

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

CLEONICE MENDES PEREIRA SARMENTO

**MODELAGEM DO CRESCIMENTO MICROBIANO E AVALIAÇÃO SENSORIAL
NO ESTUDO DA VIDA DE PRATELEIRA DA MORTADELA E DA LINGÜIÇA
DEFUMADA EM ARMAZENAMENTO ISOTÉRMICO E NÃO ISOTÉRMICO**

Florianópolis – SC
Setembro – 2006

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

**MODELAGEM DO CRESCIMENTO MICROBIANO E AVALIAÇÃO SENSORIAL
NO ESTUDO DA VIDA DE PRATELEIRA DA MORTADELA E DA LINGÜIÇA
DEFUMADA EM ARMAZENAMENTO ISOTÉRMICO E NÃO ISOTÉRMICO**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química como requisito
final para obtenção do Grau de Doutor em
Engenharia Química.**

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Gláucia Maria Falcão de Aragão

CLEONICE MENDES PEREIRA SARMENTO

Florianópolis
Setembro – 2006

Agradecimentos

A DEUS pela suprema felicidade da vida.

À Prof^ª Dr^ª Gláucia Maria Falcão Aragão pelo privilégio de poder contar com a sua orientação, sua disponibilidade, atenção, confiança e por todos os momentos que tive oportunidade de aprender com a sua seriedade e empenho na realização deste trabalho. Muito obrigada!

À banca examinadora pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

À empresa FRIMESA pelo apoio financeiro e técnico para produção das amostras de mortadela e lingüiça defumada. Agradecimento especial ao Sr. Elias José Zydek e Sr. Vitor Frosi. A Giana do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento pela sua atenção e disponibilidade e toda sua equipe (Rosângela, Sarita, Cândida). A Nara do laboratório de análises químicas e a toda equipe da produção e embalagem que contribuíram na coleta das amostras e na produção das formulações dos produtos cárneos.

À estagiária Regiane pelo seu empenho e dedicação, Elé e a todas as estagiárias dos laboratórios de Tecnologia em Alimentos da UTFPR pela colaboração.

À minha amiga Rute Womer pelo apoio técnico e disponibilidade em todos os momentos, sem se importar com final de semana, feriado, dia ou noite, sempre presente quando eu mais precisava. Agradecimento muito especial.

À Prof^ª. Dr^ª. Saraspathy N. T. Mendonça pelo apoio nas análises sensoriais, e a toda equipe treinada e não treinada da UTFPR - Campus Medianeira no empenho da avaliação dos produtos cárneos.

Aos meus filhos Ricardo e Eduardo pela compreensão e carinho e por estarmos juntos em mais esta etapa das nossas vidas. Especialmente ao Luiz Alberto, meu marido, pela atenção, paciência e ajuda constante em todos os momentos.

A UTFPR pela liberação das minhas atividades e por disponibilizar a estrutura física para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 A indústria da carne.....	5
2.2 Processamento tecnológico da carne.....	7
2.3 Métodos de conservação de alimentos.....	14
2.4 Vida de prateleira de produtos cárneos.....	20
2.5 Métodos de análise sensorial.....	24
2.6 Importância das bactérias ácido lácticas.....	26
2.7 Microbiologia preditiva.....	30
2.8 Modelos matemáticos.....	32
2.8.1 Modelos primários de crescimento.....	33
2.8.2 Modelos secundários de crescimento.....	36
2.9 Comparação dos modelos preditivos.....	37
2.10 Modelo Não Isotérmico.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Matéria-prima.....	42
3.2 Bactérias ácido lácticas.....	42
3.3 Meios de cultura.....	42
3.4 Levantamento microbiológico.....	42
3.4.1 Procedimento para análise microbiológica.....	45
3.5 Determinação da vida de prateleira da mortadela e lingüiça defumada de suíno padrão.....	45
3.6 Análise sensorial da mortadela e lingüiça defumada de suíno padrão.....	46
3.7 Avaliação do crescimento de culturas puras de <i>L. sakey</i> e <i>L. plantarum</i> em meio MRS.....	47
3.7.1 Preparo do inóculo de <i>L. sakey</i>	47

3.7.2	Preparo do inóculo de <i>L. plantarum</i>	47
3.7.3	Crescimento em caldo MRS.....	47
3.7.3.1	Planejamento fatorial fracionário de resolução cinco.....	47
3.7.3.2	Delineamento composto central rotacional.....	50
3.7.3.3	Obtenção das curvas de crescimento.....	51
3.8	Parâmetros de Crescimento para <i>L. sakey</i> e <i>L. plantarum</i>	52
3.9	Novas formulações de mortadela e lingüiça defumada.....	52
3.9.1	Produção das novas formulações de mortadela e da lingüiça defumada.....	52
3.9.2	Determinação da vida de prateleira das novas formulações de mortadela lingüiça defumada.....	53
3.9.3	Avaliação da mortadela em armazenamento isotérmico.....	54
3.9.4	Avaliação da mortadela em armazenamento não isotérmico.....	55
3.10	Modelagem do crescimento microbiano em armazenamento não isotérmico.	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
4.1	Levantamento microbiológico da linha de produção.....	58
4.1.1	Linha de produção da mortadela.....	58
4.1.2	Linha de produção da lingüiça defumada.....	59
4.2	Vida de prateleira da mortadela e da lingüiça defumada de suíno.....	60
4.2.1	Avaliação microbiológica da mortadela armazenada às temperaturas de 20°C e 30°C.....	61
4.2.2	Análise sensorial da mortadela armazenada às temperaturas de 20°C e 30°C.....	62
4.2.2.1	Teste da Escala Hedônica de sete pontos.....	62
4.2.2.2	Teste Duo Trio.....	66
4.2.3	Avaliação microbiológica da lingüiça defumada de suíno armazenada às temperaturas de 5°C e 10°C.....	68
4.2.4	Análise Sensorial da lingüiça defumada de suíno armazenada às temperaturas de 5°C e 10°C	70
4.2.4.1	Teste da Escala Hedônica de sete pontos.....	70
4.2.4.2	Teste Duo Trio.....	72
4.3	Avaliação do crescimento de <i>L. sakey</i> e de <i>L. plantarum</i> em caldo MRS.....	74
4.3.1	Avaliação do crescimento de <i>L. sakey</i> – Planejamento Fatorial Fracionado.....	74

4.3.2	Avaliação do crescimento de <i>L. plantarum</i> – Planejamento Fatorial Fracionado.....	81
4.3.3	Avaliação do crescimento do <i>L. sakey</i> – Delineamento composto central rotacional.....	88
4.3.4	Avaliação do crescimento do <i>L. plantarum</i> – Delineamento composto central rotacional.....	95
4.4	Avaliação da vida de prateleira da mortadela e da lingüiça defumada com as novas formulações.....	102
4.4.1	Produção das novas formulações de mortadela e lingüiça defumada.....	102
4.4.2	Avaliação microbiológica e sensorial das novas formulações de lingüiça defumada.....	103
4.4.2.1	Avaliação microbiológica das novas formulações de lingüiça defumada.....	103
4.4.2.2	Avaliação sensorial das novas formulações da lingüiça defumada.....	105
4.4.3	Avaliação microbiológica e sensorial das novas formulações de mortadela..	106
4.4.3.1	Avaliação microbiológica das novas formulações de mortadela.....	106
4.4.3.2	Avaliação sensorial das novas formulações de mortadela.....	107
4.5	Armazenamento isotérmico da mortadela padrão e mortadela 1.....	109
4.5.1	Influência da temperatura no crescimento microbiano da mortadela padrão e mortadela 1 em armazenamento isotérmico.....	109
4.5.2	Modelagem do crescimento microbiano da mortadela com formulação padrão em armazenamento isotérmico.....	112
4.5.3	Modelagem do crescimento microbiano da mortadela 1 em armazenamento isotérmico.....	115
4.6	Armazenamento não isotérmico da mortadela padrão e da mortadela 1	119
4.6.1	Descrição do perfil de temperatura para armazenamento não isotérmico.....	119
4.6.2	Avaliação do crescimento microbiano da mortadela com formulação padrão e da mortadela 1 em armazenamento não isotérmico.....	121
4.6.3	Modelo Não Isotérmico.....	124
5	CONCLUSÕES.....	130
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132
	ANEXO.....	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Produtos cárneos e quantidades permitidas de carne mecanicamente separada (CMS).....	9
Tabela 2.2	Aplicações de modelos primários de crescimento.....	36
Tabela 3.1	Temperaturas de armazenamento da mortadela e lingüiça defumada.....	45
Tabela 3.2	Planejamento fatorial fracionário de resolução cinco.....	49
Tabela 3.3	Níveis e fatores do planejamento fatorial fracionário.....	49
Tabela 3.4	Níveis e fatores do delineamento composto central rotacional.....	50
Tabela 3.5	Delineamento composto central rotacional.....	51
Tabela 4.1	Teste de Escala Hedônica de sete pontos da mortadela.....	63
Tabela 4.2	Teste da Escala Hedônica de sete pontos da lingüiça defumada.....	70
Tabela 4.3	Índices estatísticos para avaliação de <i>L. sakey</i> no planejamento fatorial fracionado, com os Modelos Logísticos e Gompertz Modificado.....	76
Tabela 4.4	Parâmetros de crescimento do <i>L. sakey</i> obtidos pelo ajuste do Modelo Logístico no planejamento fatorial fracionado.....	77
Tabela 4.5	Análise da variância e estimativa dos efeitos significativos de <i>L. sakey</i> com o planejamento fatorial fracionado.....	78
Tabela 4.6	Índices estatísticos para avaliação de <i>L. plantarum</i> no planejamento fatorial fracionado, com o Modelo Logístico e Modelo de Gompertz Modificado.....	83
Tabela 4.7	Parâmetros de crescimento do <i>L. plantarum</i> obtidos pelo ajuste do Modelo de Gompertz Modificado com o planejamento fatorial fracionado.....	84
Tabela 4.8	Análise da variância e estimativa dos efeitos significativos para <i>L. plantarum</i> com o planejamento fatorial fracionado.....	85
Tabela 4.9	Índices estatísticos para avaliação de <i>L. sakey</i> no delineamento composto central rotacional, com o Modelo Logístico e Modelo de Gompertz Modificado.....	90
Tabela 4.10	Parâmetros de crescimento do <i>L. sakey</i> obtidos pelo ajuste do Modelo Logístico com o delineamento composto central rotacional.....	91
Tabela 4.11	Análise da variância e estimativas dos efeitos significativos para <i>L. sakey</i> com o delineamento composto central rotacional.....	92
Tabela 4.12	Índices estatísticos para avaliação de <i>L. plantarum</i> no delineamento	

	composto central rotacional, com o Modelo Logístico e o Modelo de Gompertz Modificado.....	97
Tabela 4.13	Parâmetros de crescimento de <i>L plantarum</i> obtidos pelo ajuste do Modelo Logístico com o delineamento composto central rotacional.....	98
Tabela 4.14	Análise da variância e estimativa dos efeitos significativos para <i>L. plantarum</i> com o delineamento composto central rotacional.....	99
Tabela 4.15	Proposta das novas formulações da mortadela e da lingüiça defumada.....	103
Tabela 4.16	Médias dos julgamentos dos atributos da amostra padrão e das novas formulações de lingüiça defumada (lingüiça 1 e lingüiça), obtidas após 35 dias de armazenamento a temperatura de 30°C pelo teste da Escala Hedônica de sete pontos.....	105
Tabela 4.17	Médias dos julgamentos dos atributos da amostra padrão e das novas formulações de mortadela (mortadela 1 e mortadela 2), obtidas após 35 dias de armazenamento a temperatura de 30°C pelo teste da Escala Hedônica de sete pontos.....	108
Tabela 4.18	Valores dos índices, erro médio quadrático (MSE), coeficiente de regressão (R^2), fator bias e fator de exatidão, para os Modelos de Gompertz Modificado, Logístico e Logístico Modificado, da formulação padrão da mortadela, armazenada nas temperaturas de 20, 25 e 30°C.....	113
Tabela 4.19	Parâmetros de crescimento microbiológicos para formulação padrão da mortadela, armazenada nas temperaturas de 30, 25 e 20°C, obtidos pelo ajuste do Modelo de Gompertz Modificado e Modelo Logístico Modificado.....	115
Tabela 4.20	Valores dos índices estatísticos, erro médio quadrático (MSE), coeficiente de regressão (R^2), fator bias e fator de exatidão, para os Modelos de Gompertz Modificado, Logístico e Logístico Modificado, da formulação da mortadela 1, armazenada nas temperaturas de 20, 25 e 30°C.....	117
Tabela 4.21	Parâmetros de crescimento microbiológicos para nova formulação da mortadela 1, armazenada nas temperaturas de 30, 25 e 20°C, obtidos	

	pele ajuste do Modelo de Gompertz Modificado, e Modelo Logístico Modificado.....	118
Tabela 4.22	Parâmetros obtidos com Modelo Logístico Modificado para a formulação padrão de mortadela e para mortadela 1, armazenadas às temperaturas de 20, 25 e 30°C.....	125
Tabela 4.23	Equações exponenciais que descrevem os modelos secundários para os parâmetros de crescimento em função da temperatura da formulação da mortadela 1.	126
Tabela 4.24	Equações exponenciais que descrevem os modelos secundários de variação dos parâmetros de crescimento em função da temperatura da formulação padrão da mortadela.....	126
Tabela 4.25	Índices estatísticos para avaliação do Modelo Não isotérmico ajustado aos dados experimentais da mortadela padrão e mortadela.....	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Fluxograma de produção de mortadela.....	11
Figura 2.2	Fluxograma de produção de lingüiça defumada.....	13
Figura 3.1	Fluxograma de produção da mortadela, com indicação dos pontos de amostragem.....	43
Figura 3.2	Fluxograma de produção da lingüiça defumada de suíno, com indicação dos pontos de amostragem.....	44
Figura 4.1	Contagem total das amostras (ingredientes não cárneos e ingredientes cárneos) coletadas na linha de produção da mortadela.....	58
Figura 4.2	Contagem total das amostras (ingredientes não cárneos e ingredientes cárneos) da linha de produção da lingüiça defumada de suíno.....	59
Figura 4.3	Contagem padrão (PCA) das amostras de mortadela armazenada às temperaturas de 20°C (A20) e 30°C (A30).....	61
Figura 4.4	Contagem de bactérias ácido lácticas (MRS) das amostras de mortadela armazenada às temperaturas de 20°C (A20) e 30°C (A30)..	62
Figura 4.5	Médias atribuídas às amostras de mortadela em relação ao sabor.....	64
Figura 4.6	Índice de aceitabilidade das amostras de mortadela padrão, A20(armazenada a temperatura de 20°C) e A30 (armazenada a temperatura de 30°C) durante 7 semanas.....	65
Figura 4.7	Médias atribuídas às amostras de mortadela padrão, A20C (armazenada a temperatura de 20°C) e A30C (armazenada a temperatura de 30°C), em relação ao aroma.....	66
Figura 4.8	Teste Duo Trio das amostras de mortadela armazenada à temperatura de 20°C.....	67
Figura 4.9	Teste Duo Trio das amostras de mortadela armazenada à temperatura de 30°C.....	67
Figura 4.10	Contagem padrão (PCA) das amostras de lingüiça defumada armazenada às temperaturas de 10°C (A10C) e 5°C (A5C).....	68
Figura 4.11	Contagem de bactérias ácido lácticas (MRS) das amostras de lingüiça defumada armazenada às temperaturas de 10°C (A10C) e 5° (A5C)....	69
Figura 4.12	Média dos atributos avaliados nas amostras de lingüiça defumada:	

	padrão , A5C (armazenada a 5°C) e A10C (armazenada a 10°C).....	71
Figura 4.13	Índice de aceitabilidade das amostras de lingüiça defumada: amostra padrão, A5C (armazenada à temperatura de 5°C) e A10C (armazenada à temperatura de 10°C), durante 8 semanas de armazenamento.....	72
Figura 4.14	Teste Duo Trio das amostras de lingüiça defumada armazenada a temperatura de 5°C.....	73
Figura 4.15	Teste Duo Trio para a lingüiça defumada armazenada a temperatura de 10°C.....	73
Figura 4.16	Curva de crescimento do experimento 16 para <i>L. sakey</i> , obtida com o Modelo Logístico (A) e Modelo Gompertz Modificado (B) no planejamento fatorial fracionado.....	75
Figura 4.17	Curva de crescimento do experimento 18 para <i>L. sakey</i> obtida com o Modelo Logístico (A) e Modelo de Gompertz Modificado (B) no planejamento fatorial fracionado.....	75
Figura 4.18	Curva de nível para variável resposta A (aumento logarítmico da população) sobre o crescimento de <i>L. sakey</i> com o planejamento fatorial fracionado, para os fatores Sal/Pfosfato (1) e lactato/Pfosfato (2).....	79
Figura 4.19	Curva de nível para variável resposta μ sobre o crescimento de <i>L. sakey</i> com o planejamento fatorial fracionado para os fatores sal/Pfosfato.....	80
Figura 4.20	Curva de nível para variável resposta λ , sobre o crescimento de <i>L. sakey</i> , com o planejamento fatorial fracionado, para os fatores sal/Pfosfato (1) e sal/lactato (2).....	80
Figura 4.21	Curva de crescimento do experimento 9 para <i>L. plantarum</i> obtidas com os Modelos Logístico (1) e Gompertz Modificado (2) no planejamento fatorial fracionado.....	82
Figura 4.22	Curva de crescimento do experimento 5 para <i>L. plantarum</i> obtidas com o Modelo Logístico (1) e Modelo Gompertz Modificado (2) no planejamento fatorial fracionado.....	82
Figura 4.23	Curva de nível para variável resposta A sobre o crescimento de <i>L. plantarum</i> com o planejamento fatorial fracionado.....	86
Figura 4.24	Curva de nível para variável resposta μ sobre o crescimento de <i>L.</i>	

	<i>plantarum</i> com o planejamento fatorial fracionado, para os fatores alho/sal (1) e lactato/sal (2).....	86
Figura 4.25	Curva de nível para a variável λ sobre o crescimento de <i>L. plantarum</i> com o planejamento fatorial fracionado, para os fatores alho/sal (1) e lactato/sal (2).....	86
Figura 4.26	Curva de crescimento do experimento 26 para <i>L. sakey</i> obtida com o Modelo Logístico do delineamento composto central rotacional.....	89
Figura 4.27	Curva de crescimento do experimento 26 para <i>L. sakey</i> obtida com o Modelo Gompertz Modificado no delineamento composto central rotacional.....	89
Figura 4.28	Curva de nível para a variável resposta A, para os fatores alho/sal (1) e lactato/sal (2) sobre o crescimento de <i>L. sakey</i> com o delineamento composto central rotacional.....	93
Figura 4.29	Curva de nível para variável resposta μ para os fatores lactato/sal (1) e Pfosfato/sal (2), sobre o crescimento de <i>L. sakey</i> com o delineamento composto central rotacional.....	94
Figura 4.30	Curva de nível para a variável λ , para os fatores lactato/sal (1) e Pfosfato/sal (2), sobre o crescimento de <i>L. sakey</i> , com o delineamento composto central rotacional.....	95
Figura 4.31	Curvas de crescimento dos experimentos 4 (1) e 26 (2) para <i>L. plantarum</i> , obtida com o Modelo de Gompertz Modificado no delineamento composto central rotacional.....	96
Figura 4.32	Curvas de crescimento dos experimentos 4 (1) e 26 (2) para <i>L. plantarum</i> , obtida com o Modelo Logístico no delineamento composto central rotacional.....	96
Figura 4.33	Curvas de nível para variável resposta μ , para os fatores lactato/sal (1) e alho/sal (2), sobre o crescimento de <i>L. plantarum</i> com o delineamento composto central rotacional.....	100
Figura 4.34	Curva de nível para a variável resposta λ para os fatores lactato/Pfosfato, sobre o crescimento de <i>L. plantarum</i> com o delineamento composto central rotacional.....	101
Figura 4.35	Contagem de bactérias ácido lácticas (MRS) para as novas formulações da lingüiça defumada (lingüiça defumada 1 e lingüiça	

	defumada 2) e amostra padrão (padrão), armazenadas a temperatura de 10°C.....	104
Figura 4.36	Contagem de bactérias ácido lácticas (MRS), para as novas formulações de mortadela (mortadela 1 e mortadela 2) e amostra padrão, armazenadas a temperatura de 30°C.....	106
Figura 4.37	Contagem de bactérias ácido láctica para mortadela 1, armazenada em temperaturas constantes de 20, 25 e 30°C.....	110
Figura 4.38	Contagem de bactérias ácido láctica para formulação padrão da mortadela, armazenada nas temperaturas constantes de 20, 25 e 30°C.....	111
Figura 4.39	Curvas de crescimento do experimento com a formulação da mortadela padrão, armazenada a temperatura de 30°C, obtidas com os Modelos de Gompertz Modificado (1) e Logístico Modificado (2).....	112
Figura 4.40	Curvas de crescimento do experimento com a formulação da mortadela padrão, armazenada na temperatura de 20°C, obtidas com o Modelo Logístico (1) e Modelo Logístico Modificado (2).....	113
Figura 4.41	Curvas de crescimento do experimento com a formulação da mortadela 1, armazenada na temperatura de 30°C, obtidas com os Modelos Gompertz Modificado (1) e Logístico Modificado (2).....	116
Figura 4.42	Curvas de crescimento do experimento com a formulação da mortadela 1, armazenada na temperatura de 25°C e obtidas com o Modelo Logístico (1) e Modelo Logístico Modificado (2).....	116
Figura 4.43	Perfil de temperatura descrito para armazenamento da mortadela com formulação padrão e mortadela 1.....	120
Figura 4.44	Contagem de bactérias ácido lácticas (MRS) da formulação padrão e da mortadela 1, em armazenamento não isotérmico.....	121
Figura 4.45	Contagem de bactérias ácido lácticas (MRS) da formulação padrão da mortadela com armazenamento isotérmico e não isotérmico.....	122
Figura 4.46	Contagem de bactérias ácido lácticas (MRS) da formulação mortadela 1 com armazenamento isotérmico e não isotérmico.....	123
Figura 4.47	Parâmetros de crescimento (a, k e tc) em função da temperatura da mortadela 1.....	125
Figura 4.48	Parâmetros de crescimento (a, k e tc) em função da temperatura da	

	mortadela padrão.....	125
Figura 4.49	Curva de crescimento de BAL em mortadela 1 armazenada sob variação de temperatura. A linha contínua representa o ajuste do Modelo Não Isotérmico aos dados experimentais.....	127
Figura 4.50	Curva de crescimento de BAL em mortadela padrão armazenada sob variação de temperatura. A linha contínua representa o ajuste do Modelo Não Isotérmico aos dados experimentais.....	128

