, embaladas em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada (20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂) obtidas em um matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual/RJ (Experimento 1) e em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ (Experimento 2 e Experimento 3), armazenadas durante o período de realização dos experimentos, respectivamente, a $3,0\pm 1,0$ °C, a $5,0\pm 1,0$ °C e a $6,0\pm 1,0$ °C, p. 48.

Tabela 7. Aumento relativo das contagens (diferença entre as contagens finais e iniciais) de bactérias do grupo coliforme (Log UFC/g) das amostras, de mesma origem, embaladas em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada (20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂) obtidas em matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual/RJ (Experimento 1) e em estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ (Experimento 2 e Experimento 3), armazenadas durante o período de realização dos experimentos, respectivamente, a $3,0\pm 1,0$ °C, a $5,0\pm 1,0$ °C e a $6,0\pm 1,0$ °C, p. 53.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

°C - Grau Celsius

Aa - atividade de água

ATCC – “American Type Culture Collection”

BHAM - Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas

BHAP - Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicrotróficas

EAM – Embalagem em Atmosfera Modificada

LANARA – Laboratório Nacional de Referência Animal

mL – mililitro

ng – nanograma

pH - potencial hidrogeniônico

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RJ – Rio de Janeiro

SIE – Serviço de Inspeção Estadual

UFC - Unidade Formadora de Colônia

µg - micrograma

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi comparar os parâmetros bacteriológicos e pH em filés de peito de frango, de mesma origem, resfriados, obtidos em um matadouro-frigorífico sob Inspeção Estadual/RJ (Experimento 1) e em um estabelecimento comercial (Experimento 2 e Experimento 3), sendo que, no Experimento 3 as amostras foram inoculadas com *Staphylococcus aureus* coagulase positiva. Após a embalagem em ar atmosférico, a vácuo, e em atmosfera modificada (20/80 e 40/60 CO₂/N₂), as amostras foram armazenadas durante 13 dias a 3,0±1,0 °C (Experimento 1) e a 5,0±1,0 °C (Experimento 2) e durante 14 dias a 6,0±1,0 °C (Experimento 3) e avaliadas ao longo do período de armazenamento, através de análises bacteriológicas (contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas -BHAM- e psicrotróficas -BHAP-, coliformes e *Staphylococcus* coagulase positiva) e pH. No Experimento 1 verificou-se que o maior crescimento foi das BHAP, sendo o menor do grupo coliforme. Entretanto, no Experimento 2, destacou-se o crescimento das BHAM, sendo o menor também o do grupo coliforme. No Experimento 3 o crescimento mais significativo foi das BHAP, enquanto que o menor crescimento verificado foi do *Staphylococcus aureus* coagulase positiva. Portanto, de uma maneira geral, no armazenamento sob refrigeração as BHAP foram os micro-organismos de destaque, independente do tratamento utilizado. Já o grupo coliforme e *Staphylococcus aureus* coagulase positiva foram os que menos se desenvolveram. Verificou-se que a Embalagem em Atmosfera Modificada (EAM) com 40% de CO₂ teve efeito mais significativo na inibição das bactérias estudadas. Portanto, com base em critérios bacteriológicos e valores de pH, concluiu-se que o aumento na concentração de CO₂, associado a uma menor temperatura de armazenamento e a uma menor carga bacteriana inicial, prolonga a validade comercial de filés de peito de frango. Com base nos resultados obtidos, recomenda-se a utilização da EAM com 40% CO₂, pois foi a que apresentou resultados mais significativos, prolongando a validade comercial, por no mínimo oito dias (4,7 °C), comparada a embalagem em ar atmosférico.

Palavras-chaves: embalagem em atmosfera modificada; embalagem a vácuo; validade comercial; carne de frango; bactérias indicadoras.

ABSTRACT

The present work aims at comparing bacteriological parameters and pH collected in freeze-chilled chicken fillets of the same origin obtained in a slaughterhouse-freezing works under RJ State Inspection (Experiment 1) and at a market store (Experiment 2 and Experiment 3) including the fact that in Phase 3 the samples were inoculated with coagulase-positive *Staphylococcus aureus*. After atmospheric air, vacuum and modified atmosphere packaging (20/80 and 40/60 CO₂/N₂), the samples were stored for 13 days at 3.0±1,0 °C (Experiment 1) and at 5.0±1,0 °C (Experiment 2), and for 14 days at 6.0±1,0 °C (Experiment 3), and monitored throughout the storage period by means of bacteriological analyses (measurement of mesophilic -BHAM- and psychrotrophic -BHAP- aerobic heterotrophic bacteria, fecal coliforms and coagulase-positive *Staphylococcus*) and pH. In Experiment 1, the BHAP growth displayed the highest rate while the fecal coliform group remained the lowest. In Experiment 2, the BHAM growth displayed the highest rate while the fecal coliform group remained the lowest. In Experiment 3, the most significant growth belonged to BHAP, while the lowest growth measured was by the coagulase-positive *Staphylococcus aureus*. Therefore, all in all, during storage under refrigeration, the BHAP were the outstanding microorganisms apart from the method applied while the fecal coliform group and the coagulase-positive *Staphylococcus aureus* displayed the meager development. The Modified Atmospheric Packaging (MAP), with 40% of CO₂ proved to have the most significant effect on the bacteria studied. Therefore, studies based on bacteriological criteria and pH values led to the conclusion that a higher concentration of CO₂ associated to a lower storage temperature and a smaller initial batch of bacteria will extend the shelf-life of freeze-chilled chicken fillets. Based on these results, it is advisable the utilization of MAP with 40% of CO₂ for the best chance of significant results and of extension of shelf-life in at least eight days (4.7°C), when compared to atmospheric air packaging.

Key words: modified atmospheric packaging; vacuum packaging; shelf-life; chicken fillets; bacterial indicators.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO, p. 13

2 OBJETIVOS, p. 14

2.1 OBJETIVO GERAL, p. 14

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p. 14

3 REVISÃO DE LITERATURA, p. 16

3.1 ASPECTOS RELACIONADOS À CARNE DE FRANGO, p. 16

3.2 BACTÉRIAS INDICADORAS, p. 18

3.2.1 Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicrotróficas, p. 19

3.2.2 Grupo Coliforme, p. 20

3.2.3 *Staphylococcus* spp., p. 21

3.3 IMPORTÂNCIA DA EMBALAGEM NA PROTEÇÃO DE ALIMENTOS, p. 24

3.4 TECNOLOGIA DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA, p. 26

3.4.1 Embalagem a vácuo, p. 26

3.4.2 Embalagem em Atmosfera Modificada, p. 27

3.4.3 Gases utilizados na EAM, p. 28

3.4.3.1 Uso do gás carbônico, p. 29

3.4.3.2 Uso do nitrogênio, p. 29

3.4.3.3 Uso do oxigênio, p. 30

4 MATERIAL E MÉTODOS, p. 31

4.1 AMOSTRA, p. 31

4.2 PREPARO DA AMOSTRA, p. 31

4.3 INÓCULO, p. 32

4.4 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS, p. 33

4.4.1 Preparo das diluições, p. 33

4.4.2 Contagem Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas, p. 34

4.4.3 Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*, p. 34

4.4.4 Contagem de coliformes a 45°C, p. 35

4.5 DETERMINAÇÃO DE pH, p. 36

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p. 36

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p. 37

5.1 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS, p. 37

5.1.1 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas, p. 37

5.1.2 Contagem de *Staphylococcus aureus coagulase positiva*, p. 48

5.1.3 Contagem de bactérias do grupo coliforme, p. 50

5.2 DETERMINAÇÃO DE pH, p. 54

6 CONCLUSÕES, p. 56

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 58

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, no período de 1996 a 2006, a produção total de carne de frango mais que dobrou (4.051.561 para 9.335.546 toneladas). No mesmo período, o consumo interno brasileiro aumentou aproximadamente 81% (22,05 para 35,68 kg/habitante). Desde 1999, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, ficando atrás apenas da China (2º lugar) e dos EUA (1º lugar) (ABEF, 2008).

Esses dados têm levado a indústria de alimentos a uma maior consideração dos métodos a serem utilizados na conservação da carne de frango, tanto a destinada ao mercado interno quanto ao externo. Isso impulsionou uma nova tendência de substituir métodos de conservação tradicionais, que alteram física e quimicamente os alimentos, por procedimentos menos severos, vem dando lugar a novas tecnologias de processamento e acondicionamento, como exemplo, a Embalagem em Atmosfera Modificada (EAM).

A utilização da tecnologia da EAM apresenta inúmeras vantagens, tais como: possibilidade de comercialização de produtos de alta qualidade, sem conservantes, onde se conserva a cor, o aroma e o frescor; melhor apresentação do produto com maior aceitação pelo consumidor e aumento do prazo de validade comercial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar através de parâmetros bacteriológicos, a aplicação da tecnologia da EAM, associada à armazenagem em refrigeração, em filés de peito de frango.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) analisar o comportamento das BHAM em amostras de filés de peito de frango resfriados embaladas a vácuo, em ar atmosférico e em atmosfera modificada - 20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂ -, através da quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC);
- b) analisar o comportamento das BHAP em amostras de filés de peito de frango resfriados embaladas a vácuo, em ar atmosférico e em atmosfera modificada - 20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂ -, através da quantificação das UFC;
- c) analisar o comportamento de *Escherichia coli* (*E. coli*) em amostras de filés de peito de frango resfriados embaladas a vácuo, em ar atmosférico e em atmosfera modificada - 20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂ -, através da quantificação das UFC;
- d) analisar o comportamento de *Staphylococcus* coagulase positivo em amostras de filés de peito de frango resfriados embaladas a vácuo, em ar atmosférico e em atmosfera modificada - 20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂ -, através da quantificação das UFC;

- e) determinar o pH das amostras de filés de peito de frango resfriados embaladas a vácuo, em ar atmosférico e em atmosfera modificada - 20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂;
- f) determinar qual o tipo de tratamento é o mais adequado para prolongar a validade comercial de filé de peito de frango;
- g) comparar o comportamento das bactérias estudadas em amostras, de mesma origem, de filés de peito de frango resfriados, obtidas em um estabelecimento comercial com aquela obtida diretamente em um matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual (SIE), nos quatro tratamentos utilizados;
- h) Comparar a influência da temperatura nos quatro tratamentos estudados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir serão abordados os aspectos relacionados a carne de frango, as bactérias indicadoras utilizadas no estudo e os aspectos relacionados à conservação da carne de frango em EAM.

3.1 ASPECTOS RELACIONADOS À CARNE DE FRANGO

A microbiota da carne de aves reflete os micro-organismos oriundos da operação de abate e de suas etapas de processamento, com predominância de bactérias Gram-negativas. Entre as Gram-positivas, *Enterococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. são os mais encontrados. Além das bactérias, vários gêneros de bolores podem ser encontrados, como por exemplo, *Penicillium*, *Mucor* e *Cladosporium*. Os gêneros de leveduras mais encontrados em carnes de aves são *Candida* e *Rhodotorula* (JAY, 2005). As principais alterações na qualidade, para alimentos frescos podem ocorrer devido: ao crescimento e metabolismo bacteriano resultando em possíveis alterações do pH e formação de compostos tóxicos, odores desagradáveis e formação de gás e camadas limosas; à oxidação de lipídeos e pigmentos contidos em alimentos gordurosos, resultando na liberação de sabor indesejável e na formação de compostos que possuem efeitos biológicos adversos ou que favoreçam a descoloração (FORSYTHE, 2002).

A deterioração das carnes de aves acontece principalmente na superfície porque as partes internas dos tecidos são normalmente estéreis ou contêm um número relativamente baixo de micro-organismos, os quais, em geral, não crescem em baixas temperaturas. A microbiota de deterioração se restringe às superfícies e à pele, pois foram contaminadas pela água, pelo processamento e

pelo manuseio das aves. As superfícies de aves frescas armazenadas em ambiente com alta umidade são susceptíveis ao crescimento de bactérias aeróbias como as do gênero *Pseudomonas*. Esses micro-organismos apresentam um bom crescimento em superfícies, onde primeiro formam colônias; estas mais tarde, se unem, formando a camada viscosa característica da deterioração das aves (JAY, 2005).

A maioria dos micro-organismos cresce na superfície (pele, parte interna da cavidade do corpo e qualquer superfície cortada) sendo que, os produtos de decomposição difundem-se vagorosamente para o interior da carne. Em frango eviscerado mantido a 10 °C ou abaixo, a deterioração ocorre, principalmente por *Pseudomonas* spp., *Torulopsis* spp. e *Rhodotorula* spp. (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A validade comercial do alimento é dependente do crescimento da microbiota contaminante, a qual pode ser inibida por meio de estocagem a frio ou técnicas de embalagem (embalagem a vácuo e EAM). Uma grande variedade de micro-organismos podem estar presentes nos alimentos e se desenvolver se as condições forem favoráveis. Tendo em vista a suscetibilidade à deterioração, os alimentos podem ser classificados como não-perecíveis, semiperecíveis e perecíveis. A classificação depende de fatores intrínsecos como atividade de água, o pH, a presença de agentes microbianos naturais, etc. As carnes cruas são perecíveis, pois fatores intrínsecos como pH e atividade de água favorecem o crescimento microbiano (FORSYTHE, 2002).