RESUMO

Muitas estratégias são adotadas pelas indústrias processadoras de alimentos para garantir a vida útil dos produtos, sendo a temperatura, durante toda a cadeia de produção, um fator extremamente relevante neste aspecto. A microbiologia preditiva é aceita, atualmente, como uma ferramenta útil para prever o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes na avaliação da vida prateleira de carnes e produtos cárneos. As bactérias ácido lácticas (BAL) são importantes deteriorantes destes produtos. Neste trabalho, foi realizado o levantamento microbiológico com amostras retiradas do processo de produção da lingüiça defumada e mortadela, e o acompanhamento microbiológico e sensorial do produto final em armazenamento isotérmico e não isotérmico. Visando estudar os fatores que podem ser alterados para aumentar a vida de prateleira destes produtos, foram realizados experimentos de crescimento de duas BAL, *Lactobacillus plantarum* e *L. sakei* em caldo MRS através dos planejamentos fatorial fracionado e fatorial completo, para análise da influência dos fatores (concentração de sal, de polifosfato (Pfosfato), de lactato, de nitrito/nitrato e de alho). Os experimentos dos planejamentos propostos foram acompanhados pelas curvas de crescimento, através de medidas de absorvância, até a fase estacionária e os resultados foram avaliados com os modelos de Gompertz Modificado e Logístico, através do STATISTICA 6.0. O nitrito/nitrato e o alho não foram considerados estatisticamente significativos nas condições avaliadas. A partir dos resultados obtidos para as culturas puras, foram desenvolvidas novas formulações para mortadela e para lingüiça defumada, alterando as porcentagens dos fatores: concentração de lactato, de Pfosfato e de cloreto de sódio. O acompanhamento do crescimento das BAL foi realizado e os modelos de Gompertz Modificado, Logístico e Logístico Modificado foram ajustados através do STATISTICA 6.0. Os modelos propostos foram avaliados através dos índices estatísticos MSE, fator bias, fator de exatidão e coeficiente de correlação. No armazenamento dos produtos com as novas formulações, verificou-se que as alterações propostas levaram a um aumento de vida de prateleira de aproximadamente 20 dias para lingüiça defumada (10°C) e 10 dias para mortadela (30°C). Estes resultados mostram que as conclusões obtidas no planejamento com culturas puras puderam ser utilizadas na obtenção de novas formulações para produtos cárneos onde estão presentes diferentes BAL. A nova formulação e a amostra padrão de mortadela (formulação da indústria) foram submetidas ao armazenamento não isotérmico simulando a variação de temperatura entre o dia e a noite. A partir dos dados de crescimento de BAL obtidos no armazenamento isotérmico, foi testado um Modelo Não Isotérmico. Este modelo mostrou-se capaz de descrever o comportamento dos produtos cárneos industrializados nestas condições.

ABSTRACT

Many strategies are adopted by food processing industries to guarantee the shelf life of products, where temperature, during all the productive chain, is an extremely important factor. Predictive microbiology is accepted, nowadays, as a useful tool to predict the growth of pathogenic and spoilage microorganisms in the shelf life evaluation of meats and meat products. Lactic acid bacteria (LAB) are important meat spoilage. In this work, the microbiological map was accomplished with samples obtained in the production process of smoked sausage and mortadella, and the microbiological and sensorial evaluation of the final product in isothermal and non-isothermal storage. Aiming the study of factors that can be changed to increase the shelf life of these products, experiments of growth of two LAB, were accomplished *Lactobacillus plantarum* and *L. sakei* in MRS broth through the factorial design and a full factorial design for the analysis of the influence of the factors (salt concentration, polyphosphate (Pphosphate), lactate, nitrite/nitrate and garlic). The growth curves of the proposed planning were analyzed by optical density, until the stationary phase, and Gompertz Modified model and Logistic model were fitted to the results, through STATISTICA 6.0. Nitrite/nitrate and garlic were not considered statistically significant on the evaluated conditions. Starting from results obtained in pure cultures, new formulations for smoked sausage and mortadella were developed, changing the percentage of the factors: lactate concentration, Pphosphate and sodium chloride. Gompertz Modified model and Logistic model were fitted to the growth curves of LAB through STATISTICA 6.0. The proposed models were evaluated through the statistical indexes: MSE, regression coefficient (R^2), bias factor and accuracy factor. During the storage of products with the new formulation, it was verified that the proposed changes resulted in an increase of shelf life of approximately 20 days for smoked sausage (10°C) and 10 days for mortadella (30°C). These results show that the conclusions obtained in pure cultures could be used to obtain new formulations for meat products where different LAB are present. The new formulation and the standard sample (industry formulation) of smoked sausage were submitted to non-isothermal storage simulating the temperature variation between day and night. Using the data of LAB growth obtained in isothermal storage, a non-isothermal model was tested. This model was capable to describe the behavior of industrialized meat products in these conditions.

1-INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a segurança e qualidade dos alimentos, como um dos principais fatores competitivos das cadeias de produção agroalimentares, que vai desde a produção de insumos até ao consumidor final, exige que se busquem mecanismos para melhoria da gestão da qualidade. Essa busca se mostra essencial, haja vista a mudança no comportamento do consumidor, que tende a ser cada dia mais exigente e melhor informado em relação aos produtos que consome, assumindo um importante papel de fiscalizador da qualidade e da segurança dos alimentos (TOLEDO et al., 2004).

Entendem-se como produtos cárneos processados ou preparados, aqueles em que as propriedades originais da carne fresca foram modificadas através de tratamento físico, químico ou biológico, ou ainda, através da combinação destes métodos que visam o prolongamento da vida útil dos produtos, procurando manter as propriedades nutritivas e organolépticas (PARDI et al., 1996). Além disso, visam desenvolver diferentes sabores através de condimentação específica e utilização de diferentes partes do animal de difícil comercialização, no estado fresco (TERRA, 2003). O setor de produtos cárneos cresceu muito nos últimos anos com o desenvolvimento de novos produtos, mas os produtos clássicos continuaram sempre no mercado, como: mortadela, lingüiça, salsicha, presunto, apresuntado, salame, hambúrguer, charque, entre outros. O que mudou, na verdade, foi a variedade de matérias primas envolvidas, além de novos ingredientes, e novos processos, com o objetivo de melhorar a qualidade dos produtos neste setor. Em um mercado cada vez mais competitivo e com o aumento das exigências dos consumidores por qualidade, o melhoramento contínuo dos produtos torna-se imperativo para a sobrevivência das empresas no setor.

A conservação de alimentos pelo emprego de agentes químicos é muito utilizada para prevenir ou retardar a deterioração por microrganismos. O número de compostos químicos utilizados como conservadores é relativamente pequeno e suas quantidades adicionadas nos alimentos são regulamentadas através de uma legislação específica. Garantir a vida útil dos alimentos e a sua segurança microbiológica, implica em minimizar níveis de contaminação, limitando ou impedindo a taxa de crescimento microbiano. Muitas estratégias são adotadas pelas indústrias processadoras de alimentos e estas têm contribuído para tal finalidade, como a implantação de programas de qualidade, novas tecnologias, novas embalagens, além de inúmeros métodos de conservação. Em toda cadeia de produção, a temperatura é um fator extremamente importante para assegurar a vida útil dos alimentos (McMEEKIN et al., 1997).

Segundo Hugas (1998), as carnes são altamente sensíveis à deterioração microbiana devido às suas propriedades como atividade de água, pH e concentração de nutrientes. Nas carnes, as bactérias ácido lácticas constituem uma parte da flora inicial e que se desenvolve facilmente após o seu processamento, estocadas a baixas temperaturas, embaladas a vácuo ou em atmosfera modificada. Linhagens de bactérias ácido lácticas geralmente consideradas como naturais em carnes e produtos cárneos são: *Carnobacterium piscicola*, *C. divergens*, *Lactobacillus sakei*, *L. viridescens*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*. Os produtos metabólicos das bactérias ácido lácticas têm sua importância na preservação dos alimentos. Entretanto, o crescimento incontrolável de algumas espécies de bactérias lácticas pode causar deterioração em carnes e produtos cárneos. As bactérias ácido lácticas foram identificadas como a maior população deteriorante em produtos embalados à vácuo, e em atmosfera modificada, além de outros produtos cárneos processados armazenados sob temperatura de refrigeração (SAMELIS et al., 2000). Na determinação da vida de prateleira de produtos cárneos, é comum o estudo de parâmetros microbiológicos (contagem total, contagem de *Lactobacillus*, enterobactérias, bolores e leveduras), químicos (acidez, índice de oxidação, perda de água) e sensoriais (aroma, sabor, textura, e aparência). Análises sensoriais devem ser realizadas durante a vida de prateleira esperada, enquanto houver qualidade microbiológica (EBURNE & PRENTICE, 1996).

A microbiologia preditiva está baseada na hipótese de que o efeito das propriedades dos alimentos pode ser previsto através de modelos matemáticos derivados de estudos quantitativos dos microrganismos. A necessidade de garantir a segurança microbiológica e a qualidade dos alimentos tem estimulado a aplicação da microbiologia preditiva (NAKASHIMA et al., 2000). Contudo, a aplicação de técnicas de modelagem matemáticas para descrever o crescimento e sobrevivência de microrganismos em alimentos não recebeu muita atenção até a década de 80 (ROSS & McMEEKIN, 1994). O modelo mais utilizado para descrever curvas de crescimento é o Modelo de Gompertz Modificado. Trata-se de uma função exponencial dupla, que descreve uma curva sigmóide assimétrica. Apesar de existir uma grande variedade de curvas sigmóides, o Modelo de Gompertz Modificado é o que fornece melhores ajustes aos dados relacionados com a microbiologia. Apesar do Modelo de Gompertz ser considerado o que fornece os melhores ajustes aos dados relacionados, o Modelo Logístico também tem sido utilizado em casos específicos limitados (DALGAARD et al., 1997; KOUTSOUMANIS & NYCHAS, 2000). A escolha do modelo adequado, sua aplicação, precisão e viabilidade estão vinculadas à qualidade dos dados coletados (BATY & MULLER, 2004).

A temperatura durante a estocagem e distribuição dos alimentos está constantemente sujeita a alterações. Um modelo efetivo que possa descrever o crescimento microbiano sobre condições variáveis durante o armazenamento, chamados modelos dinâmicos, é necessário para aplicação prática. Pesquisadores têm desenvolvido modelos dinâmicos, mas nem sempre estes modelos são adequados e satisfatórios às condições propostas (FUJIKAWA et al., 2004). O desenvolvimento de um modelo dinâmico pode ocorrer em duas etapas. Inicialmente, é proposto um modelo apenas para o crescimento microbiano e, em seguida, em uma segunda etapa são incluídas a inativação e uma possível transição entre crescimento e inativação (VAN IMPE et al., 1995). Também é possível, através de dados de crescimento isotérmico, obter modelos secundários empíricos com equações exponenciais, polinomiais, logarítmicas ou outra equivalente, que podem ser utilizadas para descrever padrões de crescimento em armazenamento não isotérmico (CORRADINI & PELEG, 2005).

Neste contexto, o **objetivo geral deste trabalho foi avaliar e propor alternativas para aumentar a vida de prateleira de produtos cárneos em armazenamento isotérmico e não isotérmico.**

Neste trabalho, foram estudados dois produtos cárneos industrializados a mortadela, armazenada à temperatura ambiente e a lingüiça defumada de suíno armazenada sob refrigeração.

Os objetivos específicos foram:

- 1- Realizar o levantamento microbiológico do processo de produção da mortadela e da lingüiça defumada de suíno, desde a matéria prima até o produto final;**
- 2-Acompanhar a vida de prateleira dos produtos estudados através das análises sensorial e microbiológica, em temperaturas de armazenamento indicadas pela indústria e em condições de abuso de temperatura, ou seja, em temperaturas mais elevadas do que a indicada;**
- 3-Avaliar a influência da concentração de cloreto de sódio, de lactato, de polifosfato (Pfosfato), de nitrito/nitrato e de alho envolvidos na formulação dos produtos estudados, no crescimento das bactérias ácido lácticas (*L. sakey* e *L. plantarum*);**
- 4-Obter os parâmetros de crescimento, velocidade específica máxima de crescimento (μ), tempo de duração da fase lag (λ) e aumento logarítmico da população (A), através do ajuste dos modelos de Gompertz Modificado, Logístico e Logístico Modificado;**
- 5-Propor alterações nas formulações dos produtos estudados, visando o aumento da vida de prateleira dos mesmos;**

6-Avaliar a vida de prateleira da mortadela e da lingüiça defumada de suíno com as alterações propostas nas formulações, em diferentes temperaturas de armazenamento isotérmico;

7-Avaliar a vida de prateleira da mortadela padrão e da nova formulação proposta em armazenamento não isotérmico;

8-Testar o Modelo Não Isotérmico proposto por Corradini & Peleg (2005) e Corradini et al.,(2006), para descrever o comportamento dos produtos cárneos industrializados durante a vida de prateleira.

Este trabalho está estruturado em capítulos, a introdução no capítulo 1, no capítulo 2 foi apresentada uma revisão bibliográfica dos assuntos referentes ao tema do trabalho proposto, no capítulo 3 estão descritos material e métodos utilizados no desenvolvimento do trabalho, no capítulo 4 estão apresentados os resultados obtidos e as discussões, no capítulo 5 estão as considerações finais, no capítulo 6 as referências bibliográficas.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Indústria da carne

Nos últimos dez anos, o universo da carne sofreu muitas mudanças, principalmente relacionadas ao modo de produção. Com as melhorias na nutrição, sanidade, genética e manejo do rebanho, um grande salto de produtividade foi observado, o que possibilitou um crescimento vertical e aumento da produção, sem um grande aumento na área destinada às pastagens. A economia moderna exigiu precocidade e maior giro de capital, por isso os pecuaristas, cedo ou tarde, acabaram se adaptando. Hoje, cada vez mais produtores passam a ter consciência de que não produzem apenas um animal, mas sim carne para alimentação humana. Não foi somente a pecuária que mudou, o mercado também. Em tempos de síndromes externas, as exigências são muito maiores do que tornar disponível apenas um produto saboroso no mercado (MARKETING, 2004).

Hoje a carne bovina sofre grande concorrência com outras fontes de proteínas, tanto animal como vegetal. Neste conjunto de opções de compra acaba dividindo espaço com as aves, suíno, entre outras (NEVES et al., 2001). O maior concorrente da carne bovina, a carne de frango, avançou no processo de integração e coordenação da cadeia agroindustrial e conseguiu colocar no mercado uma gama de produtos com preços extremamente competitivos. Um movimento semelhante pode ser observado na cadeia de carne suína que, embora não tenha avançado tanto quanto o setor de aves, encontra-se mais integrada e logrou elevar a produtividade e reduzir custos ao longo de todos os elos da cadeia. Criou-se, assim uma barreira à elevação do preço da carne bovina como forma de compensar sua ineficiência, colocando-se em pauta a necessidade de competir sistemicamente. Além do fator preço, vale destacar os esforços de diferenciação de produtos que os sistemas agroindustriais de frangos e suínos têm empreendido nos últimos anos. O resultado desses esforços pode ser medido pelo número de lançamento de novos produtos por esses dois setores. O objetivo primeiro desses lançamentos tem sido o de aproximar os produtos comercializados às necessidades dos consumidores atuais (alimentos congelados, pratos pré-preparados, etc.). Esse movimento é observado na cadeia agroindustrial da carne bovina no Brasil .

A exemplo da agricultura, a pecuária registra um crescimento espetacular. De 1990 a 2003, a produção de carne bovina aumentou 85,2%, ou 6,1% ao ano, passando de 4,1 milhões para 7,6 milhões de toneladas. Nesse período, a suinocultura cresceu 173,3%, ou 12,4% ao

ano. A produção de carne suína saltou de 1 milhão para 2,87 milhões de toneladas. O complexo carne, que inclui outros tipos do produto, também investe em pesquisa, por intermédio do melhoramento genético, e na certificação de origem do produto (MAPA, 2005).

A pecuária brasileira é hoje uma das mais modernas do mundo. O alto padrão da sanidade e qualidade dos produtos de origem animal, bovina, suína e de aves elevaram as exportações do complexo carne a US\$ 4,1 bilhões em 2003, com um aumento de 31% em comparação com o resultado de 2002. As exportações de carne bovina *in natura* e industrializada cresceram 40% em 2003, chegando a US\$ 1,5 bilhão. Em volume, totalizaram 1,4 milhão de toneladas e foram embarcadas principalmente para Chile, Países Baixos, Egito, Reino Unido, Itália, Arábia Saudita e Alemanha, entre outros. Esse desempenho colocou o país em primeiro lugar no *ranking* mundial das vendas do setor, superando a Austrália, até então o líder do comércio internacional do produto. Em 2003, o país assumiu ainda a liderança do *ranking* dos maiores exportadores do setor avícola, com crescimento de 20% em relação a 2002. As exportações brasileiras de frango *in natura* e industrializado somaram US\$ 1,8 bilhão, representando cerca de 2 milhões de toneladas. A maior parte dos embarques foram, para a Arábia Saudita, Japão, Países Baixos, Alemanha, Rússia e Hong Kong. O Brasil também registrou crescimento nas vendas externas de carne suína, que aumentaram 12%, chegando a US\$ 526 milhões - ou cerca de 550 mil toneladas. Rússia, Hong Kong, Argentina, Cingapura e Uruguai foram os principais importadores da carne suína brasileira (MAPA, 2004).

As exportações brasileiras de carne bovina vêm mantendo a tendência de crescimento observado dos anos anteriores, embora em ritmo mais lento. Em janeiro de 2005, as vendas externas cresceram 31% em relação a janeiro de 2004, somando US\$ 186,1 milhões. Em 2004, as exportações totais de carne bovina cresceram 63%, somando US\$ 2,457 bilhões, com volume embarcado de 1,854 milhão de toneladas em equivalente carcaça, o que representa um aumento de 42,5% em relação a 2003. O Brasil manteve a liderança do mercado mundial como principal exportador de carne bovina em 2005, com desempenho superior ao registrado em 2004 (MUSTEFAGA, 2005).

O consumo de carne de aves tem aumentado notoriamente em todo o mundo, em virtude de fatores como a imagem saudável do produto associada pelo seu baixo teor de gordura e alto teor de proteína, disponibilidade crescente de produtos processados à base de carne e seu baixo preço. Este aumento no consumo de carne de frangos e seus derivados, durante a década passada, tem sido acompanhado pelo drástico aumento da capacidade e eficiência de processamento desse produto (NETO, 1997).

Levando-se em conta dados publicados pela FAO, percebe-se que até meados dos anos 80 as carnes de suínos e bovinos (com ligeira vantagem para a carne bovina), eram as principais fontes de suprimento de proteína animal para o consumo humano. A partir de então, a carne bovina começou a perder terreno para a carne de frango. Nos anos 90, a produção mundial de carne de frango chegava à casa dos 20% praticamente igualando-se ao volume produzido de carne bovina. Naquela década, a situação entre carne bovina e carne de frango ficou bastante estável, todavia ainda com ligeira vantagem para a carne bovina. A produção de carne suína apresentou estabilidade no período de 1961 a 2000, situando-se ao redor de 33% do volume das carnes produzidas no mundo. A carne bovina que vinha em queda livre até 1995, estabilizou-se a partir de então e voltou a apresentar, juntamente com a carne suína, forte crescimento a partir de 2.000. No Brasil, a maior parte (cerca de 70%) da carne suína é consumida na forma de produtos industrializados que, em geral, não estão presentes nas principais refeições do povo brasileiro. Os produtos embutidos normalmente apresentam preços elevados para o trabalhador brasileiro, isto de certa forma inibe o consumo. A pouca oferta de carne “*in natura*” no mercado brasileiro ocorre em parte por desinteresse das agroindústrias, que obtêm maior retorno do capital empregado com a venda de produtos com algum grau de industrialização (GIROTTI, 2005).