Segundo Silva Junior (2005) em relação à carne de frango, quando a quantidade atingir 10^8 a 10^9 UFC/g, haverá alterações sensoriais perceptíveis em relação ao odor e à limosidade. A partir da contaminação natural do frango a escala de deterioração é a seguinte, quando mantido a 10 °C em 2 dias, a 4,4 °C em 6 dias e a 0 °C em 16 dias, atingindo um quantitativo de 10^8 a 10^9 UFC/g.

As carnes de suíno e de aves possuem maior quantidade de ácidos graxos insaturados do que a carne de bovinos e de ovinos, sendo, portanto, mais susceptíveis ao aparecimento do ranço oxidativo, produzindo odores desagradáveis (ROÇA, 2007).

Em relação à coloração da carne de frango, a cor clara da carne do peito tem grande importância no apelo comercial ao produto como “carne branca”, o que é atribuído à composição em fibras do tipo 2B, em que a presença de

mioglobina é baixa (SCHEUERMANN, 2007). As fibras musculares normais são basicamente de dois tipos, classificadas como fibras do tipo 1 e do tipo 2. Admite-se classificar as fibras como fibras dos tipos 1, 2A, 2B e 2C. Em aves, há músculos com forte predomínio de um dos tipos de fibra, o que está relacionado à função. A musculatura do peito é usada para bater as asas, um movimento rápido e de duração curta. Enquanto que a carne das coxas e sobrecoxas são vermelhas porque aí predominam fibras do tipo 1. Esta musculatura tem função postural, é usada para manter a ave em pé, portanto exige contração durante períodos prolongados (UNICAMP, 2007). A mioglobina é uma proteína globular transportadora de oxigênio, sendo sua presença mais acentuada nos tecidos musculares de maior uso, por isso, esta proteína se concentra nos seguintes órgãos de locomoção: perna, coxa e sobrecoxa (AVISITE, 2007).

3.2 BACTÉRIAS INDICADORAS

Franco e Landgraf (2005) relataram que, a pesquisa dos micro-organismos indicadores é utilizada para avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos e apontar riscos de contaminação de origem fecal com a provável presença de patógenos ou a deterioração potencial do alimento. Também pode indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, a produção ou o armazenamento.

As bactérias variam largamente em suas exigências ao oxigênio, desde aeróbias a anaeróbias. A tensão ou pressão parcial do oxigênio, assim como o potencial de oxigênio dos alimentos, determina os tipos de micro-organismos que poderão se desenvolver. Os micro-organismos aeróbios (gênero *Pseudomonas*) necessitam de oxigênio livre; os anaeróbios (*Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*) não necessitam; os facultativos (Família *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp.) necessitam ou não deste gás e os microaerófilos (os gêneros *Campylobacter*, *Listeria*) crescem melhor em quantidades determinadas de oxigênio (GERMANO; GERMANO, 2003).

3.2.1 Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas

A maior parte dos micro-organismos patogênicos é mesófila e majoritariamente representada por bactérias e mofo. Todos os micro-organismos que constituem risco para a segurança dos alimentos multiplicam-se idealmente na faixa de temperatura das BHAM, intervalo médio de 30 °C a 45 °C. No entanto, são as BHAP que causam deterioração dos produtos cárneos e vegetais mantidos entre 0 °C e 5 °C. Como exemplo de BHAP temos os seguintes gêneros: *Aeromonas*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, entre outros (GERMANO; GERMANO, 2003).

Franco e Landgraf (2005) descreveram que as BHAP são capazes de crescer entre 0 e 7 °C, com produção de colônias ou turvação do meio de cultura em sete a 10 dias. Estes micro-organismos podem ser classificados em: europsicotróficos, que são BHAP que não formam colônias visíveis entre o sexto e o 10º dia, dos quais, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia enterocolitica*, *Hafnia alvei* são exemplos; e estenopsicotróficos, que são as BHAP que formam colônias visíveis em, aproximadamente, cinco dias, dos quais, *Pseudomonas fragi* e *Aeromonas hydrophila*, são exemplos.

A contagem de BHAM é utilizada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos. Mesmo que os patógenos estejam ausentes e que não tenham ocorrido alterações nas condições sensoriais, um número elevado de micro-organismos indica que o alimento apresenta condições sanitárias insatisfatórias. A alta contagem destes micro-organismos em alimentos perecíveis pode indicar negligência durante o armazenamento em relação ao binômio tempo/temperatura. Enquanto que a contagem de BHAP avalia o grau de deterioração de alimentos refrigerados (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

O armazenamento sob refrigeração afeta os micro-organismos de diferentes formas. Quando se diminui a temperatura de armazenamento dos alimentos, a atividade bacteriana declina e conseqüentemente, prolonga-se a validade comercial dos alimentos (HOBBS; ROBERTS, 1998).

3.2.2 Grupo Coliforme

O grupo coliforme é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Esta família é formada por micro-organismos anaeróbios facultativos, Gram-negativos, reduzem nitrato a nitrito, fermentam a glicose e são oxidase-negativos. São capazes de metabolizar uma ampla variedade de substâncias, tais como: carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídios e ácidos orgânicos. Produzem catalase, utilizam glicose e amônia como fontes únicas de carbono e nitrogênio, respectivamente. Estas propriedades metabólicas são extensivamente usadas na classificação e identificação dos gêneros e espécies desta família. Os gêneros pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Edwardsiella*, *Hafnia*, *Morganella*, *Proteus*, *Providência*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia* e *Yersinia*. Em alimentos frescos de origem animal, a ocorrência de números elevados de bactérias da família *Enterobacteriaceae* pode indicar manipulação sem cuidados de higiene e/ ou armazenamento inadequado. O termo coliforme não é uma classificação taxonômica, mas uma definição usada para descrever o grupo de bactérias que fermentam a lactose com produção de ácido e gás no período de até 48 horas a 35 °C. A detecção de coliformes é usada como um indicador de qualidade sanitária de água e indicação das condições sanitárias industriais (FENG; WEAGANT; GRANT, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2005; TRABULSI; ORDONEZ; MARTINEZ, 2004).

A maioria das bactérias do grupo coliforme pertence aos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter* (BRASIL, 2004). A espécie *E. coli* foi descrita pela primeira vez pelo Dr. Theodor Escherich, em 1885, ao tentar isolar o agente da cólera (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006). Este micro-organismo, além de ser um patógeno importante, é membro da microbiota intestinal normal do homem, sendo encontrada nas fezes de todos os indivíduos normais. Esta estreita associação com as fezes do homem e também dos animais representa a base do teste para verificar contaminação fecal da água e dos alimentos, tão usados em saúde pública (TRABULSI; ORDONEZ; MARTINEZ, 2004).

“A denominação de coliformes a 45 °C é equivalente à denominação de coliformes de origem fecal e de coliformes termotolerantes” (BRASIL, 2001). A

pesquisa de coliformes fecais e *E. coli* nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto, e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2005). A comissão da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 (BRASIL, 2001) elucida que, caso seja determinada a presença de *E. coli* no alimento, esta informação deve constar no laudo analítico. Ainda nesta Resolução encontra-se a informação que uma tolerância para amostra indicativa é de 10^4 coliformes a 45 °C/g para carnes resfriadas ou congeladas, *in natura*, de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes). Em se tratando de amostra representativa (n = 5 amostras), admite-se que até três amostras apresentem resultados entre $5,0 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^4$ coliformes a 45 °C/g.

De acordo com os fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia, as cepas de *E. coli* podem ser divididas em grupos: enteropatógenos e extra - intestinais. Os seis tipos enteropatógenos de *E. coli* são: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) - relacionada à diarreia dos viajantes, *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), e *E. coli* de adesão difusa (DAEC). Os tipos extra-intestinais podem se subdivididos em *E. coli* uropatógena (UPEC), e *E. coli* causadora de meningite neonatal (NMEC). Apenas os tipos EPEC, EIEC, ETEC e EHEC têm sido implicados em doença envolvendo alimentos ou água (FENG; WEAGANT; GRANT, 2002).

3.2.3 *Staphylococcus* spp.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são mesófilas, cocos Gram-positivos pertencentes à família *Micrococcaceae*, que são visualizados em microscópio na forma de cacho de uva, anaeróbios facultativos, com o maior crescimento ocorrendo em condições aeróbicas, quando então, produzem catalase. A espécie *Staphylococcus aureus* é a que mais está associada às doenças estafilocócicas, quer sejam de origem alimentar ou não. O *Staphylococcus aureus* é um microrganismo, cuja presença em número elevado indica perigo potencial à saúde pública devido à produção de enterotoxina estafilocócica, além de sanificação deficiente (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

O gênero *Staphylococcus* pode ser isolado do nariz e da pele do homem e da pele de animais e ainda, das infecções de pele e de outras lesões sépticas como bolhas, cortes e queimaduras. A intoxicação pelo gênero *Staphylococcus* ocorre após o consumo de alimentos contaminados com grandes quantidades de certos tipos de *Staphylococcus aureus*, que produzem toxina no alimento. Da ingestão deste alimento contaminado (contendo a toxina) e o aparecimento dos sintomas é de aproximadamente de 2 a 6 horas. Os sintomas aparecem rapidamente, caracterizados predominantemente por vômitos severos, diarreia, dores abdominais e câibras, às vezes seguidas de colapsos. A recuperação se dá geralmente num intervalo de 6 a 24 horas (HOBBS; ROBERTS, 1998).

Na microbiologia de alimentos, *Staphylococcus aureus* merece destaque pela sua frequência e devido às intoxicações alimentares causadas pelo consumo de alimentos contendo enterotoxinas termoestáveis (FREITAS et al., 2004).

Segundo Germano e Germano (2003), em saúde pública, principalmente na área de vigilância sanitária de alimentos, o *Staphylococcus aureus* é considerado como um dos mais frequentes causadores de surtos de origem alimentar. Isso ocorre devido à manipulação incorreta durante as diferentes etapas de processamento dos alimentos, somada aos riscos de contaminação das matérias-primas desde a origem, e às temperaturas inadequadas de conservação pós-cozimento. A enterotoxina é produzida entre 10 e 48 °C, tem a faixa de 40 a 45 °C considerada ótima para a sua produção.

Para Forsythe (2002) as intoxicações alimentares são causadas pelas enterotoxinas, que são proteínas de baixo peso molecular (26.000 a 34.000 Dalton), as quais podem ser diferenciadas por meio de sorologia em 7 tipos antigênicos: SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED e SEE. Uma dose de toxina menor que 1,0 µg/kg (300 a 500 ng) em alimentos contaminados produzirá sintomas de contaminação pelo gênero *Staphylococcus*. Essa quantidade de toxina é produzida por 10⁵ UFC/g.

Os fatores que afetam o crescimento de *Staphylococcus aureus* são, entre outros, os seguintes: temperatura mínima 7 °C, ótima 37 °C e máxima 48 °C; pH mínimo 4,3, ótimo 7,0 e máximo 9,0 e atividade de água 0,83. A atividade de água é a quantidade de água livre presente nos alimentos que favorece o metabolismo dos micro-organismos (SILVA JUNIOR, 2005).

Por muitos anos *Staphylococcus aureus* foi considerado a única espécie do gênero *Staphylococcus* capaz de produzir enterotoxinas, bem como produzir coagulase. Posteriormente, outras espécies produtoras de enterotoxinas e de coagulase, tais como, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius*, foram identificadas e, surtos de intoxicação alimentar atribuídos a estas duas espécies. Em função desses fatores e da semelhança fenotípica entre estas três espécies de *Staphylococcus* spp., houve uma mudança na legislação brasileira (SILVA; GANDRA, 2004).

Na RDC nº 12 (BRASIL, 2001) consta que, a enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva teve por objetivo substituir a anterior determinação de *Staphylococcus aureus*. A determinação da capacidade de produção de term nuclease, e quando necessária, a de produção de toxina estafilocócica de cepas isoladas podem ser realizadas a fim de se obter dados de interesse em saúde pública. No entanto, na legislação não é indicada a análise do gênero *Staphylococcus* no seguinte grupo de alimentos: carnes resfriadas, ou congeladas, *in natura*, de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes).

Deve-se atentar para o fato que, mesmo os *Staphylococcus* spp. não produtores de coagulase podem ser produtores de enterotoxina e, portanto, estando presentes no alimento, oferecem risco ao consumidor. A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos, como preconizado pela RDC nº 12 (BRASIL, 2001), pode estar subestimando a quantidade de *Staphylococcus* enterotoxigênicos presentes (PEREIRA; PEREIRA, 2005).

Em um estudo realizado por Freitas et al. (2004), 31 carcaças de frango resfriado foram analisadas, encontrando o gênero *Staphylococcus* em 28 amostras. Foram constatados *Staphylococcus* coagulase negativa em 13 e *Staphylococcus aureus* em 15 do total das amostras. A contagem de *Staphylococcus aureus* e de *Staphylococcus* coagulase negativa em carcaças resfriadas variou de 10^2 a 10^4 UFC/g. Os autores também verificaram que das 209 colônias selecionadas, 89 (42,6%) apresentaram características de colônias típicas e 120 (57,4%) de colônias atípicas. Do total de colônias, 78 (87,6%) típicas e 48 (40,0%) atípicas foram confirmadas como *Staphylococcus aureus*. Portanto, é de extrema importância que colônias atípicas do gênero *Staphylococcus* não sejam descartadas pelos analistas de alimentos.

O gênero *Staphylococcus* não é um bom competidor com outras bactérias e, por isso, raramente causa doenças alimentares após a ingestão de alimentos crus (FORSYTHE, 2002). No entanto, já foi demonstrado que o *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxina tipo A nos alimentos tem uma fase de latência menor do que as cepas que produzem outras toxinas, o que pode justificar a predominância da enterotoxina tipo A nos surtos de intoxicação alimentar. A curta fase de latência permitirá ao organismo competir com os organismos Gram-negativos de crescimento mais rápido. Os alimentos *in natura* possuem uma microbiota equilibrada. Quando se colocam estes alimentos sob condições abióticas limitantes, como por exemplo o frio, pode-se diminuir alguns gêneros bacterianos, dando melhores condições para outros se multiplicarem livremente, favorecendo, às vezes, os micro-organismos produtores de toxinas ou infecções. Em se tratando da espécie *Staphylococcus aureus*, são citadas como bactérias antagonistas, entre outras, os representantes da família *Enterobacteriaceae* e da *Lactobacillaceae*, os gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* e *Bacillus* (SILVA JUNIOR, 2005).

3.3 IMPORTÂNCIA DA EMBALAGEM NA PROTEÇÃO DOS ALIMENTOS

A embalagem é elaborada para preservar a qualidade dos alimentos. Suas várias funções incluem a proteção contra vapor de água, oxigênio e outros gases, luz, poeira e outras sujidades, perda de peso, danos mecânicos e para prevenir a entrada de micro-organismos e insetos. Pode afetar a forma, a taxa de deterioração, a sobrevivência e o crescimento de patógenos. O fator mais importante é a permeabilidade do material da embalagem ao oxigênio (O₂), ao dióxido de carbono (CO₂) e ao vapor de água (HOBBS; ROBERTS, 1998).

A embalagem influencia a qualidade e a durabilidade de carnes e aves frescas e processadas, pois altera o ambiente ao redor do produto, criando condições que retardam as reações de deterioração. A embalagem previne a evaporação da umidade do produto, evitando perdas de peso e alterações de aparência, textura e aroma. Contudo, a maior alteração no ambiente que circunda o produto, provocada pela embalagem, é quanto à composição gasosa. Esta atmosfera irá determinar a cor do produto, o tipo e a extensão da deterioração

microbiológica e a taxa de oxidação dos seus componentes (OLIVEIRA et al., 2006).

No interior das embalagens, os fatores usuais que determinam o crescimento e a atividade dos micro-organismos, são: o alimento, a temperatura, a atividade de água (Aa), o pH, a mistura gasosa e a microbiota competitiva (HOBBS; ROBERTS, 1998).

O conhecimento das propriedades e das vantagens dos materiais que se empregam na fabricação das embalagens alimentares é de fundamental importância para uma escolha correta do tipo de proteção a ser oferecida ao produto. Os materiais plásticos conquistaram um grande número de aplicações, em função do seu baixo custo e de sua aplicação diversificada (PIERGIOVANNI, 1998).

Por várias décadas, o uso de embalagens plásticas tem substituído o vidro e o metal para embalagem de alimentos e bebidas. As vantagens dos plásticos são numerosas, tais como; baixo custo, peso muito menor, transparência, flexibilidade, aprovados para o contato direto com o alimento, podem ser aquecidos em forno microondas. Melhores características do material da embalagem são obtidas com a combinação dos diversos tipos de polímeros numa mesma embalagem, como é o caso de embalagens multicamadas. O objetivo das multicamadas é a integração de propriedades de diferentes plásticos em uma única embalagem. A composição das camadas varia de acordo com o tipo de produto a ser embalado, a necessidade de barreira e o custo do material (MERGEN, 2004).

Os principais polímeros empregados para embalagens são: polietileno de baixa densidade; polietileno de alta densidade; polipropileno; poliestireno; cloreto de polivinila; polietileno tereftalato; etileno vinil acetato; ionômeros; poliolefinas; poliamidas; cloreto de polivilideno e etileno vinil álcool (PIERGIOVANNI, 1998).

Quando se deseja máxima eficiência do filme como barreira ao oxigênio, o principal polímero utilizado é o Nylon, nome comercial das poliamidas. As poliamidas apresentam entre outras características, boa barreira a gases e a aromas, alta resistência mecânica (abrasão, perfuração, impacto, flexão) e boa resistência térmica. As maiores deficiências deste tipo de filme são a baixa barreira ao vapor d' água e a perda de propriedades mecânicas e de barreira com a umidificação. O filme de polietileno é o que tem a estrutura mais simples entre

os polímeros (MERGEN, 2004), permite a passagem de umidade e a deterioração na superfície, mas não permite a passagem do oxigênio (HOBBS; ROBERTS, 1998) e também confere barreira ao vapor d' água (OLIVEIRA et al., 2006).

3.4 TECNOLOGIA DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA

A técnica de acondicionamento em atmosfera modificada foi descoberta por acaso no final do século XIX. A utilização da EAM aplica-se à conservação de carnes, aves, pescados, produtos de panificação, confeitaria, frutas e hortaliças. No entanto, os requisitos exigidos para um produto ser acondicionado em EAM são seu alto valor comercial (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998).

A EAM é uma tecnologia complexa, pois para que se produzam todos os efeitos positivos desejados é necessário sempre o conhecimento das características do produto, o comportamento da microbiota contaminante e enfim as propriedades de transmissão e permeação do material da embalagem utilizado (PIERGIOVANNI, 1998). A qualidade inicial da matéria-prima e ingredientes é de fundamental importância na determinação de qualidade de produto embalado em atmosfera modificada. Este tipo de tecnologia conserva a qualidade e prolonga a validade comercial dos produtos alimentícios (LEMOS; CASTILHO, 1997).

O uso das embalagens a vácuo ou com CO₂ são métodos de conservação de alimentos frequentemente empregados em conjunto com a refrigeração (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Ambos são conhecidos como EAM, só que no primeiro mantém a denominação embalagem a vácuo e no segundo caso denomina-se EAM, pois neste há uma extensão do processo, em que primeiro se retira o ar do interior da embalagem (faz vácuo) e depois injeta-se a mistura gasosa desejada (CHURCH; PARSONS, 1995).

3.4.1 Embalagem a vácuo

Quando se embala um alimento a vácuo, o ar é retirado das embalagens impermeáveis aos gases, as quais são seladas em seguida. Durante o armazenamento de um alimento embalado a vácuo, ocorre o aumento de CO₂

como resultado da respiração tecidual e microbiana (JAY, 2005). Segundo Bourgeois, Mescle e Zucca (1988) a produção de CO₂ se deve principalmente aos micro-organismos, pois o metabolismo anaeróbio dos tecidos produz principalmente ácido láctico.

Neste método de conservação há o aumento rápido na concentração de CO₂, de 10 a 20% em quatro horas, alcançando um máximo ao redor de 30%. Há uma redução concomitante do conteúdo em oxigênio (faixa de 1 a 3%), como resultado da atividade de enzimas intrínsecas da carne. Este ambiente gasoso modificado reduz o desenvolvimento das BHAM, de crescimento rápido e estimula o crescimento dos lactobacilos, de crescimento lento. A validade comercial das carnes embaladas a vácuo, em embalagens impermeáveis aos gases, é muito maior do que das carnes embaladas na presença do ar atmosférico (FRAZIER; WESTHOFF, 1988).

A indisponibilidade do oxigênio inibirá a deterioração e conseqüentemente maximizará a qualidade e/ ou a validade comercial do produto. No entanto, a deterioração do alimento embalado a vácuo ocorrerá devido a micro-organismos anaeróbios e microaerófilos e a reações não-oxidativas, o que poderá ser minimizada pela estocagem sob refrigeração. A compressão é inevitável e faz da embalagem a vácuo inadequada para muitos produtos (CHURCH; PARSONS, 1995).

3.4.2 Embalagem em Atmosfera Modificada

Uma definição geral de EAM significa embalar um alimento em uma atmosfera diferente da composição do ar atmosférico - 78,08% de N₂, 20,96% de O₂ e 0,03% de CO₂ junto com vapor d' água e traços de gases inertes (DODDS, 1995). A substituição do ar atmosférico no interior da embalagem que envolve o alimento pode ser por um único gás ou por uma mistura gasosa. A composição do gás ou da mistura gasosa é alterada com o tempo de armazenamento, em função da difusão dentro e fora do produto e da embalagem e o efeito do metabolismo do produto e da microbiota (CHURCH, 1994). Resumindo a EAM consiste em modificar o meio gasoso em contato com o alimento com o objetivo de prolongar a

sua validade comercial. De um modo geral, consiste nas diferentes maneiras pelas quais o CO₂ é utilizado como conservante de alimentos (JAY, 2005).

Os micro-organismos requerem certas condições definidas para seu crescimento e reprodução. Em um alimento estas condições são determinadas por suas propriedades intrínsecas, como pH e atividade de água, mas também por fatores extrínsecos associados às condições de armazenamento. A composição gasosa e temperatura que envolve o alimento são os fatores extrínsecos de maior destaque. Estes fatores extrínsecos podem ser controlados embalando o alimento em atmosfera modificada, que retarda a deterioração e expande a validade comercial, uma vez que, este método de conservação apenas retarda o processo natural de deterioração do alimento (PARRY, 1993).

Em carnes embaladas em atmosfera modificada ou a vácuo, os micro-organismos que normalmente causam deterioração são os seguintes bastonetes Gram-positivos: as bactérias ácido-lácticas e as *Brochothrix thermosphacta* (FORSHYTE, 2002).

3.4.3 Gases utilizados na EAM

Os gases, normalmente, utilizados na EAM são: CO₂, N₂ e O₂ (CHURCH, 1994; CHURCH; PARSONS, 1995).

Segundo Parry (1993) a mistura gasosa recomendada para a EAM de aves é constituída de CO₂ e N₂. Durante o levantamento bibliográfico verificou-se que na maioria dos trabalhos consultados (CHOULIARA et al., 2007; JIMÉNEZ et al., 1997; PATSIAS et al., 2006; SARANTÓPOULOS et al., 1998; SAWAYA et al., 1995), sendo a amostra em estudo a carne de frango, a mistura utilizada foi composta por CO₂ e N₂, variando na concentração dos dois gases utilizados no interior da embalagem e na temperatura de armazenamento das amostras. No entanto, pequenas concentrações de O₂ podem ser utilizadas, como a utilizada por Saucier, Gendron e Gariépy (2000) e mesmo assim obter resultados satisfatórios, mas trabalhando com alta concentração de CO₂ (62/8/30 CO₂/O₂/N₂) e baixa temperatura de armazenamento (1,0 °C).

3.4.3.1 Uso do gás carbônico

O CO_2 é o gás mais importante na mistura gasosa (SMITH; RAMASWAMY; SIMPSON, 1990). O efeito inibitório desse gás depende da sua dissolução no produto embalado. Este gás é solúvel em água e gordura (CHURCH; PARSONS, 1995), sendo altamente solúvel na água, formando ácido carbônico (SMITH; RAMASWAMY; SIMPSON, 1990).

Quando o CO_2 é absorvido nos alimentos, o pH abaixa de acordo com a quantidade de ácido carbônico que se forma e com a capacidade tampão do alimento. Existe uma considerável variação em relação à sensibilidade dos micro-organismos ao CO_2 . O efeito inibidor do CO_2 se manifesta tanto em bactérias como em fungos, por uma extensão da fase de latência e do tempo de duplicação durante a fase logarítmica. O efeito deste gás é mais eficaz quando as bactérias ainda estão na fase de latência. O mecanismo de atuação exato do CO_2 sobre os micro-organismos ainda não é conhecido, mas são levantadas três possíveis hipóteses, que são as seguintes: diminuição do pH devido à formação de ácido carbônico; interferência em certas enzimas implicadas no metabolismo final dos micro-organismos e desidratação da membrana, impedindo a passagem ao interior da célula microbiana de substâncias solúveis procedentes dos alimentos (FRAZIER; WESTHOFF, 1988).

3.4.3.2 Uso do nitrogênio

O N_2 possui baixa solubilidade em água e nas gorduras, sendo que na EAM se utiliza fundamentalmente para deslocar o oxigênio, retardando desta forma a oxidação do alimento. Indiretamente, também pode interferir sobre os micro-organismos em alimentos perecíveis, ao retardar o desenvolvimento de organismos aeróbios produtores de deterioração. A terceira função do nitrogênio consiste em atuar como recheio, evitando desta forma o colapso da embalagem nos alimentos que absorvem o CO_2 (PARRY, 1993). Esta terceira função do N_2 é devido a sua baixa solubilidade (CHURCH, 1994). É um gás inerte, não tendo nenhum efeito no alimento e nem propriedades antimicrobianas (SMITH; RAMASWAMY; SIMPSON, 1990).