2.2 Processamento Tecnológico da Carne

Agregar valor, esta é a expressão de ordem para a agroindústria da carne. Em um mercado cada vez mais competitivo e com o aumento da exigência dos consumidores por qualidade, o melhoramento contínuo dos produtos torna-se imperativo para a sobrevivência das empresas no setor. A produção de embutidos apresenta-se como uma das soluções para atender à demanda por qualidade. Para que os produtos embutidos mantenham suas propriedades funcionais e permaneçam seguros ao consumidor, o acondicionamento dos mesmos deve ser feito pelo emprego de envoltórios. Tal procedimento de conservação é mantido por meio de gerações e apresenta-se, neste início de século 21, ainda como um desafio na melhoria contínua dos produtos processados. Assim sendo, a compreensão dos aspectos tecnológicos dos diversos tipos de envoltórios disponíveis na atualidade e de como manipular estes recursos poderá contribuir para que novas soluções sejam geradas no âmbito das indústrias. Todo produto feito com carnes picadas ou moídas, acondicionadas em invólucro é chamado de embutido. Esse tipo de produto apareceu no Brasil graças às receitas tradicionais trazidas por famílias imigrantes alemãs e italianas, embora tenha sofrido

adaptações às condições climáticas e ao paladar local. Com a modernização e diversificação da produção nos frigoríficos, houve um aumento no volume de carne embutida, transformando-se em importante fonte de proteína animal (ODA et al., 2003).

Entendem-se como produtos cárneos processados ou preparados, aqueles em que as propriedades originais da carne fresca foram modificadas através de tratamento físico, químico ou biológico, ou ainda, através da combinação destes métodos. Tais processos visam o prolongamento da vida útil dos produtos, procurando manter as propriedades nutritivas e organolépticas (PARDI et al., 1996). Além disso, visam desenvolver diferentes sabores através de condimentação específica e utilização de diferentes partes do animal de difícil comercialização no estado fresco (TERRA, 2003). O setor de produtos cárneos cresceu muito nos últimos anos com o desenvolvimento de novos produtos, mas os produtos clássicos continuaram sempre no mercado, como: mortadela, lingüiça, salsicha, presunto, apresuntado, salame, hambúrguer, charque, entre outros. O que mudou na verdade foi a variedade de matérias primas envolvidas, além de novos ingredientes, novos processos, com o objetivo de melhorar a qualidade dos produtos neste setor. As áreas de pesquisa e desenvolvimento dos frigoríficos estão atentas às tendências em aditivos, conservantes, corantes e outros componentes químicos ou naturais, além de outras tendências como: a utilização de ingredientes para melhorar o sabor e a apresentação, de forma a lembrar produtos caseiros ou regionais; uso de ingredientes funcionais como fibras, ômega-3, fitosteróis, isoflavonas e produtos enriquecidos ou reconstituídos com minerais e vitaminas. Além do sabor e aparência atrativos, a preocupação dos fabricantes com a qualidade e sanidade dos produtos passa a ocupar lugar de destaque na decisão de compra de componentes químicos. A redução ou controle de bactérias indesejáveis está relacionado às Boas Práticas de Fabricação (BPF), o uso de processos térmicos adequados, como cozimento e pasteurização, além do uso de misturas de ácidos orgânicos e lactatos, como agente bacteriostático, que podem contribuir para reduzir a taxa de crescimento das bactérias e auxiliar na garantia e segurança dos produtos industrializados

A carne mecanicamente separada (CMS) de frango é amplamente utilizada como matéria-prima na produção de embutidos submetidos ao cozimento e a composição do CMS pode variar conforme o tipo de matéria-prima utilizada na fabricação (TERRA, 2003). Entende-se por carne mecanicamente separada (CMS) de frango, a carne residual produzida através de equipamentos próprios do tipo desossadores mecânicos, utilizando como matérias-primas partes de frango, principalmente as de baixo valor comercial, como o dorso e pescoço, resultando em uma matéria-prima de baixo custo. A separação mecânica basicamente envolve

trituração da carne e ossos, forçando a carne a passar por peneiras, separando-se assim dos ossos. Este processo altera a composição da matéria-prima original, resultando em material com maiores teores de gordura e minerais. Isso se deve em grande parte à incorporação de lipídeos e pigmentos *heme* existente na medula óssea e na camada de gordura subcutânea, e cálcio e fósforo proveniente das partículas ósseas (AMARAL-MELLO, 1998; FRONING, 1996). Devido às suas características, textura pastosa, fina e uniforme, seu uso é limitado nos produtos que requerem granulometria maior ou com textura mais fibrosa como a da carne manualmente separada, utilizada nos hambúrgueres, apresetados, lingüiças, a menos que sejam utilizados juntamente com grandes quantidades da carne manualmente separada (BERAQUET,1988). Apesar de alguns estudos serem conduzidos para avaliar o uso de diferentes proporções de CMS em vários tipos de produtos cárneos, a legislação brasileira, permite a utilização dessa matéria-prima apenas em produtos cárneos industrializados cozidos específicos como: salsicha, mortadela, lingüiça, almôndega, fiambre e hambúrguer, nos seus respectivos limites máximos, conforme legislação (BRASIL, 2000). Na Tabela 2.1 estão apresentadas quantidades permitidas de CMS em alguns produtos cárneos.

Tabela 2.1 Produtos cárneos e as quantidades permitidas de carne mecanicamente separada (CMS) na sua produção.

Produtos	Quantidade máxima CMS (%)
Mortadela	60
Lingüiça	20
Salsicha	60
Almôndega	30
Hambúrguer	30

Fonte: BRASIL, 2000

Entre os vários produtos cárneos industrializados existentes no mercado, a mortadela e a lingüiça são produtos muito apreciados pelo consumidor, e podem apresentar-se de diversas formas, conforme tecnologia de fabricação e matérias-primas utilizadas.

Entende-se por mortadela, o produto cárneo industrializado obtido de uma emulsão das carnes de uma ou mais espécies de animais de açougue, adicionado ou não de toucinho, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial de diferentes formas, submetido ao tratamento térmico adequado, defumado ou não. De acordo com a composição da matéria-prima e das técnicas de fabricação, estes podem ser classificados como: Mortadela - carnes de

diferentes espécies de animais de açougue, carnes mecanicamente separadas (CMS) até o limite máximo de 60%, miúdos comestíveis de diferentes espécies de animais de açougue (estômago, coração, língua, rins, miolo, medula, tendões e pele) e gorduras; Mortadela tipo Bologna - carnes Bovina e/ou suína e/ou ovina e carnes mecanicamente separadas (CMS) até o limite máximo de 20%, miúdos comestíveis de bovino e/ou suíno e/ou ovino (estômago, coração, língua, rins, miolo, medula, tendões e pele) e gorduras; Mortadela italiana – Porções musculares de carnes de diferentes espécies de animais de açougue e toucinho; Mortadela bologna – Porções musculares de carne bovina e/ou suína e toucinho, embutida na forma arredondada; Mortadela de carne de ave - Carne de ave, carne mecanicamente separada (CMS), no máximo de 40% e gordura (BRASIL, 2000). Em relação aos aditivos químicos, devem ser respeitados os limites estabelecidos na portaria 1004/98, nada além de conservantes como o nitrato e nitrito de sódio que atuam sobre os pigmentos naturais da carne (mioglobina), desenvolvendo a coloração rosada, além de agirem como conservantes ao inibir o crescimento de *Clostridium botulinum*; polifosfatos de sódio, que estabilizam o pH da massa e agem sobre a retenção de água nas proteínas, reduzindo as perdas de umidade; antioxidantes como o eritorbato de sódio, que acelera o processo de cura e evita a oxidação dos pigmentos naturais da carne; lactato de sódio, usado como regulador de acidez/umectante para inibição do crescimento de microrganismos em decorrência da diminuição da atividade de água. Na Figura 2.1 está apresentado o fluxograma de produção da mortadela.

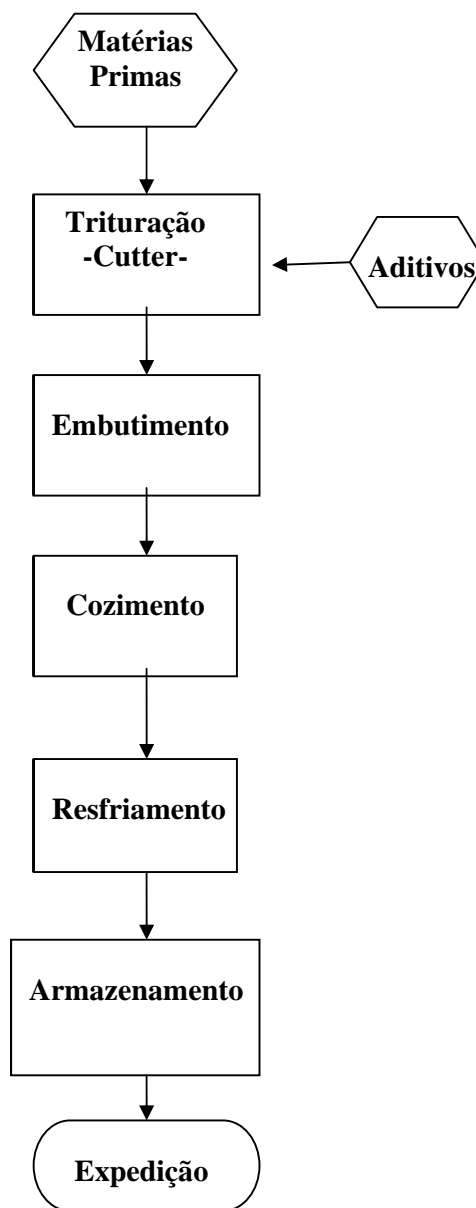


Figura 2.1 Fluxograma de produção de mortadela.

Entende-se por lingüiça, o produto cárneo industrializado elaborado a partir de carnes de uma ou mais espécies de animais de açougue, obtida na forma crua ou cozida, dessecada ou não, defumada ou não, curada ou não, adicionado ou não de gorduras, toucinho, adicionado de ingredientes e embutidos em tripas naturais ou artificiais. Conforme tecnologia de fabricação (produto seco, curado, cozido, maturado) e composição das matérias-primas

podem ser classificadas em: Lingüiça Calabresa - é o produto curado obtido exclusivamente de carne suína, adicionado de ingredientes, devendo ter o sabor picante característico da pimenta calabresa submetidas ou não ao processo de estufagem ou similar para desidratação e/ou cozimento, sendo o processo de defumação opcional; Lingüiça Portuguesa - é o produto curado obtido exclusivamente de carnes suína adicionado de ingredientes, submetido à ação do calor com defumação (sabor acentuado de alho); Lingüiça Toscana - é o produto cru e produto curado obtido exclusivamente de carnes suína, adicionada de gordura suína e ingredientes; Paio - é o produto obtido de carnes suína e bovina (máximo de 20%) embutido em tripas natural ou artificial comestível, curado e adicionado de ingredientes, submetida a ação do calor com defumação. Nas lingüiças Tipo Calabresa, Tipo Portuguesa e Paio, que são submetidas ao processo de cozimento, será permitido a utilização de até 20% de CMS – Carne Mecanicamente Separada, desde que seja declarado no rótulo de forma clara ao consumidor a expressão "**carne mecanicamente separada de**"(espécie animal), além da obrigatoriedade de constar na relação de ingredientes a expressão "**contém...**" ou "**com CMS** (espécie animal)". O produto será designado para venda como lingüiça, seguido de denominação ou expressões que o caracterizem, de acordo com a sua apresentação tais como: Lingüiça de carne bovina, Lingüiça de carne suína, Lingüiça de lombo suíno, Lingüiça de lombo e pernil suíno, Lingüiça de carne suína defumada, Lingüiça calabresa, Lingüiça portuguesa, Lingüiça toscana, Lingüiça de carne de peru, Lingüiça de carne de frango, Lingüiça mista, Lingüiça tipo calabresa, Lingüiça tipo portuguesa, Paio (BRASIL, 2000). Na Figura 2.2, está apresentado o fluxograma de produção da lingüiça defumada.

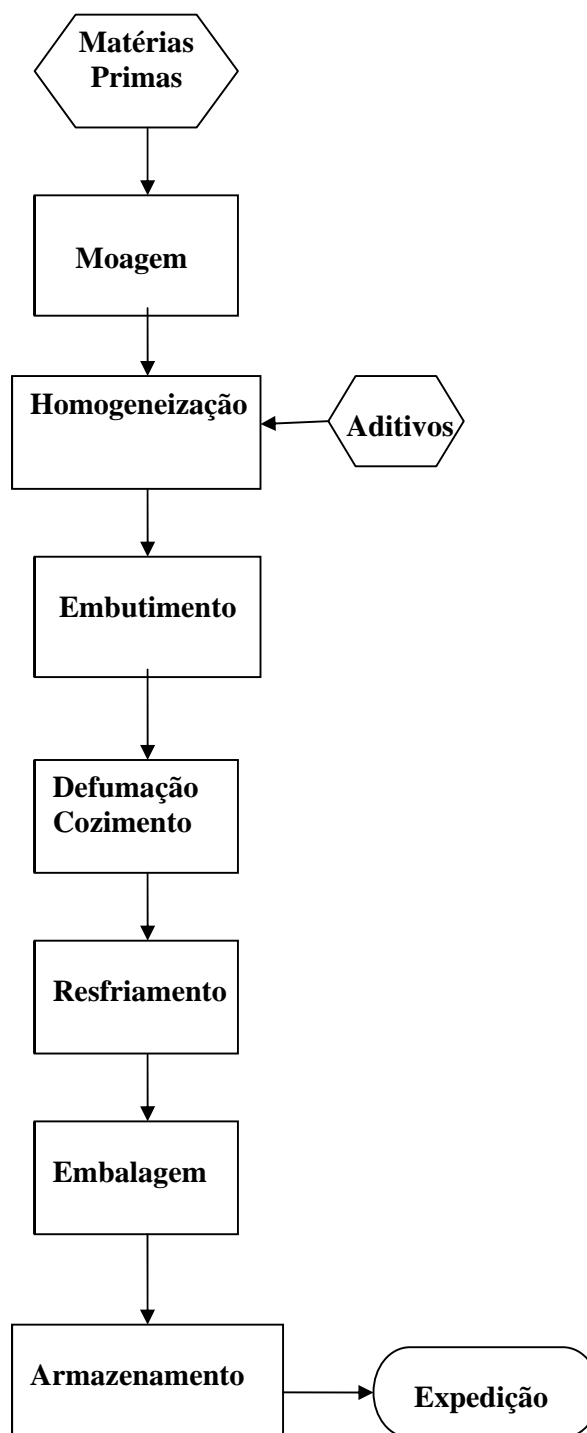


Figura 2.2 Fluxograma de produção de lingüiça defumada

A carne apresenta alta atividade de água, é um alimento rico em substâncias nitrogenadas, minerais, sendo o seu pH favorável para a maioria dos microrganismos. Os tipos mais comuns de deterioração em carnes podem ser classificados de acordo com a atmosfera que envolve os produtos e são provocados por bactérias, bolores ou leveduras. Em condições de aerobiose os microrganismos podem ocasionar: limosidade superficial, alteração da cor, rancificação e odores e sabores estranhos. Em condições de anaerobiose, causadas por bactérias aeróbias facultativas e anaeróbias que crescem no interior da carne podem causar as seguintes alterações: acidificação, putrefação, além de odores e sabores estranhos (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

2.3 Métodos de conservação de alimentos

Uma das principais preocupações dos microbiologistas de alimentos está relacionada ao controle do desenvolvimento microbiano, visando eliminar riscos à saúde do consumidor, prevenindo ou retardando o aparecimento de alterações indesejáveis nos alimentos. Excluindo os microrganismos obtidos através dos processos de fermentação, o ideal seria que microrganismos não tivessem acesso aos alimentos, mas sendo este fato praticamente impossível, existem medidas que podem ser adotadas para o controle do seu desenvolvimento, como:

- Métodos mecânicos para remoção de microrganismos (filtração);
- Atmosfera modificada;
- Temperaturas elevadas;
- Temperaturas baixas;
- Desidratação;
- Conservadores químicos;
- Irradiação de alimentos;
- Altas pressões.

A conservação de alimentos pelo emprego de agentes químicos é muito utilizada para prevenir ou retardar a deterioração por microrganismos. O número de compostos químicos utilizados como conservadores é relativamente pequeno, e suas quantidades adicionadas nos alimentos são regulamentadas através de uma legislação específica. Os seus limites máximos de uso e a atribuição de suas funções na categoria de Carne e Produtos Cárneos estão apresentados na Portarias nº 1.001, 1.002, 1.003 e 1.004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A eficiência de qualquer conservador químico no alimento depende de

fatores como: concentração utilizada, temperatura e tempo de armazenamento, além das características intrínsecas dos alimentos (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Os conservadores permitidos pela legislação brasileira podem ser agrupados da seguinte forma:

1- Ácidos lipofílicos e derivados

- ácido benzóico e benzoatos de sódio, potássio e cálcio;
- ácido sórbico e sorbatos de sódio, potássio e cálcio;
- ácido propiônico e seus sais de sódio potássio e cálcio;
- ésteres do ácido p-hidróxido benzeno (“parabéns”).

2- Nitritos e Nitratos

3- Dióxido de enxofre e derivados

4- Natamicina

Além destes, outros compostos adicionados aos alimentos atuam como conservadores: sal, açúcar, sais, ácidos orgânicos e condimentos.

É secular o emprego de sais de nitrito e nitrato de sódio ou potássio em produtos embutidos de carne, exceto charque e alimentos infantis. Segundo alguns pesquisadores (ARAÚJO & MÍDIO 1989; FERREIRA & CAMARGO, 1993; PÉREZ-RODRIGUEZ et al., 1996), a utilização desses sais tem por finalidade conferir cor e sabor aos produtos, além de funcionar como agente antimicrobiano e antioxidante (CASSENS, 1997). Silva (1999) relata que o nitrito de sódio tem a capacidade de inibir o crescimento e a produção de toxina das várias espécies de *Clostridium botulinum*, pela inibição do crescimento da célula vegetativa, durante o armazenamento, e prevenção da germinação dos esporos que sobreviveram ao processamento térmico. Para que isso ocorra, a quantidade de nitrito adicionada é maior do que a necessária para o desenvolvimento da cor e sabor, levando em conta o limite permitido e o aspecto toxidez. Apesar de o *Clostridium botulinum* ser a maior preocupação, o nitrito também é eficiente contra *Staphylococcus aureus*, sendo que esta eficiência aumenta com a diminuição do pH. Entretanto, é ineficaz contra *Enterobacteriaceae*, inclusive *Salmonella* ssp, e contra bactérias ácido lácticas. As bactérias ácido lácticas são resistentes devido à falta de ferredoxina (FRANCO & LANDGRAF, 1996). A aplicação desses sais acima do limite máximo (nitrato 300 ppm; nitrito 150 ppm) estabelecido pela legislação vigente, pode acarretar sérios riscos à saúde humana, pela possibilidade de manifestações de efeitos tóxicos agudos e crônicos (McKNIGHT et al., 1999). Os nitritos são os mais utilizados, pois reagem mais rapidamente para a formação do óxido nítrico. Quanto ao nitrato, é reduzido a nitrito por enzimas produzidas por microrganismos (*Micrococcus*) cuja proliferação é favorecida por

manuseio e processamento inadequado dos alimentos. A reação do íon nitrito com aminas e amidas presentes no meio, pode dar origem as nitrosaminas e nitrosamidas, substâncias consideradas carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas (EICHHOLZER & GUTZWILLER, 1998). As condições ácidas do estômago também promovem a redução do nitrato a nitrito, favorecendo igualmente a meta hemoglobinemia (McKNIGHT et al., 1999).

O pigmento responsável pela cor da carne é a mioglobina. Quando o músculo é exposto ao ar, ocorre a oxigenação do pigmento, formando a oximioglobina, sendo esta exposição prolongada, ou seja, durante a vida de prateleira dos produtos, ocorre oxidação gerando o pigmento metamioglobina. O óxido nítrico combina-se com a mioglobina gerando a nitrosomioglobina, que durante o processo de cocção se transforma em nitrosohemoglobina. Desta forma produtos cozidos não sofrem alterações de cor final, enquanto que produtos apenas curados ou frescos devem possuir reservas de nitrito/nitrato, para que o processo de formação de óxido nítrico seja contínuo durante a vida de prateleira dos produtos.

Com o objetivo de avaliar a qualidade de salsichas comercializadas em Recife-PE, os níveis de nitrito residual e nitrato foram quantificados em 54 amostras, coletadas segundo região de origem e marca, assim codificadas: coletadas em supermercado (A); indústrias locais (B) e sem marcas em feiras livres (C). Aplicaram-se testes ANOVA e Tukey para avaliação dos níveis de nitrito e nitrato. Constatou-se que no grupo (C) 67% das amostras apresentavam-se com nitrito residuais maiores que 150mg/kg (acima do máximo permitido), e os níveis de nitrato maior que 300mg/kg (acima do máximo permitido) em 17% das amostras do grupo (A), 67% das amostras do grupo (B) e 83% das amostras do grupo (C). Os resultados mostraram que estes níveis de nitrato e nitrito em salsichas, representam um risco potencial à saúde do consumidor, devido ao não cumprimento da legislação na produção e comercialização desse produto (BISCONTINI et al., 2004).