3.4.3.3 Uso do oxigênio

O O₂ normalmente estimula o crescimento de bactéria aeróbia e inibe o crescimento de bactéria anaeróbia estrita. A presença do O₂ é muito importante na estocagem das carnes frescas, uma vez que, mantém o pigmento mioglobina na sua forma oxigenada (oximioglobina) responsável pela cor vermelho-brilhante da carne. No entanto, para certos produtos a presença do oxigênio pode determinar o ranço oxidativo (CHURCH, 1994), sendo portanto, evitado na mistura gasosa (SMITH; RAMASWAMY; SIMPSON, 1990).

Os gêneros *Pseudomonas*, *Alteromonas* e *Aeromonas* e a espécie *Shewanella putrefaciens* deterioram a carne de frango, produtos lácteos, carne vermelha, peixe e ovos durante o armazenamento sob refrigeração, em níveis normais de O₂ (FORSHYTE, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir serão descritas as fases do experimento, os métodos bacteriológicos e físico-químico (pH) utilizados.

4.1 AMOSTRA

O experimento foi dividido em três fases: Experimento 1 em que a amostra, de mesma origem, foi obtida diretamente em um matadouro-frigorífico com SIE/RJ, Experimento 2 e Experimento 3 amostra obtida em estabelecimento comercial, situado no Município de Niterói/RJ. Em todas as fases utilizou-se 1,2 kg de filé de peito de frango resfriado. Nas três fases, as amostras foram mantidas na embalagem original e acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável, e encaminhadas diretamente ao Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal, da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal Fluminense. No laboratório, as amostras foram armazenadas sob refrigeração ($3,0 \pm 1,0$ °C) e imediatamente preparadas para análise.

4.2 PREPARO DA AMOSTRA

No laboratório, a amostra, em cada um dos experimentos, foi trabalhada na câmara asséptica próximo ao bico de Bunsen, em condições de esterilidade, sendo dividida em fragmentos de $25 \pm 0,2$ g e transferida para um bécher esterilizado que foi colocado dentro de uma caixa isotérmica com gelo reciclável,

de forma a manter a cadeia de frio. As amostras foram homogeneizadas e lavadas em solução salina 0,85% e escurridas em tamis em condições de esterilidade.

A etapa seguinte consistiu na transferência de cada amostra para a embalagem plástica de nylon–poly, de baixa permeabilidade aos gases (Gabrilina Embalagens). Nos três experimentos, trabalhou-se ao todo com 48 embalagens, sendo 12 embalagens para ar atmosférico, 12 para vácuo, 12 para ATM 20/80 CO₂/N₂ e 12 para ATM 40/60 CO₂/N₂. Uma vez introduzidas as amostras nas embalagens, procedeu-se a selagem em termoseladora (TECMAQ, modelo AP 450), sendo, posteriormente, armazenadas a 3,0±1,0 °C (Experimento 1), a 5,0±1,0 °C (Experimento 2) e a 6,0±1,0 °C (Experimento 3).

4.3 INÓCULO

A estirpe “American Type Culture Collection” (ATCC) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25904) foi fornecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz e repicadas para caldo cérebro coração – “Brain Heart Infusion” (BHI). Em seguida foram incubadas em estufa a 35-37 °C por 18 horas, sendo posteriormente os tubos contendo caldo BHI com crescimento do *Staphylococcus aureus* armazenados em geladeira. Antes da utilização da estirpe de *Staphylococcus aureus* foi realizado esfregaço corado pelo método de Gram, para avaliar a pureza do cultivo, além de provas confirmatórias, tais como, coagulase e catalase, visando confirmar a viabilidade de *Staphylococcus aureus*.

Utilizou-se a escala de Mac Farland nº 1 (3,0x10⁸ UFC/g) como parâmetro para realizar as diluições sucessivas em tubos contendo 9 mL de Solução Salina Peptonada 0,1% (SPP 0,1%) até a diluição 10⁻⁴. Dos tubos de diluição 10⁻⁴ (10⁴ UFC/ mL) retirou-se 1mL com auxílio de uma seringa estéril e inoculou-se em cada amostra.

No Experimento 3 (experimento em que se inoculou 1 mL de cultura de *Staphylococcus aureus* em cada amostra antes de colocá-las nas embalagens), no dia zero, separou-se uma amostra sem inocular (para verificar se amostra

apresentava presença de *Staphylococcus* coagulase positiva) e uma inoculada, para realizar as análises bacteriológicas e a determinação de pH.

4.4 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

Nas amostras embaladas em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada foram realizadas as seguintes análises: contagem de BHAM e de BHAP, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e contagem bactérias do grupo coliforme. O preparo das diluições e as análises foram realizados de acordo com a Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003), que oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Como esta Instrução Normativa não trata da contagem de BHAP foi utilizada a metodologia determinada pela APHA (2001).

As análises bacteriológicas foram realizadas nos dias 0, 1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 12 e 13 de armazenamento, para as amostras obtidas diretamente em um matadouro-frigorífico com SIE/RJ (Experimento 1), nos dias 0, 1, 3, 6, 8, 11 e 13 para as amostras obtidas em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ (Experimento 2) e nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 8, 10, 12 e 14 para as amostras também obtidas no mesmo estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ e inoculadas com *Staphylococcus aureus* coagulase positiva (Experimento 3). As amostras do Experimento 2 e 3 foram de mesma origem das amostras do Experimento 1, diferindo do local de obtenção. Os dias das análises foram determinados de acordo com o crescimento das bactérias estudadas durante o período de armazenamento das amostras.

4.4.1 Preparo das diluições

Nos dias das análises retirou-se da geladeira uma embalagem contendo 25 g das amostras embaladas em ar atmosférico, a vácuo e nas duas atmosferas modificadas trabalhadas, que foi homogeneizada com 225 mL de SSP 0,1%, obtendo desta forma, a diluição 10^{-1} . A partir desta diluição foram preparadas as demais diluições. Trabalhou-se com 3 diluições (BRASIL, 2003). O preparo das

diluições a serem trabalhadas em cada dia de análise foi determinado de acordo com o crescimento das bactérias estudadas, nas análises dos dias anteriores.

4.4.2 Contagem Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas

Na contagem das BHAM e das BHAP foi utilizado o Ágar Padrão para Contagem- APC (HIMEDIA). Nas placas de Petri contendo 1 mL do inóculo nas diluições utilizadas, 18 mL do APC (já fundido e mantido em banho-maria 48 °C) foi adicionado nas placas, portanto a técnica utilizada foi “Pour Plate” ou semeadura em profundidade. As placas foram homogeneizadas e mantidas na bancada da câmara asséptica até a solidificação, em seguida incubadas. Para contagem de BHAM, a incubação das placas foi a 35-37 °C, por 48 horas. Para a contagem das BHAP, a temperatura de incubação foi de 7-10 °C, por sete dias. Foram escolhidas para contagem, placas entre 25 e 250 colônias, de acordo com o que é preconizado pela Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003) e pela APHA (2001).

4.4.3 Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

De cada diluição obtida em SSP 0,1%, foi retirado 0,1 mL e semeado na superfície do ágar Baird Parker (HIMEDIA) suplementado com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio, sendo realizada a técnica de espalhamento superficial (“Spread Plate”). As placas foram incubadas a 35-37 °C, por 48 horas. Foram contadas placas contendo de 20 a 200 colônias sugestivas de *Staphylococcus* spp., que são colônias pretas (a bactéria reduz anaeróbica e aeróticamente o telurito de potássio acrescido ao meio de cultura) com halo claro e um de precipitação, em função da atividade proteolítica e lipolítica, respectivamente da bactéria sobre a emulsão de gema do ovo. Foram selecionadas três colônias típicas de *Staphylococcus* spp., que foram semeadas em caldo BHI. A partir deste caldo foram realizadas as provas confirmatórias:

coagulase livre (plasma de coelho liofilizado - Laborclin), esfregaço corado pelo método Gram para verificação das características morfo-tintoriais e catalase.

4.4.4 Contagem de coliformes a 45 °C

Da diluição obtida em solução SPP 0,1% foi retirado 1 mL, que foi semeado na placa de Petri estéril. Adicionou-se posteriormente 15 mL do meio, Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile- VRBA (HIMEDIA), que estava fundido e mantido em banho-maria à temperatura de 46-48 °C, em seguida as placas foram homogeneizadas. Após a solidificação do meio, foi acrescentada outra camada (8-10 mL) deste mesmo meio, esperou-se solidificar e incubou-se as placas em posição invertida em temperatura de 35-37 °C, por 24 horas. Terminado o período de incubação, para contagem foram selecionadas placas contendo de 15 a 150 colônias com morfologia típica de coliformes, colônias róseas (fermentação da lactose presente no meio), rodeadas por um precipitado vermelho em torno da colônia, devido à precipitação da bile e absorção do vermelho neutro.

O VRBA apresenta em sua composição sais biliares e cristal violeta, responsáveis pela inibição de micro-organismos Gram positivos e vermelho neutro, um indicador de pH que indica a fermentação da lactose. A adição de sobrecamada visa a preservação do crescimento e do espriamento de colônias na superfície do ágar (BRASIL, 2003).

Das placas contendo colônias típicas de coliformes foi realizada a prova confirmatória para coliformes fecais, através da inoculação de três colônias em tubos contendo caldo *E. coli* (EC). Os tubos foram incubados em banho-maria com agitação, a $45 \pm 0,2$ °C, por 48 horas. A partir dos tubos positivos (com gás no tubo de Durham) realizou-se semeadura em placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno. Estas placas foram incubadas invertidas a 35-37 °C por 24-48 horas. As colônias com característica morfocoloniais sugestivas de *E. coli* (colônias âmbar nucleadas com brilho metálico verde) e de coliformes (colônia parda mucosa centro mais escuro com tendência a confluir, sugerindo o gênero *Enterobacter*, ou os outros coliformes, só que normalmente menos mucosos) foram selecionadas para a realização das provas bioquímicas (provas do IMViC: Indol, Vermelho de metila – VM, Voges Proskauer – VP e Citrato). O meio Ágar Eosina Azul de

Metileno não é seletivo para *E. coli*, é um meio seletivo para a família *Enterobacteriaceae*.

As colônias selecionadas foram repicadas para ágar nutriente inclinado, para obter colônias jovens e purificadas, após a incubação a 35-37 °C, por 24 horas foi realizada a prova do IMViC, de acordo com preconizado por Feng, Weagant e Grant (2002).

4.5 DETERMINAÇÃO DE pH

Na determinação de pH utilizou-se o método potenciométrico, segundo técnica descrita no Manual do Laboratório Nacional de Referência Animal (BRASIL, 1981). As determinações de pH foram realizadas no mesmo dia das análises bacteriológicas. Para cada tratamento, após as análises bacteriológicas, foi determinado o pH introduzindo o peagômetro Handylab 1 (SCHOTT) em cada amostra homogeneizada em SSP 0,1%. Antes de utilizar o peagômetro e entre uma medição em outra, realizou-se a rinsagem com água destilada e secagem com papel toalha.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nas análises bacteriológicas foram tratados estatisticamente pelo método dos mínimos quadrados para obtenção de uma regressão linear. Para a obtenção dos parâmetros de crescimento (fase de latência e tempo de duplicação), utilizou-se a equação de Baranyi e Roberts (1994) através do programa computacional (DMFit) idealizado pelo Dr. József Baranyi do “Institute of Food Research (Reading Laboratory, UK)”. Com base nos crescimentos, estimou-se também a validade comercial das amostras. A validade comercial foi calculada tendo como referência a contagem de 7,0 Log UFC/g de BHAM, limite máximo aceitável para carne *in natura* de aves, como definido pela “International Commission on Microbiological Specification for Food” (ICMSF, 1986).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão descritos e discutidos os resultados encontrados nos experimentos, que podem ser visualizados nas Tabelas 1 a 7 e nas Figuras 1 a 4.

5.1 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

No presente trabalho não foram detectados *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva, indicando condições higiênico-sanitárias satisfatórias das amostras estudadas, uma vez que, a RDC nº 12 (BRASIL, 2001) só estabelece padrão para coliformes a 45 °C, com tolerância na amostra indicativa de 10⁴ UFC/g para carnes resfriadas ou congeladas, *in natura*, de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes). Portanto, para a discussão do trabalho, considerou-se no Experimento 1 e 2 apenas os resultados das contagens de coliformes, de BHAM, de BHAP e da determinação de pH. No Experimento 3, considerou-se também a contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, pois este micro-organismo foi inoculado nas amostras trabalhadas.