No Brasil, os limites do uso de aditivos são regulamentados pela Portaria nº 1004 de 11 de dezembro de 1998 do Ministério da Saúde, sendo estabelecido para produtos cárneos, exceto para charque, limites de 150ppm e 300ppm para o nitrito e nitrato, respectivamente (BRASIL, 1999).

Deumier & Collignan (2003) avaliaram os efeitos de duas culturas *starters* comerciais, em diferentes concentrações de lactato de sódio e suas interações sobre a acidificação de salsichas de frango. O objetivo principal foi determinar as melhores condições para dificultar o desenvolvimento de *L. monocytogenes*. O resultado deste estudo mostrou que o uso de cultura *starter* acidificante aumenta o processo de fermentação em salsichas, na presença de

altas concentrações de lactato, enquanto reduz a contaminação por *L. monocytogenes*. Assim, o lactato de sódio permitiu o controle de crescimento da cultura *starter*, diminuindo o valor do pH.

É notório que alimentos industrializados ou não, podem conter uma ampla variedade e quantidade de microrganismos, que podem interferir em sua vida útil, ou causar doenças. Existem inúmeros recursos para eliminar esses microrganismos ou controlar o seu desenvolvimento nos alimentos. No entanto, a cada dia aumenta a procura por alimentos naturais, que não tenham sido submetidos a nenhum tipo de processamento industrial ou que sejam minimamente processados, e que não contenham produtos químicos. Muitos consumidores consideram que esses procedimentos interferem na qualidade nutricional dos alimentos, além de acreditar que os conservadores químicos são perigosos para a saúde, até mais perigosos que os próprios microrganismos que esses produtos possam controlar (MURIANA, 1996).

Com isso, aumenta também a preocupação dos fabricantes de alimentos em produzir alimentos que não necessitem desses procedimentos para que sejam saudáveis e para que atendam os parâmetros de qualidade e segurança exigidos pelos consumidores e fabricantes. Uma dessas estratégias é explorar a capacidade dos microrganismos inócuos, naturalmente presentes nos alimentos ou artificialmente adicionados, em inibir microrganismos que sejam indesejáveis, quer sejam deteriorante, quer sejam patogênico. Esse processo denomina-se **bioconservação**, e vem sendo cada vez mais estudado devido ao seu enorme potencial de aplicação nos mais variados tipos de alimentos. Os microrganismos mais adequados para uso como bioconservadores são as bactérias lácticas, devido às suas características antagonistas e sua grande tradição de uso como bactérias “grau-alimento” em alimentos fermentados (SCHILLINGER et al., 1996, DE MARTINIS et al., 2002).

Nos últimos anos, a demanda dos consumidores por alimentos seguros à saúde tem aumentado consideravelmente, desencadeando a busca por novos ingredientes e aditivos que tenham ação antimicrobiana e que possam reduzir a contaminação garantindo a segurança dos produtos cárneos. Neste sentido, novos processos e substâncias foram desenvolvidos como os acidulantes encapsulados e a lactoferrina ativada (HIGENBART, 2003). A encapsulação é um processo no qual as partículas formadoras do ingrediente e/ou aditivo ativo permanecem dentro de uma cobertura ou microcápsula, sendo cobertas por um filme ininterrupto. A encapsulação é particularmente importante porque permite o controle da liberação das partículas dos acidulantes, uma vez que a sua cobertura pode dissolver ou fundir em temperaturas específicas. Esta propriedade evita os efeitos indesejáveis, como reações com

outros ingredientes dos alimentos, perda do aroma, degradação da cor, normalmente observados quando da adição de ingredientes ou aditivos não-encapsulados (HIGENBART, 2003). A lactoferrina pode ser vaporizada na carcaça para ajudar a prevenir a contaminação bacteriana durante o processamento, ou ainda pode ser aplicada à superfície dos subprodutos ou produtos finais de carne bovina antes do processo de embalagem para inibir o desenvolvimento de bactérias e estender a vida útil dos produtos (NAIDU, 2002).

O desenvolvimento de novos produtos e a conotação de alimentos seguros à saúde do consumidor num mercado mundialmente mais exigente e competitivo provocou um crescimento nas indústrias de ingredientes e aditivos, que têm colocado à disposição um número crescente de variedades destes produtos na última década. As novas formulações e os processos para obtenção de alimentos seguros tornam-se possíveis por intermédio do advento de novos ingredientes e aditivos. Agregar cada vez mais valor aos produtos é um desafio constante para a indústria. A prevenção de toxinfecções pelo emprego da lactoferrina é apenas um exemplo de quanto ainda se pode inovar na utilização de aditivos. Da parceria entre empresas, universidades e órgãos de fomento à pesquisa podem surgir novas idéias e recursos humanos treinados para este importante desafio da agroindústria da carne, que é agregar valor à carne pelo emprego de aditivos, além da utilização e desenvolvimento de novos métodos de conservação (SOARES et al., 2003).

Embora os aditivos sintéticos sejam usados extensamente na indústria da carne para inibir o processo da oxidação de lipídios e do crescimento microbiano, esta tendência tem diminuído devido ao grande interesse dos consumidores por produtos naturais. Assim, a busca por aditivos naturais, cresceu rapidamente. Os compostos obtidos das fontes naturais tais como grãos, óleos essenciais, condimentos, frutas e vegetais vêm sendo estudados e submetidos à avaliação quanto ao seu potencial antioxidante e antimicrobiano (CHEN et al., 1996). Conseqüentemente, o desenvolvimento e a aplicação de produtos naturais com atividades antioxidante e antimicrobiana em produtos cárneos podem ser úteis para prolongar sua vida útil e impedir transformações indesejáveis nos alimentos. Os extratos do alho, alho em pó, em pasta e óleo de alho são exemplos desta aplicação, e demonstraram ter atividade antioxidante em diferentes modelos *in vitro*. A atividade antioxidante do alho foi atribuída principalmente a uma variedade de compostos sulfurados e seus derivados presentes na planta (KIM, et al., 1997; NUUTILA, et al., 2003). Estes compostos também apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* (HARRIS et al., 2001).

O alho é um ingrediente bastante usado para dar sabor a produtos cárneos. Além de saborizante em alimentos, o alho é apreciado para suas propriedades medicinais. Apresenta

inúmeras funções; não somente antibacteriana, antiviral, mas também efeitos benéficos ao sistema cardiovascular. Durante a última década, a atividade antimicrobiana do alho e de seus compostos derivados organo-sulfurados foram investigadas extensivamente em relação às bactérias deteriorantes e patogênicas dos alimentos (LEUSCHNER & IELSCH, 2003). A maioria dos estudos com o alho focalizaram a atenção para os efeitos antioxidantes e antimicrobiano em produtos cárneos.

Muitos estudos têm indicado que a oxidação de lipídios em produtos cárneos pode ser controlada ou minimizada pelo uso de antioxidantes sintéticos comerciais ou compostos mais exóticos isolados de produtos naturais (GRAY et al., 1996). O uso de antioxidantes sintéticos tem sido freqüente devido ao seu baixo custo, alta estabilidade e eficácia. Porém, nas duas últimas décadas, tanto consumidores quanto a legislação têm demonstrado preocupação em relação ao uso de antioxidantes sintéticos, mesmo comprovando-se cientificamente sua segurança, em contrapartida os antioxidantes naturais são considerados mais seguros (POKORNÝ, 1991; WONG et al., 1995). A utilização de antioxidantes naturais apresenta vantagens de aceitação imediata pelo consumidor e a sua utilização não é limitada pela legislação. O alecrim é um exemplo de antioxidante natural, que faz parte da formulação de condimentos (MERLO, 1998). A desvantagem é o alto custo destes produtos quando da sua purificação e padronização, que no caso de compostos não purificados, estes podem afetar cor, inferir sabor residual e causar *off-flavors*. Muitas alternativas estão disponíveis e as suas propriedades têm sido avaliadas e reconhecidas ao longo do tempo, como o orégano, noz moscada, páprica, alecrim, sálvia e muitos outros (POKORNÝ, 1991).

Os óleos essenciais e os componentes da fumaça líquida podem ser considerados boas fontes de um potente agente antimicrobiano para alimentos, mas pesquisas adicionais são necessárias para a otimização da estabilidade em produtos alimentícios e um melhor entendimento do mecanismo de ação antimicrobiano (HOLLEY & PATEL 2005).

Segundo Sadler (2004) existem inúmeras oportunidades para o desenvolvimento e utilização de aditivos e ingredientes para a melhoria da qualidade de carnes e derivados. Com o contínuo desenvolvimento tecnológico, este setor proporciona a oportunidade de descoberta de novos ingredientes, que poderão ser utilizados na elaboração de novos produtos derivados de carnes.

Nerbrink et al. (1999) descreveram um modelo matemático para prever o crescimento da *L. monocytogenes* em diferentes níveis de pH, e diferentes concentrações de cloreto de sódio, lactato de sódio e acetato de sódio, em meio suplementado com nitrito de sódio. Os dados do crescimento foram obtidos através de medidas de absorbância em caldo

nutriente. Com os dados obtidos, ou seja, as medidas de absorvência demonstraram viabilidade para o desenvolvimento do modelo proposto e esses dados estão de acordo com Begot et al. (1996), Dalgaard et al. (1997) e Neumeyer et al. (1997). Os fatores (pH, NaCl, Na-acetato, Na-lactato) influenciaram significativamente no crescimento da *L. monocytogenes* e todas as interações foram estatisticamente significativas.

2.4 Vida de Prateleira de Produtos Cárneos

Garantir a vida útil dos alimentos e a sua segurança microbiológica, implica em minimizar níveis de contaminação, limitando ou impedindo a taxa de crescimento microbiano. Muitas estratégias são adotadas pelas indústrias processadoras de alimentos, e estas têm contribuído para tal finalidade com a implantação de programas de qualidade, novas tecnologias, novas embalagens, além de inúmeros métodos de conservação. Em toda cadeia de produção a temperatura é um fator extremamente importante para assegurar a vida útil dos alimentos (McMEEKIN et al, 1997).

Nos alimentos, a multiplicação ou sobrevivência de microrganismos patógenos ou deteriorantes é determinada por fatores intrínsecos (pH, sal, conservadores, fatores antimicrobianos naturais) e extrínsecos (período de armazenamento, atmosfera da embalagem) que podem atuar como barreiras para multiplicação de microrganismos. O conhecimento e a utilização combinada desses fatores em um alimento formam os fundamentos da teoria dos obstáculos (*hurdle technology*), que permitem controlar a vida de prateleira, a estabilidade microbiológica, bem como, impedir a multiplicação e/ou a produção de toxinas por microrganismos patogênicos eventualmente presentes (DE MARTINIS et al., 2002).

Na determinação da vida de prateleira de produtos cárneos, é comum o estudo de parâmetros microbiológicos (contagem total, contagem de *Lactobacillus*, enterobactérias, bolores e leveduras), químicos (acidez, índice de oxidação, perda de água) e sensoriais (aroma, sabor, textura e aparência). Análises microbiológicas e sensoriais devem ser realizadas durante a vida de prateleira esperada e após este período, a análise sensorial pode ser realizada somente se o produto avaliado apresentar qualidade microbiológica (EBURNE & PRENTICE, 1996).

Produtos cárneos fermentados tradicionalmente têm apresentado vida de prateleira consideravelmente longa através da combinação do baixo teor de umidade e pH, sendo estáveis à temperatura ambiente. Devido ao alto teor de gordura e baixa atividade de água

destes produtos, a principal reação de deterioração é a rancidez, conduzindo ao desenvolvimento de sabor e aroma de ranço, perda ou alteração de pigmentos, além da perda de vitaminas (LABUZA, 1982; PEARSON & TAUBER, 1984; SINGH, 1996).

Durante o processamento, distribuição e estocagem, os alimentos sofrem degradação química e microbiológica. A rancidez em carnes e derivados, é conseqüência das reações de degradação de lipídios, como resultado de processos como cozimento, corte, desossa, moagem e congelamento (WONG et al., 1995). A susceptibilidade de produtos cárneos à oxidação tem desafiado processadores, distribuidores e pesquisadores em relação ao prolongamento da vida de prateleira destes produtos. A utilização de embalagens a vácuo ou com atmosfera modificada tem sido efetivas para retardar o desenvolvimento de processos oxidativos (GRAY et al., 1996).

A manutenção da qualidade de carnes e produtos derivados pode ser obtida por longos períodos em embalagens capazes de retardar a deterioração microbiológica, manter uma coloração desejável, retardar a perda de umidade e a oxidação de gorduras, permitindo uma ampliação do alcance do sistema de distribuição destes produtos perecíveis.

A embalagem influencia na qualidade e durabilidade de carnes frescas e derivados, 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. Desse modo, a embalagem torna-se uma das principais responsáveis para a manutenção da qualidade de carnes e derivados por longos períodos, além da qualidade inicial do produto e a temperatura de estocagem e de comercialização (SARANTÓPOULOS & OLIVEIRA, 1994).

Comercialmente, no Brasil, a aplicação mais comum de embalagem para carnes frescas é de filmes plásticos de altíssima permeabilidade ao oxigênio, que podem manter a coloração vermelha, ao mesmo tempo, que protegem o produto. Entretanto, existe uma tendência de crescimento no mercado de carnes e derivados embalados a vácuo. No caso da carne fresca, a embalagem a vácuo é mais utilizada no mercado institucional, para distribuição de peças de carne bovina. No varejo, a embalagem a vácuo é a mais usada para carnes processadas, para cortes de carne fresca para churrasco, mas a coloração escura da carne fresca embalada a vácuo, provocada pela ausência de oxigênio, restringe a aceitação do produto pelo consumidor. Quando os produtos cárneos são embalados a vácuo, uma barreira a gás, altera-se radicalmente a atmosfera gasosa ao redor da superfície do produto. A pequena quantidade de oxigênio remanescente no interior da embalagem é consumida pela atividade metabólica da carne e das bactérias. Cria-se, assim, um microsistema anaeróbio/microaeróbio

dentro da embalagem que, auxiliado pelo efeito inibitório do CO₂ liberado na respiração de microrganismos, retarda o crescimento de bactérias deteriorantes, como as *Pseudomonas*, permitindo a predominância de bactérias do ácido lácticas, que têm menor potencial de deterioração e crescimento limitado a baixas temperaturas. O resultado é uma vida-de-prateleira mais longa do que a dos produtos expostos ao ar, principalmente se a estocagem for realizada na faixa de -1°C a 3°C (SARANTÓPOULOS & OLIVEIRA, 1994).

O acondicionamento em embalagens com atmosfera modificada (EAM) é um processo tecnológico de preservação de alimentos, cuja aplicação, nas duas últimas décadas, cresceu consideravelmente. Atualmente, a EAM é um meio comum para exposição e venda de produtos alimentícios em supermercados (LUNO et al., 1998) e vem sendo aplicada em diferentes produtos cárneos em diversos países.

Mano et al. (2002), quando da avaliação do efeito da embalagem da carne suína em atmosfera modificada e do crescimento dos microrganismos responsáveis pela sua alteração, concluiu que o aumento da porcentagem de CO₂ na atmosfera prolongava a fase de latência, reduzindo a velocidade de crescimento microbiano. Observou também que as atmosferas enriquecidas com CO₂ foram mais eficazes que a de nitrogênio, e que, as fases de latência foram mais curtas e as velocidades de crescimento mais rápidas a 7°C do que a 1°C. Finalmente, concluiu que, tanto a 1°C como a 7°C, a utilização das atmosferas modificadas retardou o crescimento das bactérias adulterantes da carne de suíno, favorecendo assim, o aumento da vida de prateleira.

Nas últimas décadas tem aumentado o interesse por modelos matemáticos e por simulações dos diferentes fenômenos que ocorrem durante o processamento térmico dos alimentos. Os modelos e as técnicas da simulação estão sendo desenvolvidos para transferência de calor, crescimento e inativação microbiana e mudanças na textura e qualidade sensorial, especialmente para predizer a vida útil de produtos alimentícios. A vida útil de produtos alimentícios resfriados, é geralmente limitada, em função da deterioração por microrganismos, tais como *Pseudomonas* e *Lactobacillus* spp., e o risco é maior ainda para microrganismos patogênicos em alimentos. Sabe-se bem que a temperatura, o pH e a atividade de água são os principais fatores que influenciam na estabilidade microbiana dos alimentos, sendo que os mesmos podem variar extensivamente durante toda a cadeia de produção e de distribuição, podendo provocar alterações nos produtos levando a diminuição da vida de prateleira (VAN IMPE et al., 1995).

A microbiologia preditiva é aceita atualmente como uma ferramenta útil para o desenvolvimento de produto, análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC),

avaliação de risco e finalidades educacionais. Tem sido utilizada também para prever o crescimento de microrganismos na avaliação de deterioração, a fim de determinar a vida útil de um produto alimentício. Os organismos específicos de deterioração são selecionados para determinada classe de produtos, ou para um produto pré-selecionado, como exemplo *Lactobacillus curvatus* em produtos cárneos cozidos (KANT-MUERMANS et al., 1997).

Os efeitos da temperatura, concentração do CO₂ e da atividade de água foram avaliados sobre o crescimento *Lactobacillus sakey* através dos Modelos de Ratkowsky e Método de Superfície de Resposta, para produtos de cárneos cozidos embalados em atmosfera modificada, sendo os resultados apresentados na literatura. As variáveis apresentaram efeito significativo na extensão da vida de prateleira dos produtos e os modelos desenvolvidos podem prever a vida útil dos produtos baseados nas condições estudadas. O estudo demonstrou também que os modelos podem ser desenvolvidos para prever a vida de prateleira de produtos cárneos cozidos embalados a vácuo para um microrganismo específico, neste caso o *L. sakey*. Mas a vida útil de um produto não deve ser avaliada unicamente pelo desenvolvimento de microrganismos deteriorantes, os aspectos de segurança também devem ser avaliados, como a inibição de microrganismos patogênicos em atmosfera modificada, através de modelos preditivos (DEVLIEGHERE et al., 1999).

As bactérias ácido lácticas são responsáveis pela deterioração de produtos de cárneos cozidos embalados a vácuo (DEBEVERE, 1989; BORCH et al., 1996). O efeito inibitório dos sais do ácido láctico no crescimento de bactérias ácido lácticas vem sendo estudado por muitos pesquisadores (DEBEVERE, 1989; DE WIT & ROMBOUTS, 1990; HOUTSMA et al., 1996) que concluíram que a adição de lactato de sódio em produtos cárneos cozidos embalados a vácuo resultou na extensão da vida útil destes produtos. Devere (1989) avaliou o efeito do lactato de sódio em patê embalado a vácuo, concluindo que o mesmo retarda a deterioração dos produtos cárneos significativamente. Estudos sobre o mecanismo de ação dos sais do ácido láctico são limitados, mas sabe-se que a sua atividade tem sido atribuída à capacidade de diminuir a atividade de água de produtos alimentícios, o que poderia explicar parte dos seus efeitos antimicrobianos em produtos cárneos (DEBEVERE, 1989; CHEN & SHELEF, 1992; HOUTSMA et al., 1993). Devlieghere et al., (2000) desenvolveu um modelo preditivo para avaliar o efeito da temperatura, atividade de água e adição de diferentes porcentagens de lactato de sódio no crescimento de *Lactobacillus sakey*, em produtos cárneos cozidos embalados a vácuo. Verificou-se que nas concentrações de lactato avaliadas, a extensão da vida de prateleira era mais pronunciada para os produtos armazenados a temperaturas mais baixas. A interação entre o lactato e a temperatura de armazenamento foi

significativa na duração da fase lag e na velocidade específica máxima de crescimento. O modelo desenvolvido foi útil pra compreender a interação da temperatura de armazenamento, sobre os fatores intrínsecos (atividade de água, concentração de lactato) e a sua importância na vida de prateleira dos produtos cárneos cozidos embalados a vácuo.

Os modelos de crescimento podem auxiliar na definição da vida útil dos produtos por meio de estimativas de crescimento de patógenos prováveis, que podem ser comparados aos de crescimento da microbiota deteriorante. Um alimento deve ser desenvolvido de modo que a deterioração microbiana ocorra antes do crescimento de um patógeno potencial (BUCHANAN et al., 1997). Os modelos auxiliam no desenvolvimento de produtos, pois as conseqüências microbianas decorrentes de alterações na composição ou processamento podem ser avaliadas rapidamente (WHITING & BUCHANAN, 1993).

2.5 Métodos de Análise Sensorial

A análise sensorial pode ser definida como um conjunto de técnicas utilizadas para identificar, medir e interpretar as propriedades de um alimento através das sensações percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição. É utilizada para avaliar características quantitativas e qualitativas dos alimentos, utilizando o homem como instrumento de medida (ROTA & OLIVEIRA, 2004). Nenhum instrumento ou combinação de instrumentos pode substituir os sentidos humanos. Observa-se um número relativamente grande de medidas instrumentais correspondentes a cada propriedade sensorial. Isto enfatiza o fato de que os instrumentos medem parâmetros únicos, enquanto que os sentidos humanos registram uma impressão holística da complexidade de um alimento. Os métodos sensoriais são classificados de acordo com a ABNT, (1993) em: Métodos discriminativos, que estabelecem diferenciação qualitativa e / ou quantitativa entre as amostras; Métodos descritivos, que descrevem qualitativa e quantitativamente o produto e tem como objetivo caracterizar as propriedades sensoriais do alimento; Métodos subjetivos, que expressam a opinião pessoal do consumidor. Os métodos subjetivos, hedônicos, têm como principal propósito avaliar a resposta pessoal, preferência ou aceitação, de um consumidor em potencial, ter uma idéia da aceitação ou avaliação de um alimento (BERGARA-ALMEIDA & SILVA, 2002). A palavra hedônica refere-se aos estados psicológicos conscientes agradáveis ou desagradáveis. Os testes de preferência ou aceitabilidade são realizados com consumidores e é uma avaliação subjetiva dependente do avaliador (consumidor), sendo necessário um número de pessoas que seja representativo do mercado consumidor em estudo. Para os testes discriminativos e descritivos é necessário uma equipe de julgadores treinada onde as

características avaliadas são fundamentalmente objetivas e dependentes do objeto de estudo (ROTA & OLIVEIRA, 2004).