5.1.1 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas

No Experimento 1 a contagem inicial de BHAM foi de 5,7 Log UFC/g, sendo maior do que a verificada no Experimento 2 (4,4 Log UFC/g) e no Experimento 3 (5,5 Log UFC/g), como pode ser visualizado nas Tabelas 1, 2 e 3

respectivamente. A diferença na carga bacteriana inicial entre os três experimentos pode estar relacionada à amostra obtida em momentos distintos e manipulação diferente na indústria (instrumento utilizado no corte, superfície de contato - mesa de corte, manipulador, entre outros fatores). Em relação às contagens finais, no Experimento 3 ($6,0 \pm 1,0$ °C) os resultados obtidos foram maiores do que aqueles verificados no Experimento 2 ($5,0 \pm 1,0$ °C) e no Experimento 1 ($3,0 \pm 1$ °C), respectivamente. Certamente relacionadas a maior temperatura de armazenamento. Além disso, esta alta contagem final no Experimento 3, apesar de uma contagem inicial menor do que no Experimento 1, pode ter sido influenciada pelo acondicionamento das amostras nas respectivas embalagens a partir do segundo dia da data de fabricação. Portanto, a microbiota já estaria perfeitamente adaptada ao alimento, sofrendo um efeito menos significativo do CO₂ durante o período de armazenamento utilizado no experimento.

No Experimento 1, a contagem inicial de BHAM ($5,7$ log UFC/g) foi maior do que a de BHAP ($5,1$ Log UFC/g), no entanto, a partir do sexto dia, a contagem de BHAP começou a superar a contagem de BHAM para as amostras embaladas em ar atmosférico e a vácuo; e por volta do oitavo dia para as amostras embaladas em atmosfera modificada. Já no Experimento 2, desde o início, a contagem de BHAP ($5,4$ Log UFC/g), foi maior do que a contagem de BHAM ($4,4$ Log UFC/g). No Experimento 3 a contagem de BHAM iniciou um pouco maior do que a de BHAP, entretanto durante as análises verificou-se que as contagens das BHAP se igualaram ou superaram a contagem das BHAM. Certamente, em função da temperatura de armazenamento que favorece a seleção e consequente desenvolvimento das BHAP. Os resultados do Experimento 1 são semelhantes aos encontrados por Ritter e Bergmann (2003), que trabalharam com frangos resfriados ($4,0 \pm 1,0$ °C) e refrigerados ($0 \pm 1,0$ °C) embalados em ar atmosférico, que verificaram que a partir do terceiro dia, as médias de BHAP tornaram-se maiores que as médias de BHAM e assim se mantiveram até o 12º dia. Deve ser levado também em consideração que, o tempo de multiplicação das BHAM é menor do que das BHAP. Portanto, as BHAM se desenvolvem mais no início, mas com o armazenamento sob refrigeração acaba-se selecionando as BHAP, que conseguem se desenvolver em temperaturas menores do que as BHAM, apesar de se adaptarem melhor em temperatura na faixa das BHAM.

Na Figura 1, pode ser verificado o comportamento das BHAM e das BHAP, no Experimento 1 (A - BHAM e B - BHAP), 2 (C - BHAM e D - BHAP) e 3 (E - BHAM e F - BHAP), respectivamente.

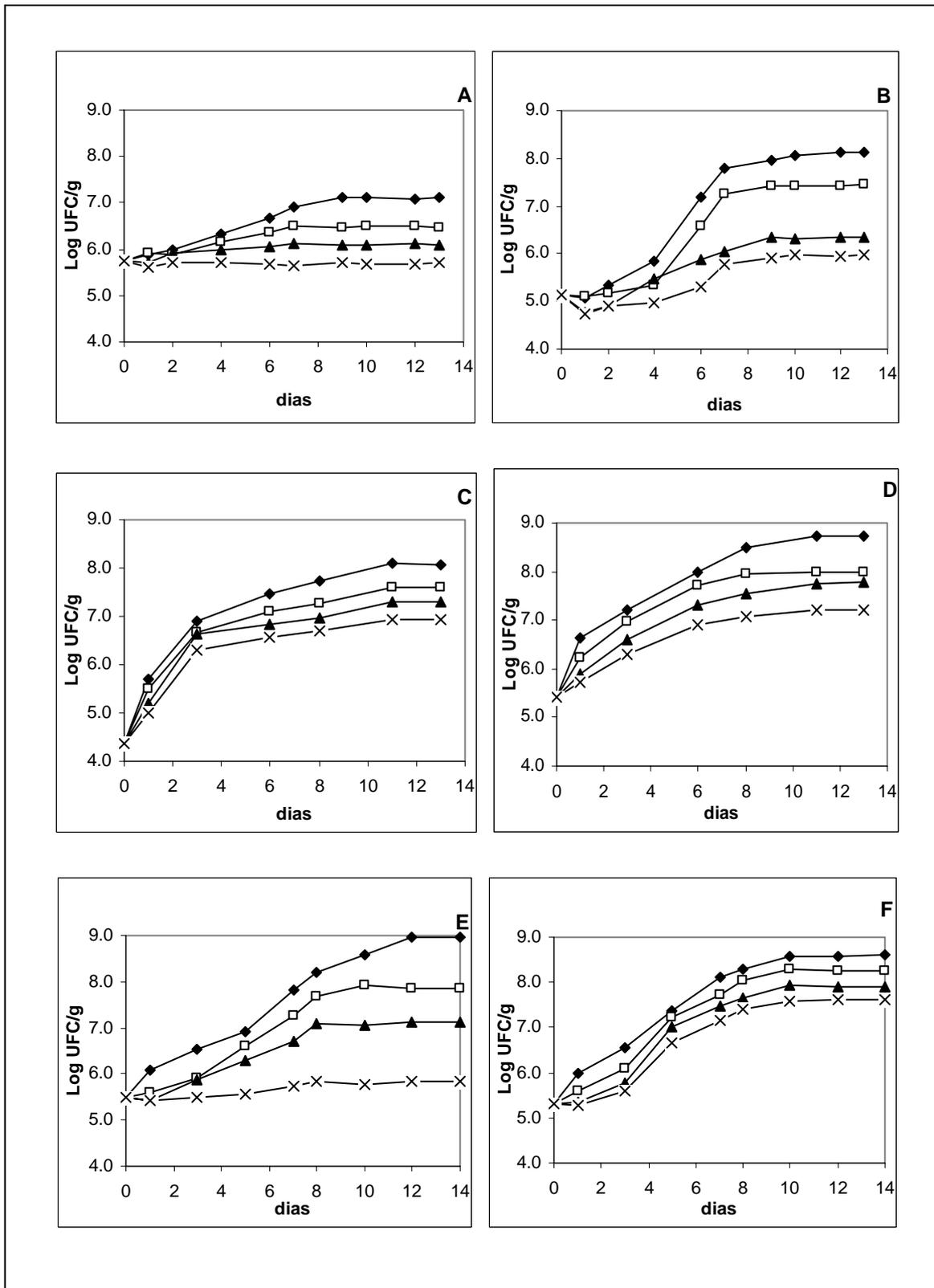


Figura 1. Evolução das bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e das psicrotólicas, em filés de peito de frango, armazenados a $3,0 \pm 1,0$ °C (A e B, respectivamente - Experimento 1: amostras obtidas em um matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual/RJ), a $5,0 \pm 1,0$ °C (C e D, respectivamente - Experimento 2: amostras obtidas em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ) e a $6,0 \pm 1,0$ °C (E e F, respectivamente - Experimento 3: amostras obtidas em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ e inoculadas com *Staphylococcus aureus* coagulase positiva) embalados em ar atmosférico (◆), vácuo (□), 20/80 CO₂/N₂ (▲) e 40/60 CO₂/N₂ (x), durante o período de armazenamento utilizado nos experimentos.

Na Tabela 1 está caracterizado o comportamento bacteriano da amostra obtida diretamente em um matadouro-frigorífico com SIE/RJ (Experimento 1), na Tabela 2 e 3, o da amostra, de mesma origem, obtida em estabelecimento comercial (Experimento 2 e 3, respectivamente), sendo que no Experimento 3 as amostras foram inoculadas com *Staphylococcus aureus* coagulase positiva.

Tabela 1. Validade comercial e parâmetros de crescimento (TD e FL) da microbiota dos filés de peito de frango obtidos em um matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual/RJ (Experimento 1) embalados em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada (20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂), mantidos a 3,0±1,0 °C, durante 13 dias.

Tratamentos	Validade Comercial	Parâmetros	BHAM	BHAP	Coliformes
		CI			
Ar atmosférico	8	TD	1,8	0,4	0,7
		FL	0	2,9	4,0
		CF	7,1	8,1	5,9
Vácuo	>13	TD	2,5	0,4	1,1
		FL	0	4,1	3,9
		CF	6,5	7,4	5,3
20/80 CO ₂ /N ₂	>13	TD	3,5	1,2	1,4
		FL	0	2,1	3,7
		CF	6,1	6,3	4,8
40/60 CO ₂ /N ₂	>13	TD	106,1	0,6	-95,5
		FL	0	5,3	0
		CF	5,7	6,0	4,5

Validade Comercial- dias; CI- Contagem Inicial (Log UFC/g); TD- Tempo de Duplicação (dias); FL – Fase de Latência (dias); CF- Contagem final (Log UFC/g); BHAM- Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas; BHAP- Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas.

Tabela 2. Validade comercial e parâmetros de crescimento (TD e FL) da microbiota dos filés de peito de frango obtidos em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ (Experimento 2) embalados em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada (20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂), mantidos a 5,0±1,0 °C, durante 13 dias.

Tratamentos	Validade Comercial	Parâmetros	BHAM	BHAP	Coliformes
		CI	4,4	5,4	4,4
Ar atmosférico	3	TD	0,4	0,8	2,0
		FL	0	0	0
		CF	8,1	8,7	6,9
Vácuo	3	TD	0,4	0,6	1,0
		FL	0	0	0
		CF	7,6	8,0	6,0
20/80 CO ₂ /N ₂	4	TD	0,4	1,0	4,2
		FL	0	0	0
		CF	7,3	7,8	5,6
40/60 CO ₂ /N ₂	>13	TD	0,5	1,2	5,0
		FL	0	0	0
		CF	6,9	7,2	5,3

Validade Comercial- dias; CI- Contagem Inicial (Log UFC/g); TD- Tempo de Duplicação (dias); FL – Fase de Latência (dias); CF- Contagem final (Log UFC/g); BHAM- Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas; BHAP- Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas.

Tabela 3. Validade comercial e parâmetros de crescimento (TD e FL) da microbiota dos filés de peito de frango obtidos em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ (Experimento 3), inoculados com *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, embalados em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada (20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂), mantidos a 6,0±1,0 °C, durante 13 dias.

Tratamentos	Validade Comercial	Parâmetros	BHAM	BHAP	Coliformes	<i>S.aureus</i>
		CI	5,5	5,4	3,8	4,4
Ar atmosférico	5	TD	1,0	0,9	1,2	1,2
		FL	0	0	0	2,6
		CF	9,0	9,4	7,6	5,7
Vácuo	6	TD	1,0	0,8	1,3	3,2
		FL	0,9	0	0	0,7
		CF	8,8	8,8	6,6	5,2
20/80 CO ₂ /N ₂	8	TD	1,5	1,1	2,1	0,3
		FL	1,0	0	0	7,4
		CF	7,9	8,3	6,0	4,7
40/60 CO ₂ /N ₂	>14	TD	3,7	1,1	2,6	15,4
		FL	3,4	1,0	0	5,0
		CF	6,1	8,3	5,4	4,4

Validade Comercial- dias; CI- Contagem inicial (Log UFC/g); TD- Tempo de Duplicação (dias); FL – Fase de Latência (dias); CF- Contagem final (Log UFC/g); BHAM- Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas; BHAP- Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas; *S. aureus* - *Staphylococcus aureus* coagulase positiva.

A partir dos dados presentes na Tabela 1 (Experimento 1) e 2 (Experimento 2) é possível verificar que, em relação às BHAM, as amostras embaladas em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada não apresentaram fase de latência. No entanto, no Experimento 3 (Tabela 3) só não houve fase de latência nas amostras embaladas em ar, sendo maior nas amostras embaladas em atmosfera modificada com 40% de CO₂ (3,4 dias). A fase de latência de uma população bacteriana indica o tempo que essa população demora a iniciar a sua multiplicação ativa, depois da adaptação às condições do ecossistema. Quanto mais baixa a temperatura de armazenamento, mais prolongada é a fase de latência (MANO et al., 2002).

Quanto ao tempo de duplicação, que é o tempo necessário para a massa celular aumentar duas vezes (FORSYTHE, 2002), houve diferença entre os Experimentos 1, 2 e 3, sendo maior no Experimento 1 (3,0±1,0 °C), seguido pelo Experimento 3 (6,0±1,0 °C) e Experimento 2 (5,0±1,0 °C). O maior tempo de duplicação no Experimento 1 em relação às outras fases era esperado, em função

da menor temperatura de armazenamento. No entanto, este parâmetro de crescimento foi menor no Experimento 2 ($5,0 \pm 1,0$ °C), apesar de uma temperatura de armazenamento menor do que no Experimento 3 ($6,0 \pm 1,0$ °C). Deve ser levado em consideração que, se esta trabalhando com uma faixa de temperatura, e não com uma temperatura de armazenamento fixa.

No Experimento 1 houve um aumento no prazo de validade comercial das amostras embaladas a vácuo e em atmosfera modificada em pelo menos 5 dias, comparada com o das amostras embaladas em ar atmosférico. No Experimento 2 não houve diferença entre as amostras embaladas em ar atmosférico e a vácuo, e pouca diferença em relação às mostras embaladas em atmosfera modificada com 20% de CO₂, como pode ser verificado na Tabela 4. Entretanto em relação às amostras embaladas em atmosfera modificada com 40% de CO₂, houve um aumento significativo deste prazo de validade. No Experimento 3 o acréscimo no período de validade comercial foi de 1 dia, 3 dias e 9 dias, nas amostras embaladas a vácuo e em atmosfera modificada 20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂, quando comparada às amostras embaladas a ar. Resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho (Tabela 4) foi verificado por Chouliara et al. (2007), que obtiveram um prazo de validade comercial de 11 a 12 dias para as amostras embaladas em atmosfera modificada (30/70 CO₂/N₂), armazenadas a 4,0 °C.

Tabela 4. Comparação entre a validade comercial das amostras embaladas em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada (20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂) das amostras, de mesma origem, obtidas em um matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual/RJ (Experimento 1) e em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ (Experimento 2 e Fase 3), armazenadas, respectivamente, a $3,0 \pm 1,0$ °C, a $5,0 \pm 1,0$ °C e a $6 \pm 1,0$ °C durante o período de armazenamento utilizado nos experimentos.

Tratamentos	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média (4,7 °C)
Ar	8	3	5	5
Vácuo	>13	3	6	7
20/80 CO ₂ /N ₂	>13	4	8	8
40/60 CO ₂ /N ₂	>13	>13	>14	13

Os prazos de validade comercial de 5, 7, 9 e 13 dias, respectivamente, obtidos por Jiménez et al. (1997), utilizando amostras de peito de frango com pele embaladas em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada com 30/70

CO₂/N₂ e 70/30 CO₂/N₂, foi semelhante aos verificados nesta pesquisa. Este pequeno prazo de validade obtida por esses autores, na embalagem em atmosfera modificada com 70% de CO₂, pode estar relacionado à elevada contagem inicial de BHAM (5,7 Log UFC/g). Além disso, segundo Frazier e Westhoff (1988), o efeito inibitório do CO₂ aumenta de uma forma quase linear quando se incrementa a sua concentração de em torno de 5% a uns 25-50%, dependendo sempre do alimento e da microbiota presente. Entretanto, em concentrações acima de 50%, o aumento no efeito inibitório do CO₂ é quase nulo. Deve-se atentar para o fato de que, embalar alimentos em elevadas concentrações de CO₂ pode causar um aumento da exsudação (“drip”) em carnes frescas (CHURCH, 1994). Outra possível alteração indesejável é a formação de um sabor ácido desagradável (azedo), o que também está associado à utilização de elevadas concentrações deste gás, determinando maior formação de ácido carbônico (CHURCH; PARSONS, 1995). No presente trabalho não foram verificadas tais alterações, em função das baixas concentrações de CO₂ utilizadas, que foram de 20% e 40%.

Na Tabela 5 pode ser verificado o aumento relativo das BHAM, obtido através da diferença entre as contagens finais e iniciais, das amostras obtidas em um matadouro-frigorífico com SIE/RJ (Experimento 1) e em um estabelecimento comercial (Experimento 2 e 3), nos quatro tratamentos utilizados, sendo que no Experimento 3 as amostras foram inoculadas com *Staphylococcus aureus* coagulase positiva.

Tabela 5. Aumento relativo das contagens (diferença entre as contagens finais e iniciais) de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (Log UFC/g) das amostras, de mesma origem, embaladas em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada (20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂) obtidas em um matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual/RJ (Experimento 1) e em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ (Experimento 2 e Experimento 3), armazenadas durante o período de realização dos experimentos, respectivamente, a 3,0±1,0 °C, a 5,0±1,0 °C e a 6,0±1,0 °C.

Tratamentos	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Ar atmosférico	1,4	3,7	3,5
Vácuo	0,8	3,2	3,3
20/80 CO ₂ /N ₂	0,4	2,9	2,4
40/60 CO ₂ /N ₂	0,0	2,5	0,6

Através da análise dos dados presentes na Tabela 5 verifica-se que a EAM com 40% de CO₂ associada com menor temperatura de armazenamento (Experimento 1) determinou um efeito inibitório maior sobre as BHAM. Outros trabalhos, com carne de frango, que utilizaram concentrações de mistura gasosa e/ou temperaturas de armazenamento diferentes (CHOULIARA et al., 2007; JIMÉNEZ et al., 1997; PATSIAS et al. 2006; SAWAYA et al., 1995) também verificaram que ao aumentar a concentração de CO₂ maior é o efeito inibitório sobre as BHAM. No entanto, deve-se atentar ao fato que concentrações acima de 50%, o aumento no efeito inibitório do CO₂ é quase nulo, ou seja, não prolonga proporcionalmente o prazo de validade comercial. Além de possíveis alterações indesejadas, como relatadas anteriormente (exsudação e sabor ácido desagradável) quando se trabalha com concentrações elevadas de CO₂.

A partir dos dados presentes na Tabela 1 (Experimento 1), na 2 (Experimento 2) e na 3 (Experimento 3), é possível verificar o comportamento das BHAP nas amostras embaladas em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada. No Experimento 1, as BHAP apresentaram fase de latência variável, sendo maior nas amostras embaladas em atmosfera modificada com 40% de CO₂ (5,3 dias). No Experimento 2 e 3, estas bactérias não apresentaram fase de latência, provavelmente devido a uma maior temperatura de armazenamento. A temperatura ótima das BHAP é de 25 a 30 °C, sendo possível o crescimento na faixa de -5 a 35 °C, enquanto das BHAM é na de 30 a 45 °C, mas crescem na de temperatura de 5 a 47 °C (ICMSF, 1980). As BHAP são classificadas como um subgrupo das BHAM, pois apesar de crescerem e deteriorarem alimentos em refrigeração crescem mais em temperaturas superiores, na faixa das BHAM (APHA, 2001). Portanto, de uma maneira geral, mesmo para as BHAP, quanto mais baixa foi a temperatura de armazenamento (Experimento 1), maior foi a sua fase de latência, mas este comportamento não foi verificado em relação ao tempo de duplicação desta microbiota.

No Experimento 1 (3,0±1,0 °C) verificou-se menor tempo de duplicação do que no Experimento 2 (5,0±1,0 °C) para as BHAP, exceto nas amostras embaladas em atmosfera modificada com 20% de CO₂, o que não era esperado, visto que no Experimento 1 a temperatura de armazenamento é menor. No entanto, a contagem final das BHAP no Experimento 1 foi menor em todos tratamentos utilizados. A ausência de fase de latência e uma maior contagem

inicial das BHAP no Experimento 2, pode explicar a maior contagem final nesta fase, comparada ao Experimento 1, apesar de um maior tempo de duplicação. O tempo de duplicação desta microbiota no Experimento 3 foi semelhante ao verificado no Experimento 2. No entanto, a contagem final das BHAP no Experimento 3 em todos os tratamentos utilizados foi maior do que no Experimento 2. O que pode estar relacionado ao fato do dia zero da amostra no Experimento 3, ter começado a partir do segundo dia da data de fabricação, além da maior temperatura e tempo de armazenamento. Pois segundo Frazier e Westhoff (1988) o efeito inibitório do CO₂ é mais eficaz quando as bactérias ainda estão na fase de latência. Além da disponibilidade de O₂, da concentração de CO₂ e da temperatura de armazenamento, a carga bacteriana inicial parece ser determinante no comportamento das bactérias presentes no alimento. Para que a bactéria desempenhe sua atividade metabólica normal e entre na fase logarítmica, é de extrema importância a sua adaptação ao alimento, uma vez que, após obter a sua atividade metabólica plena e havendo nutrientes e fatores que contribuam para o seu desenvolvimento o micro-organismo irá multiplicar-se ativamente no meio.

Na Tabela 6 pode ser verificado o aumento relativo das BHAP, obtido através da diferença entre as contagens finais e iniciais, das amostras obtidas em um matadouro-frigorífico com SIE/RJ (Experimento 1) e em um estabelecimento comercial (Experimento 2 e 3), nos quatro tratamentos utilizados, sendo que no Experimento 3 as amostras foram inoculadas com *Staphylococcus aureus* coagulase positiva.

Tabela 6. Aumento relativo das contagens (diferença entre as contagens finais e iniciais) de bactérias heterotróficas aeróbias psicrótrólicas (Log UFC/g) das amostras, de mesma origem, embaladas em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada (20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂) obtidas em um matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual/RJ (Experimento 1) e em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ (Experimento 2 e Experimento 3), armazenadas durante o período de realização dos experimentos, respectivamente, a 3,0±1,0 °C, a 5,0±1,0 °C e a 6,0±1,0 °C.

Tratamentos	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Ar atmosférico	3,0	3,3	4,1
Vácuo	2,3	2,6	3,5
20/80 CO ₂ /N ₂	1,2	2,4	3,0
40/60 CO ₂ /N ₂	0,9	1,8	3,0

A partir da análise dos dados presentes na Tabela 6 verificou-se que, menor temperatura de armazenamento (Experimento 1) associada ao acondicionamento em embalagem com maior concentração de CO₂ determinou menor crescimento desta microbiota. Portanto, dos quatro tratamentos utilizados, a EAM com 40% de CO₂ apresentou um efeito inibitório maior sobre as BHAP. No entanto, esta interpretação ficou um pouco prejudicada no Experimento 3, possivelmente em função do dia zero do tratamento ter começado a partir do segundo dia da data de fabricação dos filés de peito de frango, sendo portanto, o efeito do CO₂ menos significativo sobre esta microbiota. Os resultados encontrados por Sawaya et al. (1995) e Sarantópoulos (1998), são semelhantes aos encontrados no presente trabalho, uma vez que, obtiveram também um efeito inibitório maior sobre as BHAP, na maior concentração de CO₂ utilizada (70/30 CO₂/N₂ e 80/20 CO₂/N₂, respectivamente).

5.1.2 Contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva

A partir dos dados presentes na Tabela 3 (Experimento 3) e na Figura 2 é possível verificar, o comportamento do *Staphylococcus aureus* coagulase positiva nas amostras embaladas em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada.

Em nenhuma das fases foi verificada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva. Portanto, será comentado neste item o comportamento de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva que foi inoculado no Experimento 3.

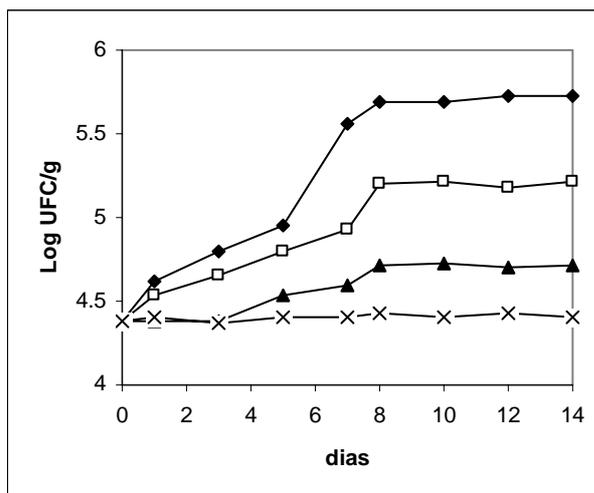


Figura 2. Evolução do *Staphylococcus aureus* coagulase positiva inoculado em filés de peito de frango, obtidos em um estabelecimento comercial do município de Niterói/RJ, armazenados a $6,0 \pm 1,0$ °C (Experimento 3) embalado em ar atmosférico (◆), vácuo (□), 20/80 CO₂/N₂ (▲) e 40/60 CO₂/N₂ (x), durante 14 dias.

O *Staphylococcus aureus* coagulase positiva apresentou fase de latência variável, sendo maior nas amostras embaladas em atmosfera modificada (7,4 dias nas amostras embaladas em 20/80 CO₂/N₂ e 5,0 dias nas amostras embaladas em 40/60 CO₂/N₂) do que nas amostras embaladas em ar (2,6 dias) e a vácuo (0,7 dia), como pode ser verificado na Tabela 3. Portanto, a EAM demandou um maior tempo de adaptação deste microrganismo. Quanto ao tempo de duplicação, este foi maior nas amostras embaladas em atmosfera modificada 40/60 CO₂/N₂ (15,4 dias), sendo menor nas amostras embaladas em atmosfera modificada 20/80 CO₂/N₂ (0,3 dia). Apesar do menor tempo de duplicação do *Staphylococcus aureus* coagulase positiva nas amostras embaladas em atmosfera modificada 20/80 CO₂/N₂, estas foram as que apresentaram maior fase de latência, ou seja, demoraram mais tempo (7, 4 dias) para começar a se multiplicar.

No Experimento 3, das bactérias estudadas, o *Staphylococcus aureus* coagulase positiva foi o que menos se desenvolveu, confirmando a afirmação de Hobbs e Roberts (1998) quanto ao fato que comparados com os bacilos Gram-negativos e Gram-positivos, os *Staphylococcus* spp. são lentos no crescimento. No presente experimento, este micro-organismo apresentou um crescimento de 1,3 Log UFC/g nas amostras embaladas em ar, 0,8 Log UFC/g nas amostras embaladas a vácuo, 0,3 Log UFC/g nas amostras embaladas em 20/80 CO₂/N₂ e

0,1 Log UFC/g nas amostras embaladas em 40/60 CO₂/N₂. Verificou-se portanto, que a EAM com 40% de CO₂ apresentou um efeito inibitório maior sobre *Staphylococcus aureus* coagulase positiva. Os resultados encontrados por Saucier, Gendron e Gariépy (2000) foram corroborados com os encontrados no presente trabalho, uma vez que, também obtiveram maior efeito inibitório em relação a *Staphylococcus aureus* com a maior concentração de CO₂ trabalhada (62/8/30 CO₂/O₂/N₂).