O principal objetivo da pecuária no Brasil é aumentar a produção, concomitantemente com a qualidade da carne, necessitando de pesquisas que permitam associar o manejo e tipo de criação que os animais são submetidos ao produto final que satisfaça as exigências do consumidor, através da análise sensorial, orientando todos os segmentos da cadeia produtiva da carne. A medida da qualidade da carne poderia ser estabelecida a partir dos pontos de vista: econômico, comercial, científico e do produtor, que estaria interessado em melhorar a qualidade dos animais. Em todas as áreas, a análise sensorial da carne tem grande importância como técnica de controle e manutenção da qualidade dos produtos (SAÑUDO, 2004). Para a indústria cárnea, a análise sensorial é de extrema importância no processo de controle de qualidade. Conforme as indicações de *marketing*, baseado nas preferências do consumidor, se obtém o perfil da carne e a influência que a sua variação pode exercer sobre o consumidor, assim como a identificação de atributos indesejáveis. Pode-se desta forma classificar o produto em categorias, diferenciá-lo e controlar sua variação (SANTOLARIA, 1993).

Segundo Teixeira et al., (1987) os métodos sensoriais são baseados nas respostas aos estímulos sensoriais e podem ser divididos em quatro grupos: testes de sensibilidade, testes de diferenças, testes analíticos e testes de escala e categorias. No testes de diferenças podem ser avaliadas diferenças simples, direcionais ou ainda diferença de preferência e qualidade. O teste duo-trio é um exemplo onde se avaliam diferenças entre amostras considerando uma como padrão de referência. Entre os testes de escalas e categorias estão os de preferência e aceitabilidade, citando a escala hedônica que é muito utilizada, bastante flexível, muito útil para avaliadores pouco treinados, e possui uma ampla faixa de aplicação. Qualquer que seja o método utilizado para avaliar um produto, seja aceitabilidade ou preferência, é muito importante realizar a avaliação estatística dos resultados, sendo possível desta forma verificar as diferenças significativas entre produtos avaliados.

Os atributos mais importantes na avaliação da carne são: aparência, suculência, sabor e textura (BARTON-GADE et al., 1988). A textura é um parâmetro sensorial que somente o ser humano pode perceber, descrever e quantificar (HYLDIG & NIELSEN, 2001). A avaliação instrumental da textura na carne pode ser feita por meio de um texturômetro, um equipamento que permite apenas avaliar a resistência do tecido ao corte e à compressão a que foi submetido.

No desenvolvimento de novos produtos, as maiores falhas ocorrem em função do não entendimento entre consumidor e produtores. Os teste sensoriais podem contribuir com o

setor de pesquisa e desenvolvimento de novos produtos, através dos testes de preferência e aceitação, realizados com equipes treinadas. Sendo que as preferências podem ser influenciadas por grupos de consumidores específicos, religião, regiões demográficas, interesses pela saúde (alimentos com baixo teor de gordura, baixo teor de sal, de açúcar), sendo necessário definir qual será o público alvo daquele novo produto a ser desenvolvido (RESURRECCION, 2003).

Grande parte da dieta humana consiste de carnes e produtos cárneos. A preferência por estes produtos é apenas uma parte que justifica sua escolha. Isso implica que, tanto a preferência quanto a escolha, são afetadas por fatores endógenos (hereditariedade, sexo, idade, atividade desenvolvida) e fatores exógenos (cultura, a sociedade e a economia). A preferência não pode ser considerada um bom indicativo para prever e frequência de consumo, já que este é afetado tanto pelo comportamento quanto pelos valores individuais e culturais. Os atributos do produto é que são considerados decisivos na preferência de um produto sobre o outro (RESURRECCION, 2003).

Ruusunen et al. (1999) avaliaram o teor de sal, em concentrações variando de 1,05 até 1,95% em produtos cárneos, através da análise sensorial com um painel de 34 avaliadores. Os autores concluíram que a análise sensorial mostrou que a redução da porcentagem de sal pode ser realizada até 1,35%, sem a rejeição do produto e sem que seja percebida a diferença pelo avaliador.

Correia et al.,(2001) desenvolveram três diferentes formulações de lingüiça de pescado elaboradas com camarão, peixe e bacon: formulação A (camarão e peixe); formulação B (camarão, peixe e bacon) e formulação C (camarão e bacon). As amostras foram avaliadas quanto à aceitabilidade sensorial e preferência. Após análise estatística observaram que não foi detectada diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações avaliadas quanto à aceitabilidade, mas no teste de preferência revelaram que a formulação contendo bacon foi preferida, sendo a preferência de 6% para a formulação A, 35% para a formulação B e 59% para formulação C.

2.6 Importância das Bactérias Acido Lácticas

As bactérias ácido lácticas pertencentes à família *Lactobacillaceae* são classificadas em diferentes gêneros baseado em características morfológicas, tipo de fermentação da glicose, crescimento em diferentes temperaturas, configuração do ácido láctico reduzido, capacidade de crescer em altas concentração de sal e tolerância a substâncias ácidas e

alcalinas (STAINER et al.,1995). As bactérias ácido lácticas consistem os gêneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactococcus* (CARR et al., 2002).

O termo bactéria láctica ou bactéria ácido láctica passou a ser uma constante nos artigos científicos, tendo Orla & Jensen, em 1919, definido este importante grupo em memorável publicação. Inicialmente, o gênero *Lactobacillus* foi classificado em homofermentativa e heterofermentativa baseado no produto final de sua fermentação, a quantidade de ácido láctico formado durante a fermentação da glicose (CARR et al., 2002).

As bactérias lácticas (BAL) compreendem um grupo amplo de microrganismos, mas que apresentam diversas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. São microrganismos Gram positivos, não formadores de esporos, anaeróbios, aerotolerantes, fastidiosos, ácido tolerantes, com metabolismo estritamente fermentativo, apresentando o ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos (DE MARTINIS et al., 2002). As BAL podem interferir com a multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas por meio de vários mecanismos: competição por oxigênio, competição por sítios de ligação e produção de substâncias antagonistas, especialmente bacteriocinas. A produção de bacteriocinas tem sido verificada em bactérias lácticas associadas a alimentos, incluindo representantes dos gêneros *Lactococcus* spp, *Lactobacillus* spp e *Pediococcus* spp (DE MARTINIS et al., 2002, ROSA et al., 2002).

Atualmente, é consenso que estas bactérias constituem um importante grupo gram-positivo, não-esporulado, microaerófilo e que o principal produto obtido por fermentação a partir dos carboidratos é o lactato (TERRA, 2003).

As bactérias homofermentativas incluem o gênero *Streptococcus* e *Pediococcus*, e outros e produzem ácido láctico como produto principal da fermentação da glicose. As bactérias heterofermentativas incluem o gênero *Leuconostoc* e um subgrupo do gênero *Lactobacillus*, as Betabactérias, e produzem um número de produtos além do ácido láctico, que incluem o dióxido de carbono, ácido acético e etanol a partir da fermentação da glicose. As bactérias ácido lácticas compreendem um amplo grupo de microrganismos associados a plantas, carnes e produtos lácteos que podem produzir uma variedade de compostos antagonistas ao crescimento de outras bactérias (CARR et al., 2002).

O gênero *Lactobacillus* também foi dividido em três grupos: termobactéria, estreptobactéria e betabactéria, em função da temperatura de crescimento e das suas reações bioquímicas. As termobactérias podem crescer a temperaturas de 45°C ou mais, porém não crescem a 15°C, as estreptobactérias crescem a 15°C, mas não a 45°C e as betabactérias

crecem a 15°C (CARR et al., 2002). O gênero *Lactobacillus* é essencial na população microbiana de carnes e produtos cárneos, apresentando grande influência na qualidade destes produtos.

Os *Lactobacillus* são considerados frequentemente culturas iniciadoras de fermentação e participante benéfico na ecologia microbiana nas dietas humanas e para animais. Entretanto, pesquisas mostram que podem causar algumas doenças, como doenças vasculares e reumáticas, infecções, além de cáries dentárias (HARTY et al., 1994).

Segundo Lucke (2000) as bactérias ácido lácticas são microorganismos importantes usados como culturas *starters* em produtos cárneos fermentados. Sua adição aos produtos cárneos pode proporcionar maior segurança e estabilidade ao produto, estender sua vida útil e fornecer diferentes resultados nas propriedades sensoriais, além de proporcionar também benefícios à saúde por suas características probióticas.

As culturas *starters* são geralmente mistura de microrganismos, visando somar suas ações, características de cada uma, para se obter o efeito desejado no produto final. Os microrganismos mais utilizados na fermentação de carnes são os do gênero *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. sake*, *L. curvatus*, *L. pentosus*) e *Pediococcus* (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*). *Lactobacillus* são utilizados quando se deseja uma acidificação mais rápida, enquanto que *Pediococcus* quando se deseja uma acidificação natural mais lenta (TERRA, 1998).

Segundo Hugas (1998) as carnes são altamente sensíveis à deterioração microbiana devido às suas propriedades como atividade de água, pH e inúmeros nutrientes. Nas carnes, as bactérias ácido lácticas constituem uma parte da flora inicial a qual se desenvolve facilmente após o seu processamento, estocadas à baixas temperaturas, embaladas a vácuo ou em atmosfera modificada. Ainda segundo o mesmo autor, as linhagens de bactérias ácido lácticas geralmente consideradas como naturais em carnes e produtos cárneos são: *Carnobacterium piscicola*, *C. divergens*, *L. sakei*, *L. viridescens*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Le. gelidum*. Os produtos metabólicos das bactérias ácido lácticas têm sua importância na preservação dos alimentos. Entretanto, o crescimento incontrolável de algumas espécies de bactérias lácticas pode causar deterioração em carnes e produtos cárneos.

A qualidade e a vida útil de produtos cárneos cozidos são determinadas pelo crescimento dos microrganismos. Para controlar o desenvolvimento microbiano e as conseqüências dos microrganismos nos alimentos, são utilizados os mais diversos métodos de preservação de alimentos. A embalagem a vácuo tem se mostrado muito eficaz para estender a

vida de prateleira de alimentos perecíveis tais como produtos cárneos (CHURCH & PARSONS, 1995). Sob estas circunstâncias a fonte do oxigênio será restrita em produtos embalados à vácuo, assim sendo, apresenta efeito seletivo na população microbiana (FARBER, 1991; LABADIE, 1999). Nestas condições o crescimento de muitos microrganismos se torna seletivo, mas as bactérias ácido lácticas se apresentam como o componente principal da microflora de deterioração (KORKEALA & BJÖRKROTH, 1997).

As bactérias ácido lácticas foram identificadas como a maior população deteriorante em produtos embalados à vácuo, e em atmosfera modificada, além de outros produtos cárneos processados armazenados sob temperatura de refrigeração (SAMELIS et al., 2000).

As bactérias ácido lácticas influenciam significativamente na qualidade da carne e produtos cárneos e estão associadas com a deterioração destes produtos. Sob condições anaeróbias as bactérias ácido lácticas podem provocar modificações nos produtos cárneos com o aumento da acidez, tornando-os mais azedos (ácidos), com exudados leitosos, viscosos, promover a perda da coloração e, com a produção de gás, podem ainda provocar inchamento na embalagem. A temperatura é o principal fator responsável pelas reações de deterioração, mas o desenvolvimento bacteriano em produtos embalados, além da temperatura, também é influenciado pela atividade de água e a disponibilidade de oxigênio, que vai determinar a quantidade e o tipo de microrganismos que poderá se desenvolver naquelas condições, nas carnes e produtos cárneos (DEVLIEGHERE et al., 1998 (a); LABADIE, 1999; CAYRÉ et al., 2003).

A flora de deterioração dos produtos cárneos embalados a vácuo ou com atmosfera modificada, consiste principalmente de *Lactobacillus* spp., predominante *L. sakey*, e *L. curvatus*, seguido, *Brochothrix thermosphacta*, *Leuconostoc* spp., *Weissella* spp. e de *Carnobacterium* spp. (BORCH et al., 1996; SAMELIS et al., 2000).

Cayré et al., (2005) avaliando o efeito da permeabilidade gasosa das embalagens e da temperatura de armazenamento (0°C, 8°C e 15°C), no crescimento de bactérias ácido lácticas e *Brochothrix thermosphacta* em produtos cárneos cozidos, concluiu que a temperatura apresenta efeito significativo na população bacteriana de ambas, enquanto que a permeabilidade gasosa influencia apenas na *Brochothrix thermosphacta*.

2.7 Microbiologia Preditiva

Muitos gêneros alimentícios são excelentes meios para o desenvolvimento de diferentes microrganismos e, se as condições forem favoráveis ao crescimento, produzirão transformações no sabor, odor, aspecto, além de outras características dos alimentos. Os processos de degradação podem ser descritos através da fermentação, rancidez, putrefação. Estas alterações não se limitam apenas aos resultados de degradação, também podem ser provocadas por produtos de síntese microbiana que podem causar alterações na cor dos alimentos, devido à formação de pigmentos e outros que formam substâncias muciliginosas pela síntese de polissacarídeos (FRANCO & LANDGRAF, 1996). O comportamento dos microrganismos nos alimentos (crescimento, sobrevivência e morte) é determinado pelas propriedades dos alimentos (atividade de água e pH) e pelas condições de estocagem (temperatura, umidade relativa e atmosfera).

A microbiologia preditiva está baseada na hipótese de que o efeito das propriedades dos alimentos como pH, atividade de água, entre outras, pode ser previsto através de modelos matemáticos derivados de estudos quantitativos dos microrganismos. A necessidade de garantir a segurança microbiológica e a qualidade dos alimentos tem estimulado a aplicação da microbiologia preditiva. O uso de modelos matemáticos na microbiologia de alimentos começou em 1920, com desenvolvimento de métodos para calcular o tempo de destruição térmica de microrganismos (NAKASHIMA et al., 2000). Contudo, a aplicação de técnicas de modelagem matemáticas para descrever o crescimento e sobrevivência de microrganismos em alimentos não recebeu muita atenção até a década de 80 (ROSS & McMEEKIN, 1994).

Dois fatores foram apontados como responsáveis pelo crescente interesse na aplicação da microbiologia preditiva:

- 1- O aumento marcante da incidência de importantes surtos de intoxicação alimentar durante a década de 80, ocasionando um aumento acentuado da preocupação pública em requerer o fornecimento de alimentos seguros e saudáveis;

- 2- A conscientização por parte de muitos microbiologistas de alimentos, de que os métodos microbiológicos tradicionais, para a determinação da qualidade e segurança dos alimentos, eram limitados pelo tempo necessário para se obter um resultado e tinham, portanto, pouco valor preditivo, e que os métodos indiretos baseados em mudanças químicas, físicas ou físico-químicas exigiam um nível muito elevado de células para fornecer uma resposta, o mesmo ocorrendo com muitos métodos propostos (McMEEKIN et al., 1993).

Buchanan (1993) apontou ainda um terceiro fator que contribuiu para o aumento do interesse na aplicação do conceito da microbiologia preditiva, a crescente facilidade de acesso aos computadores, visto que as ferramentas estatísticas, matemáticas e microbiológicas já existiam, mesmo antes da expansão dos estudos em modelagem. O grande empenho com pesquisa não teria sido valorizado sem a habilidade de solucionar de forma rápida as complexas equações de modelagem.

A microbiologia preditiva unifica a microbiologia, a engenharia e a estatística para obter predições sobre o comportamento microbiológico em sistemas alimentares, usando ferramentas matemáticas. Pode-se fazer uso de expressões para avaliar a população microbiana com o tempo, avaliar como as condições ambientais afetam a velocidade de crescimento ou inativação, também como o comportamento dos alimentos concorre para o desenvolvimento microbiológico, desta forma, fornecendo informações importantes na tomada de decisão, na análise de risco, na segurança e qualidade dos alimentos, na avaliação da vida de prateleira, bem como, no desenvolvimento de novos produtos ou processos.

Sabe-se que todos os alimentos se deterioram com o tempo, mas a velocidade com que este processo ocorre depende da qualidade e quantidade dos ingredientes, da severidade do processo, do sistema alimento-embalagem, do sistema armazenamento-distribuição, que podem afetar o crescimento microbiano através de modificações físicas e químicas, levando a diminuição da vida de prateleira.

Estudos têm demonstrado que existe uma velocidade de crescimento mínima na qual o desenvolvimento da população microbiana não ocorre, mesmo em longos períodos de incubação. Isto pode ser atribuído a um único fator como a temperatura, ou uma combinação de fatores como temperatura, atividade de água, pH, entre outros. Geralmente quando mais de um fator afeta o desenvolvimento da população, o nível absoluto necessário para cada uma das variáveis tem sua importância reduzida. Com o Conceito da Teoria de Barreiras (*Hurdle Concept*) determina-se o conjunto de condições necessárias para prevenir o crescimento de microrganismos, ou mesmo causar sua inativação, na busca por alimentos saudáveis, que permaneçam estáveis e inócuos, mantendo suas características organolépticas e nutricionais aceitáveis (McMEEKIN et al., 2002).

A temperatura é um dos mais importantes fatores ambientais que afetam o crescimento bacteriano em alimentos. A temperatura dos alimentos durante o processamento, estocagem, distribuição, comercialização, está sujeita a variações constantemente, o que torna os produtos alimentícios vulneráveis às modificações. Alguns pesquisadores têm desenvolvido modelos matemáticos com temperatura dinâmica, levando em consideração a variação de temperatura

durante o armazenamento, ou avaliação da qualidade dos produtos em diferentes temperaturas mas nem sempre muito satisfatórios (BARANY & ROBERTS, 1995; VAN IMPE et al., 1995; KOUTSOUMANIS, 2001). Ainda são as poucas pesquisas disponíveis na literatura com alimentos em armazenamento sob variação de temperatura.

Os modelos preditivos são usados atualmente como ferramenta de investigação e avaliação dos processos de conservação de alimentos. A modelagem preditiva proporciona um caminho rápido e ainda relativamente econômico para se obter dados confiáveis de crescimento, inativação e sobrevivência no desenvolvimento microbiano. A microbiologia preditiva poderá prever parâmetros como velocidade máxima de crescimento, duração da fase lag e população microbiana máxima atingida, no desenvolvimento de novos produtos, na fase de produção, armazenamento e distribuição, podendo assim, avaliar a vida de prateleira dos produtos alimentícios.

2.8 Modelos Matemáticos

A compreensão da microbiologia preditiva depende de certa familiaridade com a terminologia matemática e estatística. Um modelo de regressão seja linear ou não linear consiste de uma parte determinística e uma parte estocástica. A parte determinística representa a relação entre a variável resposta e as variáveis explanatórias, e a parte estocástica representa o quanto a resposta esperada se desvia da resposta observada ou a real. Ainda temos os parâmetros estimados por meio de dados experimentais que devem ser ajustados para minimizar a diferença entre a resposta observada e a prevista pelo modelo (McMEEKEN et al., 1993).

A microbiologia preditiva tem sido considerada sob os aspectos probabilísticos e cinéticos, gerando os respectivos modelos:

Modelo Probabilístico: direcionado para o conhecimento das condições em que um determinado evento possa ocorrer (crescimento x não crescimento), descrevendo a probabilidade em que estas condições possam ser definidas (fronteiras, combinações, temperatura, atividade de água, pH).

Modelos Cinéticos: correspondem à modelagem da extensão e velocidade de crescimento ou de destruição de microrganismos de interesse (NAKASHIMA et al., 2000).

Estes modelos poderiam ser do tipo empírico (descrevem um conjunto de dados através de relação matemática conveniente), ou determinístico (fornecem interpretação dos parâmetros

em termos de fenômenos e processos conhecidos) (McMEEKIN, et. al.,1993). A resposta microbiana poderia ser completamente descrita mediante uma combinação de ambos.

Segundo Whiting & Buchanan (1993), os modelos matemáticos podem ser classificados como: **modelos primários, secundários e terciários**. Para se obter a previsão ou a estimativa da segurança e da qualidade de um alimento, o processo de modelagem é revertido, ou seja, os valores dos fatores ambientais de interesse são introduzidos no modelo secundário para se obter valores específicos para o modelo primário. O modelo primário é então, resolvido por meio de incremento no tempo para se obter uma curva de crescimento ou de destruição esperada para aquela combinação de valores dos fatores ambientais.

Modelos Primários: descrevem as mudanças de número de microrganismos ou outra resposta microbiana com o tempo.

Modelos Secundários: Descrevem as repostas de parâmetros do modelo primário com as condições ambientais como pH, temperatura e atividade de água.

Modelos Terciários: Combinam o uso de modelos primários e secundários em um pacote de programas. São rotinas se *softwares* que transformam modelos primários e secundários em modelos na forma de aplicativos, que podem determinar respostas microbianas em diferentes condições ou ainda comparar o crescimento de diferentes microrganismos.

2.8.1 Modelos Primários de Crescimento

Os principais modelos primários de crescimento são:

- Modelo de Monod
- Modelo Gompertz
- Modelo de Gompertz Modificado
- Modelo Logístico
- Modelo de Baranyi & Roberts
- Modelo de Buchanan – Modelo linear de três fases
- Modelo de Hills

O modelo de Gompertz é um modelo não linear. A base deste modelo é que, devido à limitação no espaço e/ou nutrientes bem como a produção de metabólitos tóxicos, a velocidade de crescimento microbiano não é constante. Tipicamente, a velocidade de crescimento aumentaria até um máximo e depois então diminuiria.

O Modelo de Gompertz é dado pelas Equações 2.1.

$$y = C \cdot \exp\{\exp[-B \cdot (t - M)]\} \quad (2.1)$$

Onde:

$$\mu = B \cdot C / e \quad (2.2)$$

$$\lambda = M - (1/B) \quad (2.3)$$

Onde:

$$y = \log N/N_0$$

C, M e B = parâmetros do modelo;

μ = velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1});

λ = duração da fase lag (h);

$$e = 2,7182$$

t = tempo (h).

Zwietering, et. al. (1990) propuseram a reparametrização da função de Gompertz para obter a representação direta dos parâmetros de interesse: a velocidade específica máxima de crescimento e o tempo de duração da fase lag, resultando no Modelo de Gompertz Modificado, que está representada na Equação 2.4;

$$y = A \cdot \exp\left[-\exp\left(\frac{\mu^e}{A} \cdot (\lambda - t) + 1\right)\right] \quad (2.4)$$

Onde:

$$y = \log N/N_0;$$

A = população máxima atingida;

μ = velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1});

λ = duração da fase lag (h);

t = tempo (h).

O modelo mais utilizado para descrever curvas de crescimento é o Modelo de Gompertz Modificado, trata-se de uma de uma função exponencial dupla, que descreve uma curva sigmóide assimétrica. A equação de Gompertz não está explícita a fase lag (como é o caso do modelo modificado), apenas o aumento da densidade de células, uma vez iniciado o crescimento exponencial (NAKASHIMA et al., 2000).

Apesar de existir uma grande variedade de curvas sigmóides, o modelo de Gompertz modificado é o que fornece melhores ajustes aos dados relacionados com a microbiologia. Mesmo com a vasta utilização, a fase lag não é paralela ao eixo das abscissas, a equação não é uma reta e, portanto não apresenta um período de aumento linear durante a fase de crescimento exponencial, como é observado na maioria das curvas de crescimento. Assim sendo, como a velocidade de crescimento exponencial é determinada por um ponto de inflexão na curva, o processo de ajuste tende a fornecer valores que variam mais do que as velocidades de crescimento correspondentes, determinadas por um período de crescimento linear (BUCHANAN et al., 1997).

Apesar do Modelo de Gompertz ser considerado o que fornece os melhores ajustes aos dados relacionados, o Modelo Logístico também tem sido utilizado em casos específicos limitados. Como exemplo da utilização deste modelo, temos a avaliação da vida de prateleira de peixes embalados, citado por Dalgaard et al. (1997) e Koutsoumanis & Nychas (2000).

O Modelo Logístico pode ser representado pelas equações 2.5, 2.6 e 2.7:

$$y = \frac{A}{(1 + \exp(D - F.t))} \quad (2.5)$$

$$\text{Sendo } \mu = C.F/4 \quad (2.6)$$

$$\lambda = D - 2/F \quad (2.7)$$

Onde:

$y = \log N/N_0$

A= população máxima atingida;

C, D, F= parâmetros do modelo;

μ = velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1});

λ = duração da fase lag (h);

t= tempo(h)

Uma das maiores fontes de incerteza quando se usam modelos primários é determinar o valor apropriado para N_0 já que o número inicial de contaminantes em uma batelada de alimento pode ser perfeitamente variável. Diferenças na composição dos alimentos também podem influenciar o tempo lag, a velocidade de crescimento e a densidade máxima da população microbiana (SHAFFNER & LABUZA,1997).

Na Tabela 2.2 são apresentadas algumas aplicações dos principais modelos primários de crescimento

Tabela 2.2 Aplicações de modelos primários de crescimento

Autor	Título do Artigo	Modelos Avaliados
Buchanan et al., 1997	When is simple good enough: a comparison Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves.	Gompertz Baranyi Buchanan
Lihan & Huang , 2003	Estimation of growth of <i>Clostridium perfringens</i> cooked beef under fluctuating temperature conditions.	Gompertz
Zhao et al., 2002	Time-to-detection, percent growth-positive maximum growth rate models for <i>Clostridium botulinum</i> 56A a multiple temperatures.	Gompertz Modificado
Chhabra et al., 2002	A predictive model that evaluates the effect of growth conditions on the thermal resistance of <i>Listeria monocytogenes</i>	Gompertz
Baty & Muller, 2004	Estimating the bacterial lag time: which model, which precision	McKellar

2.8.2 Modelos Secundários de Crescimento

Variações na população de microrganismos nos alimentos, com o tempo (cinética microbiológica) são orientadas pelas condições de estocagem (fatores extrínsecos) e pelas

características do produto (fatores intrínsecos). Estes fatores, coletivamente são denominados parâmetros ambientais. Modelos que descrevem o efeito das condições ambientais sobre os valores dos parâmetros dos modelos primários são denominados modelos secundários. Os modelos secundários envolvem equações que descrevem como as respostas dos modelos primários (duração da fase lag, velocidade de crescimento e densidade máxima de população) mudam com alterações nos fatores ambientais. Quando um grupo específico de alimentos está sendo modelado, particularmente quando a temperatura for o fator primário de interesse, como é freqüentemente o caso, estas equações podem ser baseadas nas Equações de Arrhenius ou de Bélerádek (Modelo da Raiz Quadrada) (McMEEKIN et al., 1993, SKINNER et al., 1994).

2.9 Comparação de Modelos Preditivos

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

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

Mas com as pesquisas até o momento realizadas, ainda não é possível selecionar um único modelo, como o mais apropriado modelo de crescimento, pois isso depende de muitos fatores e da sua adaptação às condições para a sua aplicação. Um modelo pode apresentar algumas vantagens sobre outro em determinado aspecto, mas pode ser deficiente em outros aspectos, assim é necessária uma avaliação global do modelo com critérios pré-determinados, para se comparar os modelos em situações específicas.

2.10 Modelos Não Isotérmicos

Atualmente, existem muitos modelos matemáticos que permitem prever o crescimento de uma ampla classe de microrganismos patogênicos ou deteriorantes sobre combinações distintas de fatores ambientais, intrínsecos e extrínsecos. A modelagem matemática é realizada geralmente, assumindo condições constantes para determinar os parâmetros cinéticos de crescimento. Vários modelos mostram o efeito da temperatura sobre os parâmetros cinéticos de crescimento de microrganismos distintos e são construídos supondo que a temperatura se mantém constante com o tempo (GIANUZZI, et al., 1998; DEVLIEGHERE, et al., 1998 (b)). Entretanto condições como temperatura e pH de alimentos principalmente refrigerados, não se mantém constante durante o armazenamento (TAOUKIS & LABUZA 1989). Devido a isso, a modelagem matemática também poderá ser direcionada para a obtenção de modelos em armazenamento não isotérmico, quer dizer, modelos que permitam prever e assegurar a vida útil dos alimentos em condições de temperatura flutuantes. Um dos fatores que mais varia durante o armazenamento é a temperatura, por isso é o mais investigado (ROSS & McMEEKIN, 1994; VAN IMPE et al., 1995). Portanto, para que os modelos possam ser aplicados a alimentos armazenados em condições reais, quer dizer, condições onde a temperatura varia com o tempo, é necessário considerar no modelo o efeito das mudanças das variáveis externas sobre o crescimento microbiano, com o objetivo de obter predições mais precisas para assegurar a vida útil dos mesmos (CAYRÉ et al., 2003).

A atual filosofia para segurança e qualidade dos alimentos está constantemente diminuindo o foco, testando e verificando apenas os produtos finais, que tradicionalmente sempre foi fundamental para regulamentação e controle de qualidade dos alimentos. Os esforços dos produtores e a legislação estão concentrados sobre o desenvolvimento e aplicação de uma estrutura do sistema de segurança da qualidade, baseado na prevenção através do monitoramento, controlando e registrando parâmetros críticos através da entrada

dos produtos no ciclo de vida, estendendo para produção, distribuição armazenamento, ou seja, o acompanhamento de todas as etapas dos produtos (TAOUKIS et al., 1999).

Segundo Van Impe et al., (1995) o desenvolvimento de um modelo dinâmico (Modelo Não Isotérmico) pode ocorrer em duas etapas. Primeiro é desenvolvido um modelo dinâmico apenas para o crescimento microbiano e, em uma segunda etapa, são incluídas a inativação e uma possível transição entre crescimento e a inativação.

Ainda segundo o mesmo autor alguns requisitos são necessários à um modelo dinâmico, conforme descritos abaixo:

- 1- deve ser capaz de descrever perfis de temperaturas variáveis de forma consistente, obtendo variáveis que tenham valores aceitáveis em quaisquer condições;
- 2- o modelo deve ser capaz de simular a transição (suave ou não) entre crescimento e inativação, usando o menor número possível de parâmetros;
- 3- a história prévia do produto deve ser considerada;
- 4- o modelo deve ser reduzido a um modelo simples existente caso a temperatura seja constante;
- 5- o modelo deverá ter alguns requisitos matemáticos, como o cálculo não linear de parâmetros através da utilização de técnicas matemáticas modernas.

Van Impe et al. (1992) propuseram um modelo dinâmico de crescimento e inativação durante o processamento de alimentos, em função da temperatura e do tempo. A maior e principal característica deste modelo foi a sua capacidade de avaliar os produtos sob variação do tempo com a temperatura. O modelo pode simular o comportamento de microrganismos em diferentes temperaturas em torno da transição entre o crescimento e a inativação. O modelo é útil para a predição e o controle de crescimento microbiano durante o armazenamento de produtos resfriados. O modelo utilizado por Van Impe et al., (1992) foi utilizado por Van Impe et al., (1995) com dados experimentais para *Brochothrix thermosphacta* e *Lactobacillus plantarum*.

Cayré et al., (2003) utilizaram o modelo proposto por Van Impe et al.,(1992), para avaliação de salsichas armazenadas em temperaturas de 0, 8 e 15 °C, durante sessenta dias. Periodicamente eram retiradas amostras de salsichas em diferentes condições de armazenamento e avaliadas através da contagem de bactérias ácido lácticas. Os resultados obtidos foram utilizados para estimar a velocidade específica máxima e duração da fase lag e o modelo proposto foi considerado satisfatório nas condições avaliadas.

Segundo Corradini & Peleg, (2005) e Corradini et al., (2006) os modelos primários e secundários, derivados de dados de crescimento isotérmico, podem ser utilizados para

predizer padrões de crescimento microbiano sobre uma variedade de condições não isotérmica.

Uma nova versão do Modelo Logístico foi proposta, como Modelo Logístico Modificado (modelo primário) como apresentado na Equação 2.8 (CORRADINI & PELEG, 2005).

$$y(t) = \frac{a'(T)}{1 + \exp\{k(T)t_c(T) - t\}} - \frac{a'(T)}{1 + \exp[k(T)t_c(T)]} \quad (2.8)$$

Sendo $y(t) = \log N/N_0$

$$\frac{dy(t)}{dt} \Big|_{(t_{cte})} = \frac{k(T)a(T)\exp(k(T)\{t_c(T) - t\})}{[1 + \exp(k(T)\{t_c(T) - t\})]^2} \quad (2.9)$$

Onde os parâmetros do modelo:

a' = população máxima atingida;

k = Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1});

t_c = Ponto de inflexão na curva (h).

Os parâmetros podem ser descritos em função da temperatura por modelos secundários através de equações exponenciais, polinomiais, linear, potência, conforme o melhor ajuste aos dados propostos.

Considerando que:

$$a'(T) = a'[T(t)]; \quad (2.10)$$

$$k(T) = k[T(t)]; \quad (2.11)$$

$$t_c(T) = t_c[T(t)] \quad (2.12)$$

Com a inclusão destes parâmetros descritos conforme Equações 2.10, 2.11 e 2.12, na Equação 2.9 o Modelo Não Isotérmico pode ser representado pelas Equações 2.13 e 2.14.

$$\frac{dy(t)}{dt} = \frac{k[T(t)]a'[T(t)]\exp(k[T(t)]\{t_c[T(t)]-t^*\})}{[1 + \exp(k[T(t)]\{t_c[T(t)]-t^*\})]^2} \quad (2.13)$$

Onde:

$$t^* = \frac{1}{k(T)} \log e \left[\frac{\exp[k(T)t_c(T)](a'(T) + y(T)\{1 + \exp[k(T)t_c(T)]\})}{a'(T)\exp[k(T)t_c(T)] - y(T)\{1 + \exp[k(T)t_c(T)]\}} \right] \quad (2.14)$$

Diferentes perfis de temperatura com os respectivos dados de crescimento ajustados com modelos primários e secundários, derivados de dados de crescimento isotérmico divulgados por Fujikawa et al., (2004), foram avaliados conforme modelo descrito por Corradini & Peleg (2005). Segundo Corradini & Peleg (2005), foram utilizados modelos secundários exponenciais para avaliação dos parâmetros em função da temperatura, os resultados demonstraram que, se os dados avaliados apresentaram um bom ajuste com os modelos primários, os mesmos podem ser utilizados para predizer também padrões de crescimento não isotérmico, com ajuste similar.

3-MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados nos Laboratórios do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR - Campus Medianeira.

3.1 Matéria-Prima

O trabalho foi desenvolvido com dois produtos industrializados de carne: mortadela e lingüiça defumada de suíno. Foram utilizados também ingredientes não cárneos como o cloreto de sódio, o lactato de sódio, o alho em pó e em pasta, o nitrito/nitrato de sódio e o polifosfato (Pfosfato) (fornecidos por CLARIANT; PURAC e ALIMENTUS). Todos os produtos industrializados (mortadela e a lingüiça) e os ingredientes não cárneos utilizados foi doação de uma empresa local da Região Oeste do Paraná. A amostra padrão de mortadela e/ou de lingüiça defumada utilizada na análise sensorial eram as respectivas unidades, produzidas na indústria na semana das análises sensoriais.

3.2 Bactérias ácido lácticas

Nos experimentos com culturas puras, foi avaliado o crescimento das bactérias ácido lácticas: *Lactobacillus plantarum* e *L. sakey*. As cepas *L. plantarum* (CCT 0580 – ATCC 8014, Lote 07.05) e *L. sakey* (CCT 5841 – ATCC 1562 Lote 05.03) foram adquiridas na forma liofilizada da Coleção de Cultura Tropical, Campinas, S.P.

3.3 Meios de cultura

Foram utilizados nas análises os seguintes meios de cultura: Lactobacilli - MRS Agar de Man, Rogosa & Sharpe (DIFCO); Agar padrão, PCA - *Plate Count Agar* (DIFCO).

3.4 Levantamento microbiológico da linha

Inicialmente, foram selecionadas e avaliadas as principais matérias-primas envolvidas no processo de produção da mortadela e da lingüiça defumada de suíno. Foram também

coletadas outras amostras cárneas do processo, em diferentes etapas, conforme fluxograma de produção da mortadela (Figura 3.1) e da lingüiça defumada de suíno (Figura 3.2).

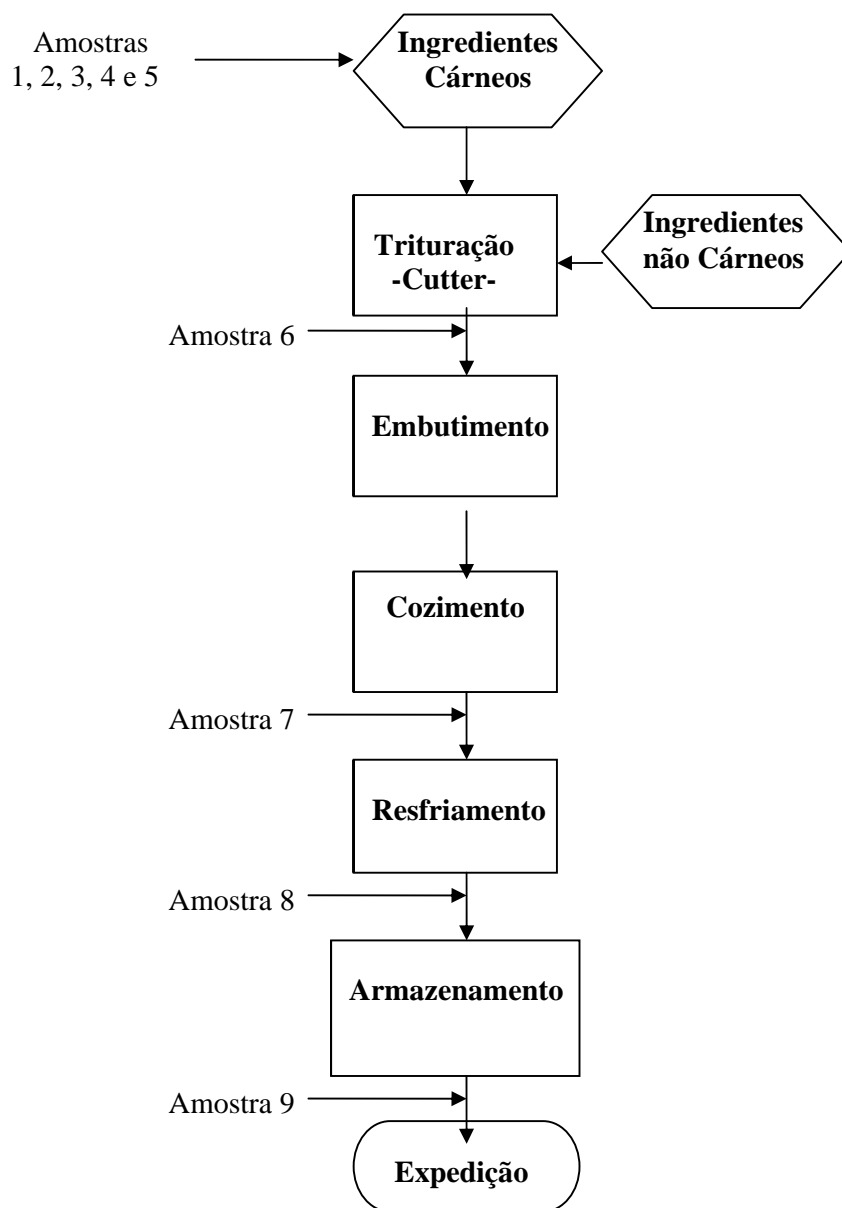


Figura 3.1 Fluxograma de produção da mortadela, com indicação dos pontos de amostragem.

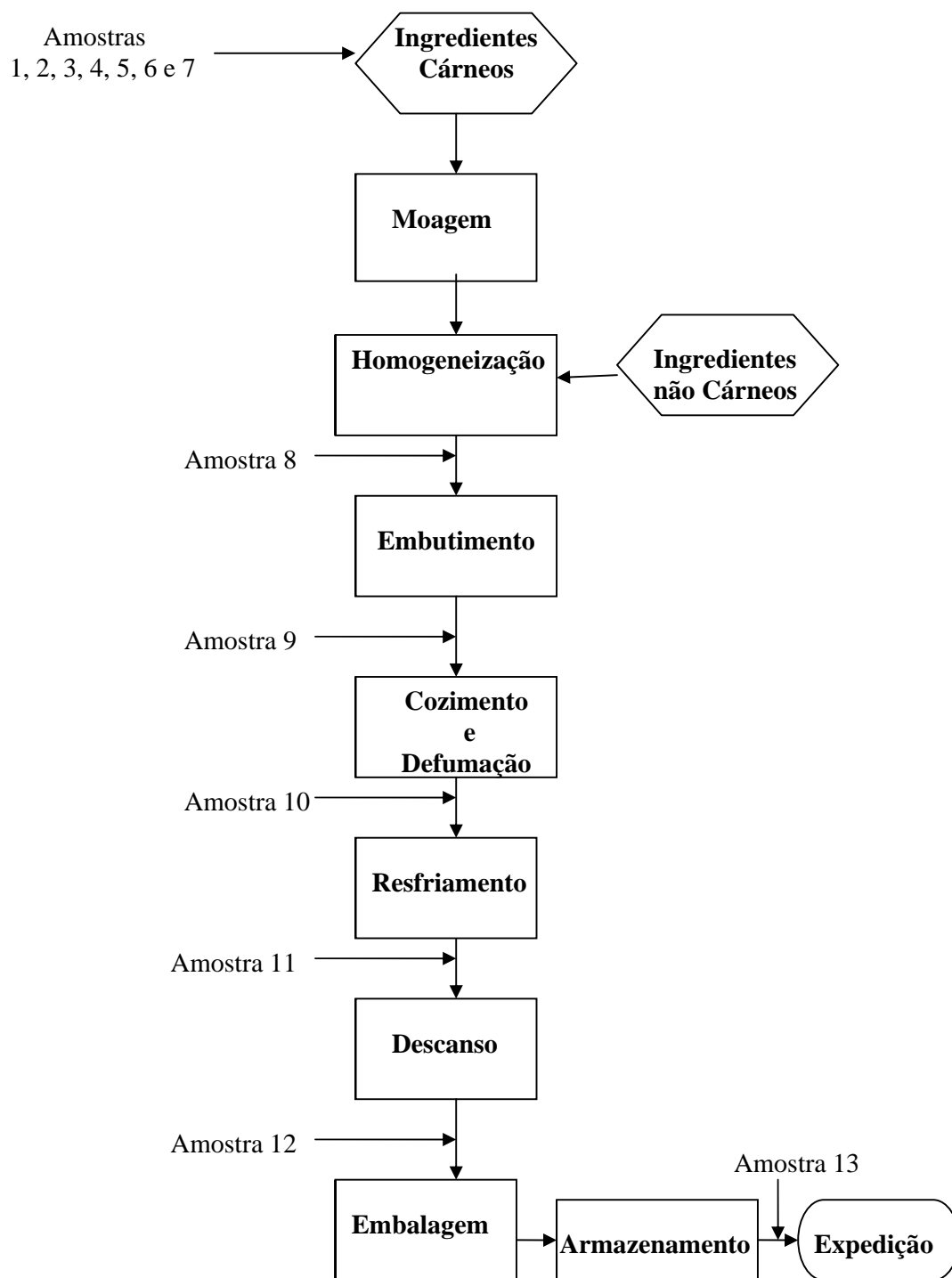


Figura 3.2 Fluxograma de produção da lingüiça defumada de suíno, com indicação dos pontos de amostragem.