5.1.3 Contagem de bactérias do grupo coliforme

A partir dos dados presentes na Tabela 1 (Experimento 1), 2 (Experimento 2) e 3 (Experimento 3) é possível verificar, o comportamento das bactérias do grupo coliforme nas amostras embaladas em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada. Na Figura 3 está representada a evolução das bactérias do grupo coliforme nos três experimentos.

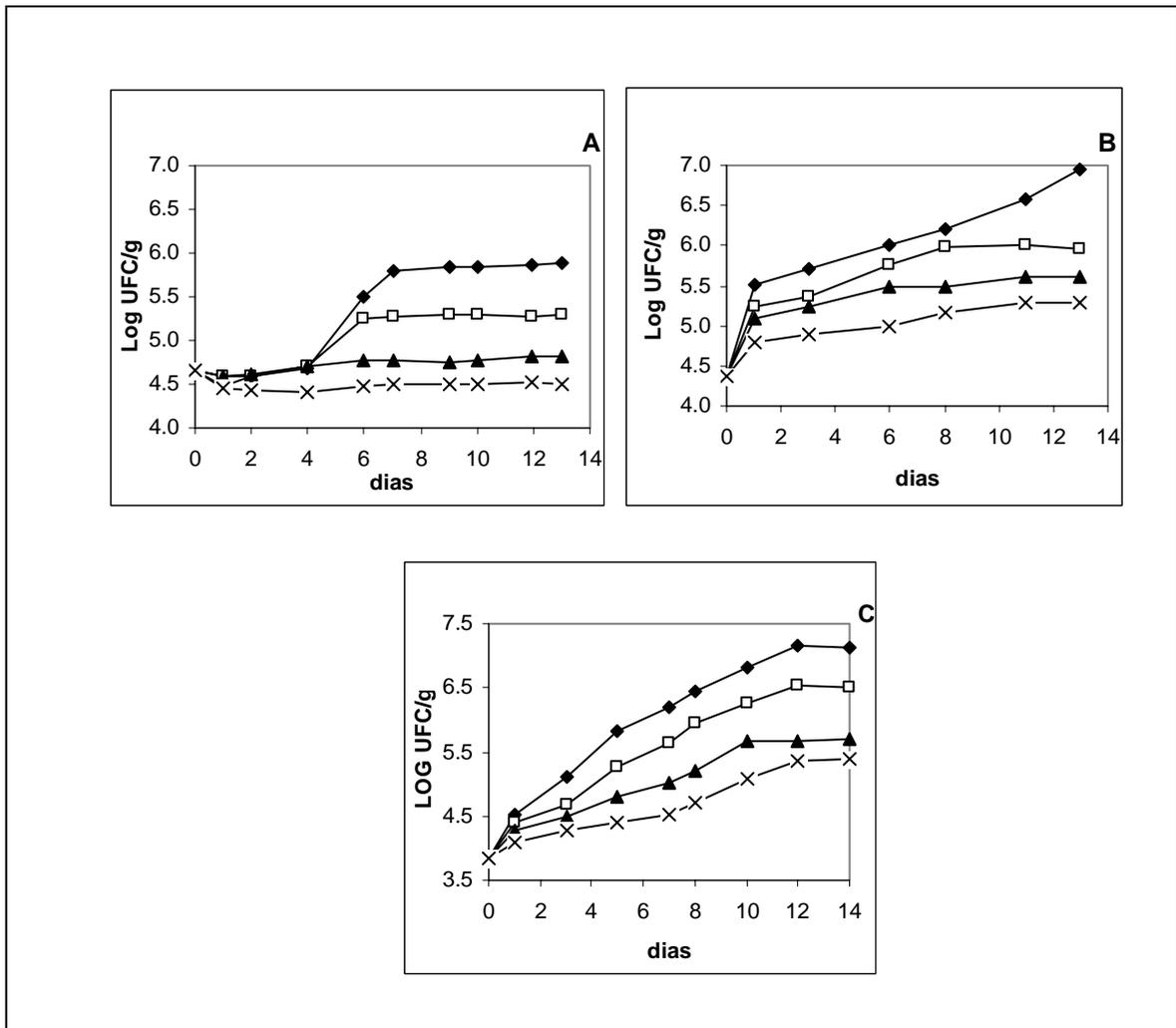


Figura 3. Evolução das bactérias do grupo coliforme, em filés de peito de frango, armazenados a $3,0\pm 1,0$ °C (A - Experimento 1: amostra obtida em um matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual/RJ), a $5,0\pm 1,0$ °C (B - Experimento 2: amostra obtida em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ) e a $6,0\pm 1,0$ °C (C - Experimento 3: amostra obtida em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ e inoculada com *Staphylococcus aureus* coagulase positiva) embalados em ar atmosférico (◆), vácuo (□), 20/80 CO₂/N₂ (▲) e 40/60 CO₂/N₂ (x), durante o período de armazenamento utilizado nos experimentos.

No Experimento 1, as bactérias do grupo coliforme apresentaram fase de latência variável. A maior fase de latência (4,0 dias) foi verificada nas amostras embaladas em ar atmosférico, seguindo-se 3,9 dias nas amostras embaladas a vácuo, 3,7 dias nas amostras embaladas em atmosfera modificada com 20% de CO₂, e ausência de fase de latência nas amostras embaladas em atmosfera modificada com 40% de CO₂. Observou-se também, que conforme se aumentou a concentração de CO₂ na embalagem, a adaptação das bactérias do grupo coliforme foi favorecida, diminuindo a sua fase de latência. Na EAM com 40% de CO₂ a contagem das bactérias do grupo coliforme se manteve inalterada ao longo dos 13 dias de armazenamento, como pode ser verificado na Figura 3A. No

entanto, o resultado negativo do tempo de duplicação (-95,5 dias) indica morte celular, pois a cada 95,5 dias a população de coliformes seria reduzida à metade.

No Experimento 2 as bactérias do grupo coliforme não apresentaram fase de latência, em nenhum dos tratamentos utilizados. No entanto, o tempo de duplicação foi maior nas amostras embaladas em atmosfera modificada do que nas amostras embaladas em ar atmosférico e a vácuo. Apesar das amostras embaladas em ar atmosférico apresentarem maior tempo de duplicação do que as amostras embaladas a vácuo, as suas contagens finais foram maiores do que das amostras embaladas a vácuo, como pode ser verificado na Tabela 2.

No Experimento 3 as bactérias do grupo coliforme também não apresentaram fase de latência, em nenhum dos tratamentos utilizados. O tempo de duplicação foi maior nas amostras embaladas em atmosfera modificada do que nas amostras embaladas a vácuo e em ar atmosférico. O tempo de duplicação no Experimento 3 ($6,0 \pm 1,0$ °C) foi menor do que no Experimento 2 ($5,0 \pm 1,0$ °C), sendo esta diferença mais evidente nas amostras embaladas em atmosfera modificada, possivelmente em função do dia zero das amostras no Experimento 3 ter começado a partir do segundo dia da data de fabricação dos filés de peito de frango, sendo, portanto, o efeito do CO₂ menos significativo nestas amostras, além da maior temperatura de armazenamento.

Na Tabela 7 pode ser verificado o aumento relativo das bactérias do grupo coliforme, obtido através da diferença entre as contagens finais e iniciais, das amostras obtidas em um matadouro-frigorífico com SIE/RJ (Experimento 1) e em um estabelecimento comercial (Experimento 2 e 3), nos quatro tratamentos utilizados, sendo que no Experimento 3 as amostras foram inoculadas com *Staphylococcus aureus* coagulase positiva.

Tabela 7. Aumento relativo das contagens (diferença entre as contagens finais e iniciais) de bactérias do grupo coliforme (Log UFC/g) das amostras, de mesma origem, embaladas em ar atmosférico, a vácuo e em atmosfera modificada (20/80 CO₂/N₂ e 40/60 CO₂/N₂) obtidas em matadouro-frigorífico com serviço de Inspeção Estadual/RJ (Experimento 1) e em estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ (Experimento 2 e Experimento 3), armazenadas durante o período de realização dos experimentos, respectivamente, a 3,0±1,0 °C, a 5,0±1,0 °C e a 6,0±1,0 °C.

Tratamentos	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Ar atmosférico	1,2	2,5	3,8
Vácuo	0,6	1,6	2,8
20/80 CO ₂ /N ₂	0,1	1,2	2,2
40/60 CO ₂ /N ₂	-0,2	0,9	1,6

Através da análise dos dados presentes na Tabela 7 verificou-se que a EAM com 40% de CO₂ associada a uma menor temperatura de armazenamento (Experimento 1), apresentou um efeito inibitório maior sobre as bactérias do grupo coliforme. Os resultados encontrados por Saucier, Gendron e Gariépy (2000) concordam com os resultados do presente trabalho, pois verificaram que, o menor crescimento das bactérias do grupo coliforme ocorreu com a maior concentração de CO₂ utilizada (68% CO₂). No entanto, estes pesquisadores trabalharam com frango embalado em atmosfera modificada contendo O₂ e alta concentração de CO₂ (62 CO₂, 8 O₂ e 30 N₂) e uma outra mistura sem O₂ (20/80 CO₂/N₂).

De uma forma geral, a diferença entre o Experimento 1, 2 e 3 está relacionada ao local de obtenção das amostras (matadouro-frigorífico com SIE – Experimento 1 e estabelecimento comercial – Experimento 2 e 3), à temperatura de armazenamento (3,0±1,0 °C, 5,0±1,0 °C e 6,0±1,0 °C, respectivamente) e à carga bacteriana inicial. Esta diferença no Experimento 1, está provavelmente relacionada ao intervalo entre o abate e a obtenção das amostras no matadouro-frigorífico, antes do seu encaminhamento para a câmara de resfriamento. Enquanto que, no Experimento 2 e 3, ao tempo decorrido entre a data de fabricação dos filés de peito de frango e o de compra (1 dia e 2 dias, respectivamente). Sendo que a referida data não corresponde à data do abate, mas sim a do dia seguinte. Portanto, no Experimento 2 e no 3, o dia zero corresponde a 2 e 3 dias após o abate, respectivamente. Uma peculiaridade do Experimento 3 foi a inoculação de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva.

5.2 DETERMINAÇÃO DE pH

Na Figura 4 está representada a evolução do pH em filés de peitos de frango, nos quatro tratamentos utilizados e nos três experimentos.