3.4.1 Procedimento para análise microbiológica

As amostras foram coletadas em sacos de procedimento estéreis, transportadas em caixa térmica e levadas imediatamente para o laboratório de análises. Na câmara de fluxo laminar (Purifier Class II - Labconco) foram pesadas 25 g de amostra em saco plástico estéril; adicionado 225 mL de solução salina 0,1% (P/V); homogeneizadas (Food Sample Homogenizers – Stomaker – Logen Scientific) por 60 segundos; diluídas, plaqueadas, seguido da incubação por 48h, a 30°C, em estufa (Certomat – BS1 – Braun Biotech International). Foram realizadas contagem total com Agar padrão (PCA – *Plate Count Agar*) e contagem de bactérias lácticas com Agar de Man, Rogosa & Sharpe (MRS). As análises foram realizadas em duplicata.

3.5 Determinação da vida de prateleira da mortadela e lingüiça defumada de suíno padrão

Foram coletadas unidades do produto final da mortadela com aproximadamente 1kg (20cm de comprimento e 10cm de diâmetro), e da lingüiça defumada de suíno em embalagens (15cmx20cm) com aproximadamente 500g, da mesma produção e do mesmo lote quando da realização do levantamento microbiológico das linhas de produção de cada produto. As unidades do produto padrão (mortadela e lingüiça defumada) foram armazenadas em diferentes temperaturas, sendo que T_{a1} é uma temperatura próxima à indicada pela indústria para garantir a qualidade dos produtos e T_{a2} é superior à temperatura indicada pela indústria, conforme Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Temperaturas de armazenamento da mortadela e lingüiça defumada

Produto	T_{a1} (°C)	T_{a2} (°C)
Mortadela	20	30
Lingüiça defumada	5	10

T_{a1} e T_{a2} são as duas temperaturas de armazenamento dos dois produtos avaliados.

A avaliação da vida de prateleira dos dois produtos foi realizada através do acompanhamento do crescimento microbiano e análise sensorial. A cada três dias, eram retiradas uma unidade de mortadela armazenada a 30°C e uma unidade de lingüiça defumada armazenada a 10°C, e preparadas para análise microbiológica, conforme procedimento descrito no item 3.4.1. A cada cinco dias, eram retiradas uma unidade de mortadela armazenada a 20°C e uma unidade de lingüiça defumada armazenada a 5°C, e preparadas para análise microbiológica conforme procedimento descrito no item 3.4.1. Após resultados das análises microbiológicas, era realizada a análise sensorial dos dois produtos.

A mortadela, também foi armazenada a 25°C e realizado o acompanhamento microbiológico para a avaliação da vida de prateleira nesta condição. O acompanhamento microbiano foi realizado até atingir 10^7 UFC/g, o que indica o final da vida de prateleira dos produtos, sob ponto de vista microbiológico.

3.6 Análise sensorial da mortadela e lingüiça defumada de suíno padrão

Foi realizada a análise sensorial da mortadela e da lingüiça defumada através de dois testes: Teste da Escala Hedônica de 7 pontos (ISO, 1987) e o Teste Duo Trio. O Teste da Escala Hedônica foi realizado com 40 julgadores não treinados, com uma escala de 7 pontos, variando de *desgostei muitíssimo* (nota 1) a *gostei muitíssimo* (nota 7), através dos atributos: textura, cor, sabor e aroma, conforme ficha de avaliação 1 apresentada em anexo. O teste Duo Trio foi realizado com um grupo de dez julgadores treinados, com três repetições, conforme ficha de avaliação 2 apresentada em anexo .

Os testes de análise sensorial foram realizados em cabines individuais no Laboratório de Análise Sensorial de Alimentos da UTFPR – Campus Medianeira, a cada sete dias, no período da tarde. Três amostras de cada produto eram avaliadas simultaneamente: amostra padrão, amostra armazenada a 20°C e a 30°C da mortadela e amostra padrão, amostra armazenada a 10°C e a 5°C da lingüiça defumada. A amostra padrão era uma nova amostra, referente ao produto (mortadela ou lingüiça defumada), elaborado na linha de produção da indústria, na semana da realização da análise sensorial, armazenada nas respectivas temperaturas de cada produto, indicada pela indústria,

As amostras eram entregues aos provadores em pratos descartáveis, codificadas com números de três dígitos, acompanhadas de um copo com água, um guardanapo descartável e a ficha de avaliação. As amostras de mortadela eram cortadas em cubos de aproximadamente

1,5 cm e servidas naturalmente e as amostras de lingüiça defumada eram cortadas em rodelas de aproximadamente 1 cm e servidas previamente aquecidas.

Os resultados obtidos foram avaliados através da Análise de Variância - ANOVA e Teste de Tukey (EXCELL-2000).

3.7 Avaliação do crescimento de culturas puras de *L. sakey* e *L. plantarum* em meio MRS

3.7.1 Preparo do inóculo de *L. sakey*

Foi utilizada amostra liofilizada da cultura de *L. sakey*. A cultura foi reidratada conforme indicação da Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello, mantida em caldo MRS. No preparo do inóculo para estudo do crescimento, a cultura foi reativada em caldo MRS, incubada a 30°C por 9 horas, seguido de uma nova reativação e incubação por mais 9 horas, à mesma temperatura.

3.7.2 Preparo do inóculo de *L. plantarum*

Foi utilizada amostra liofilizada da cultura de *L. plantarum*. A cultura foi reidratada conforme indicação da Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tozello, mantida em caldo MRS. No preparo do inóculo para estudo do crescimento, a cultura foi reativada em caldo MRS, incubada a 35°C por 7 horas, seguida por uma nova reativação e incubação por mais 7 horas, à mesma temperatura.

3.7.3 Crescimento em caldo MRS

Para o estudo da influência de diferentes fatores sobre o crescimento das bactérias lácticas de *L. sakey* e *L. plantarum* foi realizado um planejamento Fatorial Fracionário, descrito a seguir.

3.7.3.1 Planejamento Fatorial Fracionário de Resolução Cinco

O crescimento das culturas de *L. sakey* e *L. plantarum* foi avaliado em caldo MRS para o estudo da influência de cinco fatores: concentração de cloreto de sódio (Sal), de polifosfato (PFosfato), de lactato de sódio, de alho em pó e de nitrito/nitrato de sódio

(Nitri+nitra). Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 125mL, com 10 % (V/V) de inóculo, com as duas bactérias. Primeiramente, os experimentos foram realizados com células de *L. sakey* e, em seguida, com células de *L. plantarum*, conforme planejamento fatorial fracionário de resolução cinco, com triplicata no ponto central. O pH inicial dos experimentos foi mantido a um valor 6 (ajustado com NaOH) e a atividade de água variou de 0,93 a 0,95. O volume total dos erlenmeyers foi de 80mL. Na Tabela 3.2, estão apresentados os experimentos realizados com as respectivas concentrações dos fatores avaliados e seus níveis. Na Tabela 3.3, estão descritos os níveis e os fatores do planejamento fatorial fracionário de resolução cinco dos experimentos realizados. Os níveis de cada fator, foram selecionados em função das concentrações adotadas pela indústria, para cada um dos produtos avaliados, mortadela e lingüiça defumada, considerando também a concentração máxima permitida, conforme Portaria nº1004/1998.

Os experimentos, conforme Tabela 3.2, foram realizados com a cultura de *L. sakey* e em seguida com *L. plantarum*. Foi realizado também o experimento 20 para cada cultura avaliada (*L. sakey* e *L. plantarum*), com 10% de inóculo e 79,2 mL de caldo MRS para controle do processo.

Tabela 3.2 Planejamento fatorial fracionário de resolução cinco.

Concentração					
Experimentos	Sal	Lactato	PFosfato	Nitri/Nitra	Alho
1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	-1	-1
3	1	1	-1	1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	1	-1	1	1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	1	-1	-1	1	1
8	1	-1	-1	-1	-1
9	-1	1	1	1	-1
10	-1	1	1	-1	1
11	-1	1	-1	1	1
12	-1	1	-1	-1	-1
13	-1	-1	1	1	1
14	-1	-1	1	-1	-1
15	-1	-1	-1	1	-1
16	-1	-1	-1	-1	1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0

Tabela 3.3 Níveis e fatores do planejamento fatorial fracionário

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Sal (%)	1,7	2,5	3,3
PFosfato (%)	0,1	0,3	0,5
Lactato (%)	1	2	3
Nitri/nitra (ppm)	10	50	90
Alho (%)	0,01	0,2	0,4

Todos os experimentos, preparados conforme Tabela 3.2, mais o experimento 20 para cada cultura avaliada, foram incubados em estufa (Certomat – BS1 Braun Biotech International). Para o acompanhamento do crescimento da cultura de *L. sakey*, foram mantidos à temperatura de 30°C, conforme condições do experimento, por aproximadamente 40 horas e os experimentos para o acompanhamento do crescimento da cultura de *L. plantarum*, mantidos à temperatura de 35°C, que também, conforme condições do

experimento, por um tempo de aproximadamente 30 horas. As curvas de crescimento foram acompanhadas até a fase estacionária. Os fatores envolvidos foram avaliados através dos parâmetros de crescimento microbiológico, conforme descrito no item 3.8.

Após avaliação dos cinco fatores, foram realizados novos experimentos através de um delineamento composto central rotacional (DCCR), com apenas quatro fatores selecionados, aqueles que apresentaram maior influência no planejamento fatorial fracionário.

3.7.3.2 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Foi avaliado o crescimento microbiano das culturas de *L. sakey* e *L. plantarum*, através de um delineamento composto central rotacional (DCCR), com triplicata no ponto central para o estudo da influência de quatro fatores, segundo o resultado obtido em 3.7.3.1: concentração de cloreto de sódio (Sal), de polifosfato (PFosfato), de lactato de sódio e de alho. O procedimento adotado para a realização dos experimentos, e acompanhamento do crescimento das culturas de *L. sakey* e *L. plantarum* foi o mesmo descrito no item 3.7.3.1.

Os níveis e fatores selecionados para o delineamento composto central rotacional (DCCR) estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 Níveis e fatores do delineamento composto central rotacional (DCCR).

Fatores	Níveis				
	-2	-1	0	1	2
Sal (%)	1,50	2,25	3,00	3,75	4,50
Lactato (%)	0,00	1,00	2,00	3,00	4,00
PFosfato (%)	0,00	0,15	0,30	0,45	0,60
Alho (%)	0,00	0,15	0,30	0,45	0,60

Na Tabela 3.5, estão apresentados os experimento realizados com os respectivos fatores e níveis selecionados.

Tabela 3.5 Delineamento composto central rotacional (DCCR).

Experimentos	Concentração			
	Sal	Lactato	PFosfato	Alho
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	1
3	-1	-1	1	1
4	-1	1	1	1
5	-1	1	-1	1
6	-1	1	1	-1
7	-1	-1	1	-1
8	-1	1	-1	-1
9	1	1	1	-1
10	1	1	-1	-1
11	1	-1	-1	-1
12	1	-1	1	-1
13	1	-1	-1	1
14	1	1	-1	1
15	1	-1	1	-1
16	1	1	1	1
17	-2	0	0	0
18	2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0

Foi realizado também o experimento 28 para cada cultura avaliada (*L. sakey* e *L. plantarum*), com 10% de inóculo e 79,2 mL de caldo MRS para controle do processo.

3.7.3.3 Obtenção das Curvas de Crescimento

As curvas de crescimento, dos experimentos realizados com o planejamento fatorial fracionário de resolução cinco com triplicata no ponto central e com o delineamento composto central rotacional com quatro fatores e triplicata no ponto central, foram acompanhadas por aproximadamente 40 horas e 30 horas, respectivamente, para as culturas de *L. sakey* e *L.*

plantarum. A avaliação e acompanhamento do crescimento microbiano das culturas foram realizados através de medidas de absorvância (densidade ótica) em espectrofotômetro (Labstore – 700Plus - FENTO). Eram retiradas alíquotas de 2mL de cada experimento em intervalos pré-estabelecidos, de 1 hora ou 2 horas, colocadas em cubetas de quartzo, levadas ao espectrofotômetro calibrado para um comprimento de onda de 580nm e então realizada a leitura em absorvância. Com as medidas de absorvância realizadas em intervalos pré-estabelecidos, durante o tempo de aproximadamente 40 horas e 30 horas, para cada cultura avaliada, foram construídas as curvas de crescimento de cada experimento, até atingir a fase estacionária.

3.8 Parâmetros de Crescimento para *L. sakey* e *L. plantarum*.

Os Modelos de Gompertz Modificado e Logístico, conforme equações 2.4, 2.5, 2.6, e 2.7, foram ajustados aos dados experimentais e avaliados para obtenção dos parâmetros de crescimento e ajuste dos dados, utilizando o *Software* STATISTICA 6.0. A comparação dos modelos foi realizada através dos seguintes índices estatísticos: erro médio quadrático (MSE), fator bias e fator de exatidão. A partir dos dados obtidos em função do tempo, foram calculados os parâmetros microbiológicos de crescimento, duração da fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ) e aumento logarítmico da população (A). Com estes parâmetros obtidos foram realizados a avaliação e o estudo da influência dos fatores envolvidos no crescimento microbiano com os dados submetidos à análise de variância e estimativa dos efeitos.

Após a seleção e a avaliação dos fatores de maior influência no crescimento dos *L. sakey* e *L. plantarum*, novas formulações de mortadela e lingüiça defumada foram propostas, para avaliação da vida de prateleira.

3.9 Novas formulações de mortadela e de lingüiça defumada

3.9.1 Produção das novas formulações de mortadela e lingüiça defumada

Foram produzidas novas formulações de mortadela e lingüiça defumada de suíno, baseados nos resultados obtidos no item 3.8. As novas formulações de mortadela e de lingüiça defumada foram produzidas na indústria, nas mesmas condições de produção das formulações da amostra padrão, de cada produto respectivamente, avaliados nos itens 3.5 e 3.6. Foram

produzidas duas diferentes formulações para mortadela e duas diferentes formulações para lingüiça defumada, variando as concentrações de sal, de lactato e de Pfosfato, mantendo-se constante as quantidades de todos os demais ingredientes envolvidos, conforme formulação de cada produto, respectivamente. Foram produzidas também, formulações padrão de mortadela e de lingüiça defumada nas mesmas condições de produção das novas formulações proposta. As unidades de mortadela produzidas apresentavam aproximadamente 1kg em embalagens de 20cm de comprimento e 10cm de diâmetro, e a lingüiça defumada de suíno em embalagens (15cm x 20cm) com aproximadamente 500g.

3.9.2 Determinação da vida de prateleira das novas formulações de mortadela e lingüiça defumada

Unidades de mortadela e lingüiça defumada com as novas formulações e unidades da formulação padrão de mortadela e lingüiça defumada, foram armazenadas em temperaturas constantes para acompanhamento e avaliação da vida de prateleira. Unidades das novas formulações e da formulação padrão de mortadela foram armazenadas à temperatura de 30°C. Unidades das novas formulações e da formulação padrão da lingüiça defumada foram armazenadas à temperatura de 10°C. A cada três dias, uma unidade de cada produto e de cada formulação era retirada do armazenamento e preparadas para análise microbiológica de contagem de bactérias ácido lácticas, conforme procedimento descrito no item 3.4.1. Após o resultado da análise microbiológica, as amostras de mortadela e de lingüiça defumada de suíno eram submetidas à análise sensorial, através do Teste da Escala Hedônica de sete pontos, conforme descrito no item 3.6. Este procedimento foi realizado e acompanhado até que as amostras atingissem contagem microbiana de 10^7 UFC/g, o que determina o fim da vida de prateleira dos produtos, sob ponto de vista microbiológico. As novas formulações de mortadela foram submetidas às avaliações microbiológica e sensorial, e a formulação com a melhor avaliação, foi selecionada e armazenada às temperaturas de 20 e 25°C e realizado acompanhamento microbiológico, através da contagem de bactérias ácido lácticas (MRS) até atingir 10^7 UFC/g.

3.9.3 Avaliação da mortadela em temperatura isotérmica

A partir dos dados obtidos em função do tempo, das mortadelas com formulação padrão e da nova formulação selecionada, submetidas ao armazenamento em temperaturas constantes de 20, 25 e 30°C, foram calculados os parâmetros microbiológicos de crescimento, duração da fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ) e aumento logarítmico da população (A). Os modelos primários de crescimento: Gompertz Modificado, Logístico e Logístico Modificado foram utilizados para a obtenção e avaliação dos parâmetros de crescimento e ajuste dos dados, utilizando o *Software* STATISTICA 6.0. A comparação dos modelos foi realizada através dos seguintes índices estatísticos: coeficiente de determinação (R^2), erro médio quadrático (MSE), fator bias e fator de exatidão. As Equações 3.1, 3.2 e 3.3 representam os respectivos índices.

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

Onde RSS é a soma dos quadrados residuais, n o número de graus de liberdade. Quanto menor o valor do erro médio quadrático, melhor é o ajuste do modelo aos dados experimentais.

$$fator\ bias = 10^{\left(\sum \log \frac{Valor_{observado}}{Valor_{predito}}}{n}\right)} \quad (3.2)$$

O fator bias é uma estimativa da diferença média entre os valores observados e preditos, considerado um desvio relativo médio.

Se o valor do fator bias é igual 1: resposta predita = observada;

Se o valor do fator bias maior que 1: resposta predita é maior que a observada;

Se o valor do fator bias menor que 1: resposta predita é menor que a observada.

$$fator\ de\ exatidão = 10^{\left(\frac{|\log(Valor_{observado}/Valor_{predito})|}{n}\right)} \quad (3.3)$$

O fator de exatidão é uma medida para a diferença média absoluta entre os valores preditos e observados. Quanto maior o valor do fator de exatidão, menor será a exatidão da estimativa da média.

O quadrado do coeficiente de correlação (r) é chamado de **coeficiente de determinação** ou simplesmente R^2 . É uma medida da proporção da variabilidade em uma variável que é explicada pela variabilidade da outra.

3.9.4 Avaliação da mortadela em armazenamento não isotérmico

A partir da avaliação microbiológica das novas formulações da mortadela armazenada em temperatura constante, foi selecionada a formulação que apresentou maior expectativa de vida de prateleira, levando em consideração também o resultado da análise sensorial. Com unidades da formulação da mortadela selecionada e da mortadela com a formulação padrão, foi realizado o estudo da vida de prateleira, em armazenamento não isotérmico (dinâmica). As amostras foram mantidas em estufa BOD reguladas a temperatura de 20°C por 12 horas, em seguida levadas para outra estufa BOD regulada a temperatura de 30°C e mantidas por mais 12 horas, sucessivamente, por noventa dias, simulando o dia e a noite.

O acompanhamento da vida de prateleira foi realizado através de contagem microbiana de bactérias ácido lácticas (MRS), inicialmente a cada dia, em seguida a cada dois dias e finalmente a cada três dias, durante 90 dias.

3.10 Modelagem do crescimento microbiano em armazenamento não isotérmico

Os parâmetros de crescimento foram obtidos com Modelo Logístico Modificado, conforme descrito no item 3.9.3 nas temperaturas de armazenamento isotérmica, 20, 25 e 30°C. A partir destes dados obtidos com modelo primário, os parâmetros de crescimento foram descritos por modelos secundários, através de equações polinomiais e exponenciais em função da temperatura.

O perfil de temperatura para as amostras da mortadela armazenada em temperatura dinâmica, foi descrito conforme Equações 3.4, 3.5 e 3.6.

A equação empírica de transferência de calor é dada pela equação 3.4

$$\log(T_1 - T) = \frac{1}{f_h} \cdot t + \log(j_h(T_1 - T_0)) \quad 3.4$$

onde:

T_1 = temperatura do equipamento utilizado para o armazenamento dos produtos (C);

T_0 = temperatura inicial do produto avaliado;

T = temperatura no centro do produto avaliado.