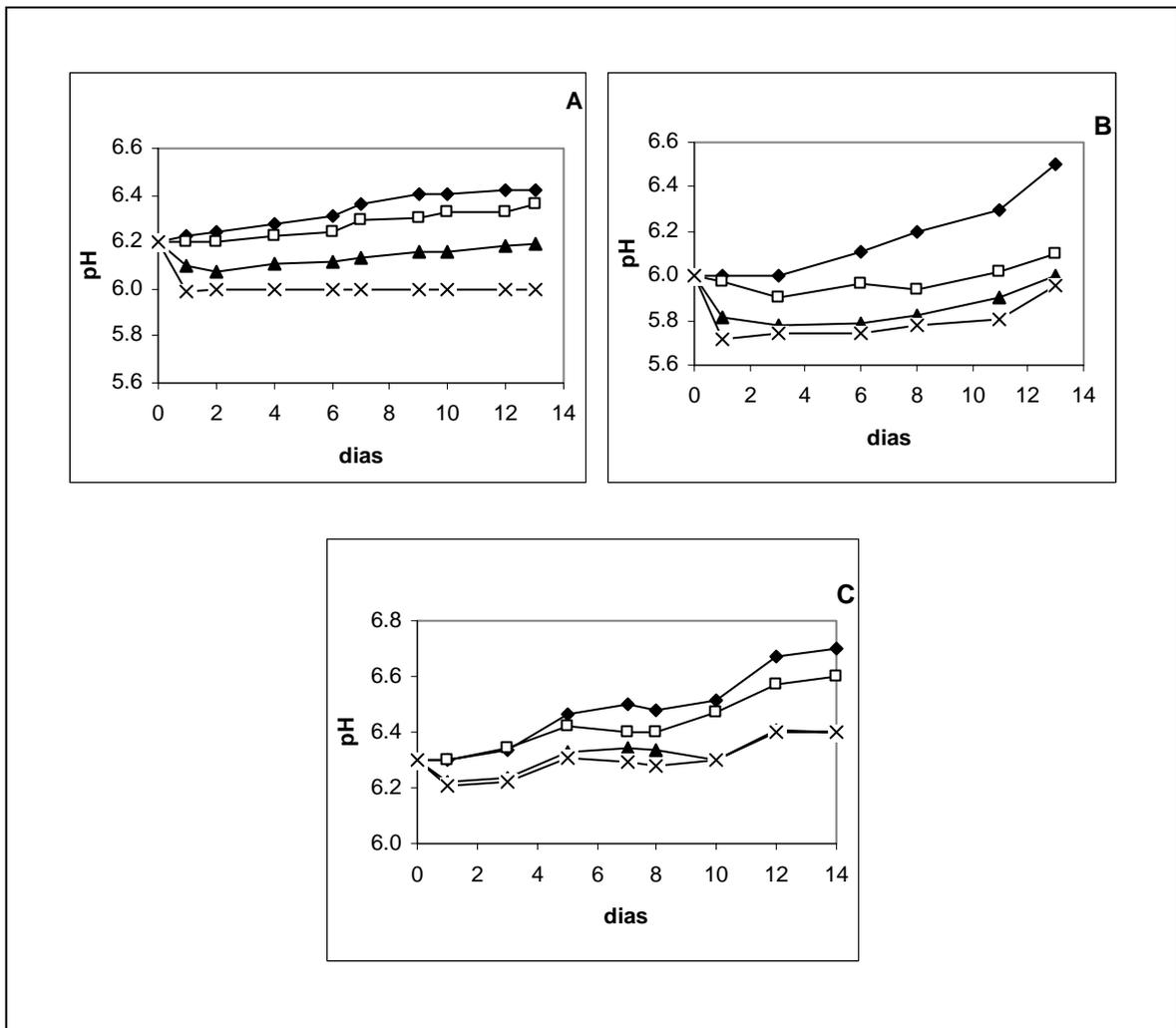


Figura 4. Evolução do pH em filés de peito de frango, armazenados a $3,0 \pm 1,0$ °C (A- Experimento 1: amostra obtida em um matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual/RJ), a $5,0 \pm 1,0$ °C (B- Experimento 2: amostra obtida em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ) e a $6,0 \pm 1,0$ °C (C- Experimento 3: amostra obtida em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ e inoculada com *Staphylococcus aureus* coagulase positiva) embalados em ar atmosférico (◆), vácuo (□), 20/80 CO₂/N₂ (▲) e 40/60 CO₂/N₂ (x), durante o período de armazenamento utilizado nos experimentos.

No Experimento 1 foi verificada menor variação de pH (6,0 a 6,4) quando comparada ao Experimento 2 (5,7 a 6,5) e ao Experimento 3 (6,2 a 6,7). Portanto, parece haver uma relação entre a maior contagem bacteriana com o maior pH final, o que se justifica, pois quanto maior a quantidade de bactérias mais intensa

é a sua atividade metabólica sobre o alimento, gerando compostos alcalinos que elevam o pH do meio. Nas amostras embaladas em atmosfera modificada, o CO₂ manteve o pH da carne de frango estável por mais tempo. A variação de pH observada no presente trabalho no Experimento 1 e no 2 (Figura 4) foi semelhante à verificada por Chouliara et al. (2007), pois encontraram nas amostras embaladas em ar e em atmosfera modificada (30/70 CO₂/N₂ e 70/30 CO₂/N₂) uma variação de 5,9 a 6,4.

Segundo Silva Junior (2005) a carne de frango normal apresenta um pH final de 6,2 a 6,4, sendo que, o intervalo apresentado por Forsythe (2002) é um pouco mais amplo (5,6 a 6,4), ou seja, mais próximo dos resultados encontrados no presente trabalho. O elevado pH inicial da carne de frango fresca é apontado por Jay (2005), como o principal fator responsável por este produto não ter uma validade comercial tão longa quanto da carne bovina, quando ambos são embalados em atmosfera modificada.

6 CONCLUSÕES

- Nas amostras obtidas em um matadouro-frigorífico com SIE/RJ (Experimento 1) a contagem de BHAP foi a análise mais importante na avaliação da deterioração do filé de peito de frango;
- Nas amostras obtidas em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ (Experimento 2) destacou-se o crescimento das BHAM, certamente relacionado ao abuso de temperatura de armazenamento;
- Nas amostras obtidas em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ e inoculadas com *Staphylococcus aureus* coagulase positiva (Experimento 3), o crescimento mais significativo foi das BHAP enquanto que o menor crescimento verificado foi do *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, confirmando que este micro-organismo é um péssimo competidor;
- Nas amostras obtidas em um estabelecimento comercial do Município de Niterói/RJ e inoculadas com *Staphylococcus aureus* coagulase positiva (Experimento 3), apresentaram contagens finais maior do que nos outros experimentos, nos 4 tratamentos utilizados, (ar atmosférico, vácuo, 20/80 e 40/60 CO₂/N₂) e conseqüentemente maior pH final. Demonstrando a importância da utilização desta tecnologia imediatamente após o abate;
- Ao aumentar a concentração de CO₂ associada a menor temperatura de armazenamento e menor contagem inicial prolonga-se a validade comercial dos filés de peito de frango;

- A EAM com 40% de CO₂ teve efeito mais significativo na inibição das bactérias estudadas.

Com base nas conclusões, sugere-se a utilização da EAM com 40% CO₂ sendo a que apresentou resultados mais significativos, prolongando a validade comercial, por no mínimo oito dias (4,7 °C), comparada a embalagem em ar atmosférico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEF - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS. *Estatísticas*. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/Estatisticas/MercadoInterno/Atual.asp#>>. Acesso em: 13 out. 2008, 15:43h.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Compendium of Methods For The Microbiological Examination of Foods*. 4.ed. 2001. 676p.

AVISITE. *Industrialização do frango: como transformar coxas em peito*. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/noticias/noticias_maisnot.asp?codnoticia=6025&codCategoria=&Mes=9&Ano=2005>. Acesso em: 1 dez. 2007, 22: 48h.

BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, v.23, p.277-294, nov. 1994.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M.N. *Fundamentos de Tecnologia de Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1998. 317p.

BOURGEOIS, C.M.; MESCLE, J.F.; ZUCCA, J. *Microbiologia alimentaria: Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*. Zaragoza (Espanha): Acribia, 1988. 437p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Aprova os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.14, 18 set. 2003, Seção 1, 2003.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA).

Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II Métodos Físico-Químicos. Brasília, 1981, 123p.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os Procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília - DF, 26 março 2004.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus Anexos I e II. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, n. 7-E, p. 45-53, 10 jan. 2001, Seção 1.

CHOULIARA, E.; KARATAPANIS, A. SAVVAIDIS, I.N.; KONTOMINAS, M.G. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf –life extension of fresh chicken breast meat 4 °C. *Food Microbiology*, v. 24, n. 6, p. 607-617, set. 2007.

CHURCH, I.J.; PARSONS, A.L. Modified atmosphere packaging technology: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.67, n.2, p. 143-152, set. 1995.

CHURCH, N. Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies. *Trends in Food Science and Technology*, v.5, n.11, p.345-352, nov.1994.

DODDS, K.L. Introdução. In: FARBER, J.M.; DODDS, K.L. *Principles of modified – atmosphere and sous vide product packaging*. 464p. cap.1, p. 1-11. 1995. Disponível em: <http://books.google.com/books?hl=pt-BR&lr=&id=CWkH8YHiYsEC&oi=fnd&pg=PA105&ots=EiirJSmajs&sig=cMBA3Hn_roi5ZrdufUcLeOxCZQ#PPR5,M1> .Acesso em: 06 nov. 2008, 8h.

FENG, P.; WEAGANT, S.D.; GRANT, M.A. Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bactéria. In: *Bacteriological analytical manual*. 8.ed. 1998. cap. 4. revised: 2002. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>>. Acesso em: 19 out. 2007, 22:30h.

FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: ARTMED, 2002. 424p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2005. 182p.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1988. 681p.

FREITAS, M.F.L.; LEÃO, A.E.D.S.; STAMFORD, T.L.M.; MOTA, R.A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em carcaças de frango. *Boletim. CEPPA*, v. 22, n. 2, p. 271-282, jul./dez. 2004.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S.; UNGAR, M.L. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. 2.ed. ver. ampl. São Paulo: Varela, 2003. 655p.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. *Toxinfecções e Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos*. São Paulo: Varela, 1998. 376p.

ICMSF-INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD. In: Temperatura. *Ecología Microbiana de los Alimentos*. Factores afectan a la sobrevivencia de los microorganismos em los alimentos, v.1. Zaragoza: Acríbia, 1980, p. 4.

ICMSF-INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD. In: Microorganisms in Food. *Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications*, v.2, 2 ed., University of Toronto, p. 181-196, 1986.

JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JIMÉNEZ, S.M.; SALSI, M.S.; TIBURZI, M.C.; RAFAGHELLI, R.C.; TESSI, M.A.; COUTAZ, V.R. Spoilage microflora in fresh chicken breast stored at 4 degrees C: influence of packaging methods. *Journal of applied microbiology*, v. 83, n. 5, p. 613-618, nov. 1997.

LEMONS, A.L.S.C.; CASTILHO, C.J.C. *Seminário e Workshop "Industrialização da carne de aves*. Instituto de Tecnologia de Alimento (ITAL). Centro de Tecnologia da Carne. Campinas, 1997. 61p.

MANO, S.B.; PEREDA, J.A.O.; FERNANDO, G.D.G. Aumento da vida útil e microbiologia da carne suína embalada em atmosfera modificada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.22, n.1, p. 1-10, jan./abr. 2002.

MERGEN, I. Z. *Estudo da perda de vácuo em embalagens de produtos cárneos curados cozidos*. Santa Catarina, 2004. 103p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2004.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. *Enterobacteriaceae*. In: _____. *Microbiologia Médica*. 5.ed. Elsevier, 2006. cap.31, p. 315-330.

OLIVEIRA, L.M.; SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; CUNHA, D.G.; LEMOS, A.B. Embalagens termoformadas e termoprocessáveis para produtos cárneos processados. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.16, n.3, p. 202-210, 2006.

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

PATSIAS, A.; CHOULIARA, I.; BADEKA, A.; SAVVAIDIS, I.N.; KONTOMINAS, M.G. Shelf-life of a chilled precooked chicken product stored in air and under modified atmospheres: microbiological, chemical, sensory attributes. *Food Microbiological*, v.23, n.5, p. 423-429, ago. 2006.

PEREIRA, K.S.; PEREIRA, J.L. Estafilococos coagulase negativa: potenciais patógenos em alimentos. *Higiene Alimentar*, v. 19, n. 129, p. 32-34, mar. 2005.

PIERGIOVANNI, L. Materiais de Embalagens e Tecnologias de Envase. In: BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M.N. *Fundamentos de Tecnologia de Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1998. 317p. cap. 10, p. 219- 278.

RITTER, R.; BERGMANN, G.P. Período de vida de prateleira de frangos resfriados e refrigerados. *Higiene Alimentar*, v. 17, n. 107, p. 95-102, abr. 2003.

ROÇA, R.O. *Refrigeração*. Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Animal. Disponível em: <<http://puhrs.campus2.br/~thompson/tpoa.htm>>. Acesso em: 24 out. 2007, 19:30h.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; ALVES, R.M.V.; CONTRERAS, C.J.C.; GALVÃO, M.T.E.L.; GOMES, T.C. Use of a Modified Atmosphere Masterpack for Extending the Shelf Life of Chicken Cuts. *Packaging Technology and Science*, v.11, n.5, p. 217-229, set./out. 1998.

SAUCIER, L.; GENDRON, C.; GARIÉPY, C. Shelf life of Ground Poultry Meat Stored Under Modified Atmosphere. *Poultry Science*, v. 79, n.12, p. 1851-1856, jul. 2000.

SAWAYA, W.N.; ELNAWAWY, A.S.; ABU-RUWAIDA, A.S.; KHALAFAWI, S.; DASHTI, B. Influence of modified atmosphere packaging on shelf-life of chicken carcasses under refrigerated storage conditions. *Journal of Food Safety*, v.15, n.1, p. 35-51, mar. 1995.

SCHEUERMANN, G.N. *Alteração na quantidade e qualidade da carne de aves através da manipulação das fibras musculares*. Disponível em: <<http://www.avesite.com.br/cet/trabalhos.asp?codigo=69>>. Acesso em: 1 dez. 2007, 22h.

SILVA JUNIOR, E.A. Fundamentos microbiológicos importantes. In:_____. *Manual de Controle Higiénico- Sanitário em Serviços de Alimentação*. 6.ed. São Paulo: Varela, 2005. 623p. cap.1, p.25.

SILVA, W.P.; GANDRA, E.A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. *Higiene Alimentar*, v. 18, n. 122, p. 32- 40, jul. 2004.

SMITH, J.P.; RAMASWAMY, H.S.; SIMPSON, B.K. Developments in food packaging technology. Parte 2: storage aspects. *Trends in Food Science and Technology*, v., n., p. 111-118, nov.1990.

TRABULSI, L. R.; ORDÓÑEZ, J.G.; MARTINEZ, M.B. Enterobacteriaceae. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4 ed. Atheneu: São Paulo, 2004. 717p, cap. 35, p. 269- 276.

UNICAMP. *Músculo Esquelético Normal*. Disponível em: <<http://www.fcm.unicamp.br/deptos/anatomia/musnormal.html>>. Acesso em: 1 dez. 2007.