Sendo que:

$$j_h = \frac{8}{\pi \cdot \mathfrak{J}_1 \cdot \rho_1} \quad 3.5$$

$$f_h = \frac{2,303}{\left(\frac{5,783}{a^2} + \frac{9,87}{l^2} \right)} \cdot \alpha \quad 3.6$$

Onde:

T = temperatura (°C)

T_1 = temperatura (°C)

T_0 = temperatura (°C)

t = tempo(h)

$\mathfrak{J}_1 = 0,51915$ Função de Bessel de 1ª espécie e ordem um (SPIEGEL, 1992)

$\rho_1 = 2,4048$ Primeira raiz positiva da função de Bessel de ordem zero (SPIEGEL, 1992)

α = difusividade térmica ($2,4 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$) (CARCIOFI et al., 2002)

a = raio do produto avaliado(m)

l = comprimento do produto avaliado(m)

Com o perfil de temperatura descrito para as amostras de mortadela com a formulação padrão e com a nova formulação selecionada, foram obtidos os parâmetros de crescimento, descritos com modelos secundários, através das equações polinomiais e exponenciais em função da temperatura.

O Modelo Não Isotérmico, descrito por Corradini & Peleg (2005), e Corradini et al., (2006) foi utilizado neste trabalho para descrever o comportamento microbiano da mortadela sob variação de temperatura. O modelo proposto por Corradini & Peleg (2005) e Corradini et

al., (2006) tem por objetivo demonstrar que os modelos primários e secundários derivados de dados de crescimento a temperatura constante, podem ser usados para prever padrões de modelo de crescimento microbiano sob variação de temperatura. O modelo proposto foi descrito através das Equações 2.8, 2.9, 2.10, 2.11, 2.12, 2.13 e 2.14, que neste trabalho foi testado com dados experimentais obtidos com a mortadela, com os modelos primários e secundários derivados de dados experimentais no crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmica

Os resultados com Modelo Não isotérmico foram obtidos através do *Microsoft EXCELL* 2000 com o programa descrito no trabalho de Corradini et al., (2006), disponível em www.unix.oit.umass.edu/~aew2000/MicrobeGrowthModelA.html. Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente através dos índices: coeficiente de determinação (R^2), erro médio quadrático (MSE), fator bias e fator de exatidão.

4-RESULTADOS E DISCUSSÕES

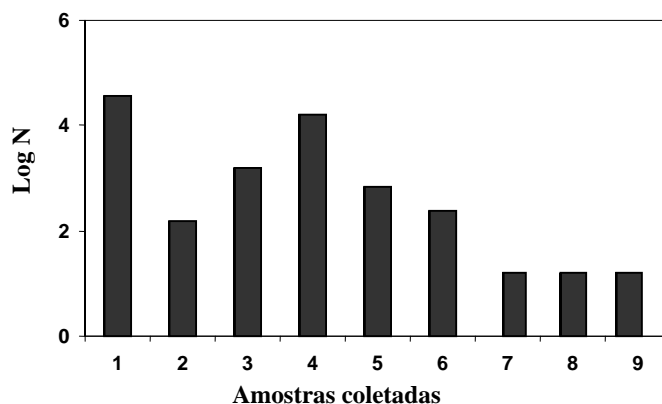
Este capítulo tem como objetivo apresentar e discutir os resultados dos experimentos de avaliação do crescimento das bactérias ácido lácticas em produtos industrializados de carne.

Inicialmente, foi realizado o levantamento microbiológico da linha de produção para o conhecimento da vida de prateleira real dos produtos para determinação dos principais pontos de contaminação e/ou recontaminação da linha. Posteriormente, foi realizado o estudo do efeito da variação da concentração de ingredientes não cárneos selecionados, na vida de prateleira dos produtos cárneos (lingüiça defumada e mortadela). Finalmente, foi realizado um estudo da vida de prateleira dos produtos cárneos industrializados, com novas formulações, armazenados em condições de temperatura constante e sob variação de temperatura (temperatura dinâmica).

4.1 Levantamento Microbiológico da Linha de Produção.

4.1.1 Linha de produção de mortadela.

Na avaliação da linha de produção da mortadela, foram coletadas nove amostras do início do processo até obtenção do produto final, conforme mostrado na Figura 3.1. Na Figura 4.1, está apresentada a contagem total das amostras coletadas (ingredientes não cárneos e ingredientes cárneos) na linha de produção da mortadela para o levantamento microbiológico.



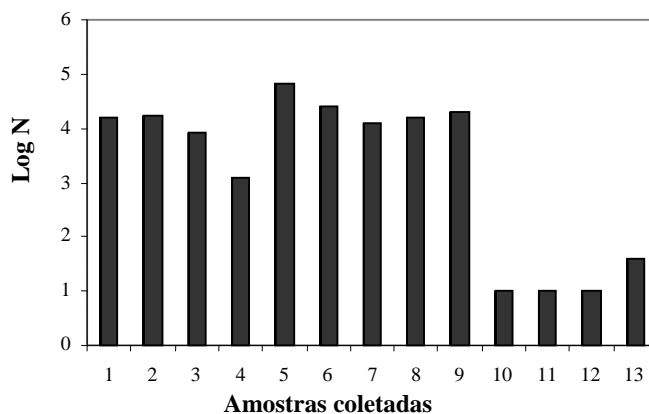
1, 2, 3, 4, 5 = ingredientes cárneos e não cárneos; 6 = após trituração; 7 = após cozimento; 8 = após resfriamento; 9 = armazenamento

Figura 4.1 Contagem total (PCA) das amostras (ingredientes não cárneos e ingredientes cárneos) coletadas na linha de produção da mortadela.

Foram selecionadas 5 amostras das matérias-primas envolvidas no processo que teriam maior influência na qualidade final do produto (amostras 1, 2, 3, 4 e 5). Verificou-se que estas apresentaram diferentes graus de contaminação, assim como, as amostras das diferentes etapas do processo. Após a trituração, com a homogeneização das matérias-primas envolvidas e os aditivos adicionados, a contagem foi aproximadamente 10^3 UFC/g. Após o cozimento, houve uma queda de aproximadamente dois ciclos logarítmicos em relação à trituração, e permaneceu constante até a expedição. O cozimento foi o único fator que contribuiu na redução da população microbiana, na avaliação da mortadela.

4.1.2 Linha de produção da lingüiça defumada de suíno.

Na avaliação da linha de produção da lingüiça defumada de suíno, foram coletadas 13 amostras do início do processo até obtenção do produto final, conforme Figura 3.2. Na Figura 4.2, está apresentado contagem total das amostras coletadas (ingredientes não cárneos e ingredientes cárneos) na linha de produção da lingüiça defumada para o levantamento microbiológico.



1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 = ingredientes cárneos e não cárneos; 8 = após homogeneização; 9 = após embutimento; 10 = após cozimento; 11 = após refriamento; 12 = após descanso; 13 = armazenamento

Figura 4.2 Contagem total (PCA) das amostras (ingredientes não cárneos e ingredientes cárneos) coletadas na linha de produção da lingüiça defumada.

Na avaliação das matérias-primas envolvidas na produção, todas as amostras selecionadas (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) apresentam uma contaminação total elevada, mas a amostra cinco se destaca, com a maior carga microbiana. Observa-se que as amostras de diferentes

etapas do processo, assim como as amostras das matérias-primas selecionadas (1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7) envolvidas na produção, apresentam grau de contaminação variável.

A carga microbiana durante o processo permaneceu praticamente constante, até a etapa de embutimento. Após o cozimento e a defumação, a carga microbiana se reduziu drasticamente, aproximadamente quatro ciclos logarítmicos, e se manteve constante até o descanso. Depois de embalado, o produto apresentou um aumento de menos de um ciclo logarítmico na carga microbiana.

Com o objetivo de avaliar a vida de prateleira dos produtos, amostras de mortadela e lingüiça defumada, do mesmo lote que foi feito o acompanhamento microbiológico, foram coletadas e incubada nas temperaturas de 20 e 30°C, e 5 e 10°C, respectivamente. A temperatura máxima de armazenamento indicada pela indústria é de 25 e 8°C para a mortadela e a lingüiça defumada, respectivamente.

4.2 Vida de prateleira da mortadela e da lingüiça defumada de suíno

Os produtos cárneos avaliados saíram da indústria em boas condições microbiológicas. O grande problema é o abuso de temperatura durante a vida de prateleira, desde a saída dos produtos da indústria, até chegar ao consumidor, seja na distribuição, no armazenamento ou na exposição para venda, que podem provocar alterações nos alimentos. Segundo De Martinis et al., (2002), a multiplicação ou sobrevivência de microrganismos patógenos ou deteriorantes em alimentos é determinada por fatores intrínsecos (pH, sal, conservadores, fatores antimicrobianos naturais) e extrínsecos (período e temperatura de armazenamento, atmosfera da embalagem) que podem atuar como barreiras para multiplicação de microrganismo. Conforme Hugas (1998), as carnes são altamente sensíveis à deterioração microbiana devido às suas propriedades como atividade de água, pH e nutrientes. Nas carnes, as bactérias ácido lácticas constituem uma parte da flora inicial que se desenvolve facilmente após o seu processamento.

As unidades de mortadela e lingüiça defumada foram armazenadas em duas diferentes temperaturas, conforme Tabela 3.1, e foram avaliadas através da contagem padrão (PCA) e contagem de bactérias ácido lácticas (MRS). Na contagem de BAL o plaqueamento foi realizado com dupla camada de MRS ágar.

4.2.1 Avaliação microbiológica da mortadela armazenada às temperaturas de 20°C e 30°C

As amostras retiradas a cada cinco dias do armazenamento a 20°C e as amostras retiradas a cada três dias do armazenamento a 30°C, tiveram a vida de prateleira avaliada durante sessenta dias, que é a vida de prateleira proposta para este produto. A Figura 4.3 representa a contagem padrão (PCA) durante a vida de prateleira da mortadela a 20°C e 30°C.

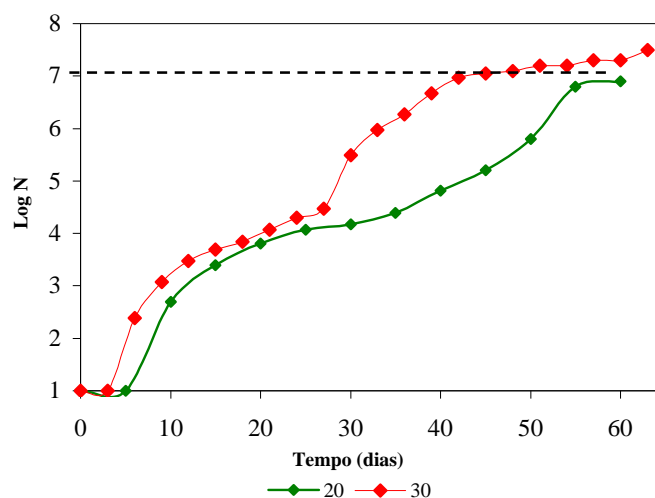


Figura 4.3 Contagem padrão (PCA) das amostras de mortadela armazenada às temperaturas de 20°C (A20) e 30°C (A30).

Como observada na Figura 4.3 a mortadela armazenada a 20°C apresentou fase lag (cinco dias) muito próxima a do produto armazenado a 30°C (três dias), e nos primeiros 25 dias a contagem microbiana dos produtos avaliados nas diferentes temperaturas de armazenamento, ficou muito próxima. Mas, a partir 30° dia para os produtos armazenados a 30°C, a contagem microbiana evoluiu rapidamente, atingindo 10^7 UFC/g com 40 dias, enquanto que, os produtos armazenados a 20°C só atingiram contagem microbiana próxima de 10^7 UFC/g em 55 dias. Isso demonstra que a temperatura de armazenamento é determinante na preservação da vida de prateleira dos produtos cárneos. Conforme indicado pela indústria a vida de prateleira da mortadela é de 60 dias armazenada a temperatura ambiente.

Foi determinada também a contagem de bactérias ácido lácticas nas amostras de mortadela, nas mesmas condições anteriores. Na Figura 4.4 está apresentada a contagem de bactérias ácido lácticas da mortadela armazenada às temperaturas de 20°C e 30°C.

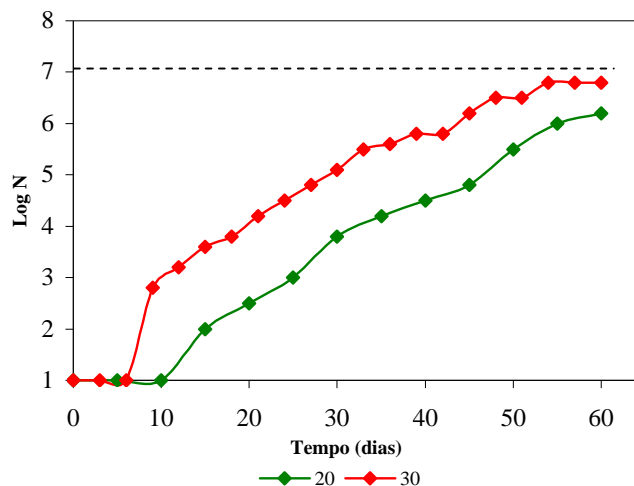


Figura 4.4 Contagem de bactérias ácido lácticas (MRS) das amostras de mortadela armazenada às temperaturas de 20°C (A20) e 30°C.(A30).

Pode-se observar na Figura 4.4 que a mortadela armazenada a 20°C apresentou fase lag (dez dias) maior que a armazenada a 30°C (seis dias), e que a contagem de bactérias ácido lácticas apresentou comportamento diferente desde o início da vida de prateleira. O produto armazenado a 30°C atingiu a contagem microbiana 10^6 UFC/g, com 45 dias, enquanto que o produto armazenado a 20°C atingiu a mesma contagem com 60 dias de armazenamento. A temperatura de armazenamento influenciou na vida de prateleira do produto avaliado, pois o aumento das bactérias ácido lácticas pode causar danos aos produtos cárneos, modificando suas propriedades sensoriais e aspecto geral provocando a deterioração do produto, levando à rejeição pelo consumidor.

4.2.2 Análise sensorial da mortadela armazenada às temperaturas de 20°C e 30°C.

Após a obtenção dos resultados da avaliação microbiológica realizada durante o armazenamento da mortadela, e estes se encontrando dentro de padrões estabelecidos de qualidade, as amostras foram avaliadas por análise sensorial. Dois testes foram utilizados: Teste da Escala Hedônica de 7 pontos e Teste Duo Trio.

4.2.2.1 Teste da Escala Hedônica de sete pontos

O Teste da Escala Hedônica de 7 pontos, com 4 atributos avaliados (sabor, textura, aroma, cor), com as amostras de mortadela, foi realizado semanalmente por 40 julgadores e

acompanhado até 49º dia (sétima semana) de armazenamento a temperatura de 20°C e até 35º dia (quinta semana) de armazenamento a temperatura de 30°C. Após estes períodos, os produtos apresentavam contagens microbianas próxima de 10^7 UFC/g e sinais de deterioração, logo, a análise sensorial foi encerrada. A amostra padrão foi produzida e armazenada na indústria na semana na análise sensorial e levada para o laboratório apenas no dia da análise.

Foram calculados a média e o desvio padrão de todas as amostras de mortadela, em relação aos atributos avaliados. Na Tabela 4.1, estão apresentadas as médias das amostras avaliadas no teste da Escala Hedônica com seus respectivos atributos e a Diferença Mínima Significativa (D. M. S.).

Tabela 4.1 Teste de Escala Hedônica de sete pontos da mortadela.

Amostra	* Média dos julgamentos dos atributos			
	Textura	Cor	Sabor	Aroma
Padrão	5,7± 0,7 ^a	5,9±0,8 ^a	6,2±0,7 ^a	5,6±0,9 ^a
A20	5,6 ±1,1 ^a	5,8±0,7 ^a	4,9±1,4 ^b	5,1±1,2 ^b
A30	5,2±1,1 ^a	5,4±0,8 ^a	4,3±1,3 ^c	5,1±1,1 ^b
Valor p	0,054	0,058	7,01.10 ⁻¹⁰	0,010
DMS**	0,45	0,38	0,44	0,39

*Média de 40 julgadores Escala Hedônica: (7) gostei muitíssimo; (6) gostei muito; (5) gostei regularmente; (4) nem gostei nem desgostei; (3) desgostei regularmente; (2) desgostei muito; (1) desgostei muitíssimo.

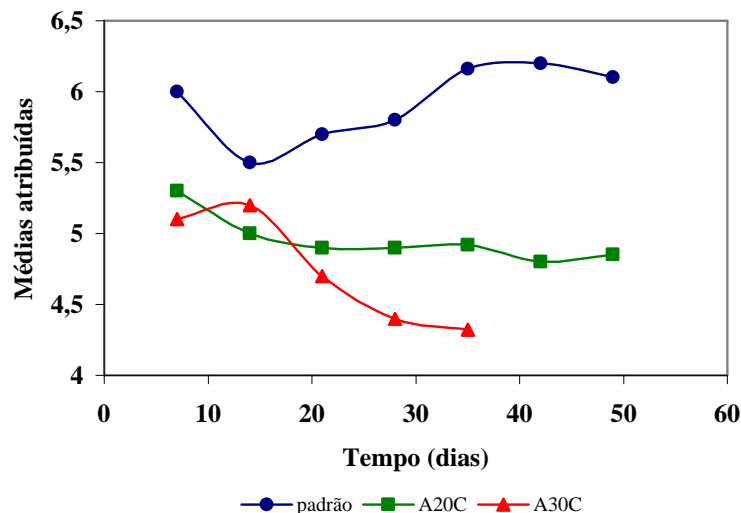
** D. M. S. Diferença Mínima Significativa pelo teste de médias de Tukey, ao nível de 5%.

A20 = amostras armazenadas a 20°C e A30 = amostras armazenadas a 30°C

^{a,b,c} Letras iguais nas colunas (médias dos atributos de cada amostras) não apresentam diferenças entre si

As médias obtidas pelas amostras de mortadela, em relação aos atributos avaliados, não apresentaram valores muito altos, variando entre “*nem gostei nem desgostei*” até “*gostei muito*”. Após análise estatística dos dados, observou-se que não houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade, quanto aos atributos de textura e cor, devido ao valor de $p > 0,05$. Conforme Teste de Tukey, quanto aos atributos sabor e aroma, verificou-se que houve diferença significativa entre as amostras ao nível de 5%, em relação ao sabor e que todas as amostras apresentaram diferença significativa entre si (Padrão, A20 e A30). Sobre o aroma, as amostras A20 e A30 apresentaram diferença significativa em relação à amostra Padrão, mas não apresentaram diferença significativa entre si pois a diferença das médias entre as amostras foi menor que D.M.S.

As médias atribuídas às amostras de mortadela pelos julgadores, em relação ao sabor e aroma foram significativas, na avaliação dos dois outros atributos, textura e cor, houve dificuldade dos julgadores para detectarem as diferenças. As médias atribuídas às amostras de mortadela em relação ao sabor, conforme Tabela 4, estão apresentadas na Figura 4.5.



Figuras 4.5 Médias atribuídas às amostras de mortadela em relação ao sabor.

As amostras armazenadas a 30°C, a partir da segunda semana, apresentaram sabor inferior às amostras armazenadas a 20°C, diminuindo assim média atribuída pelos julgadores com aumento da vida de prateleira. As amostras armazenadas a 20°C apresentaram uma nota constante durante a vida de prateleira, apesar de mais baixa que a amostra padrão, não variou durante o tempo avaliado. A amostra padrão manteve as avaliações dos atributos sempre superiores, comparadas com as amostras armazenadas a 20°C e as amostras armazenadas a 30°C.

A temperatura de armazenamento promoveu diferenças nas amostras avaliadas que foram percebidas pelos julgadores ao longo do tempo, o que pode ser observado através da Figura 4.6 com o índice de aceitabilidade da mortadela durante o período de 7 semanas de armazenamento.

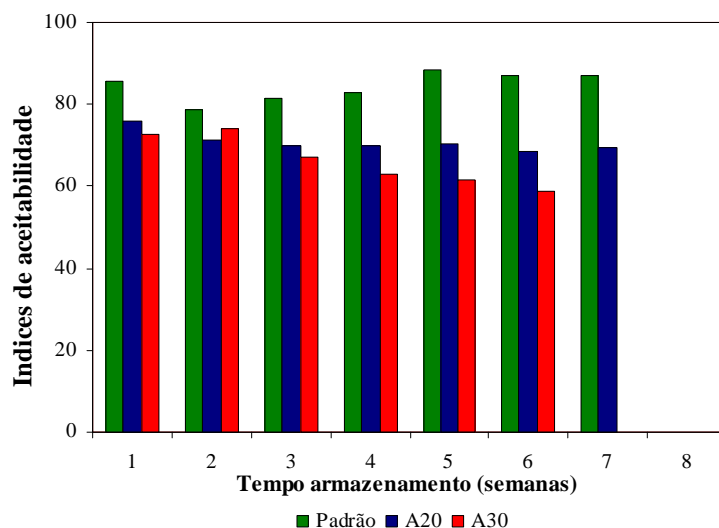


Figura 4.6 Índice de aceitabilidade das amostras de mortadela padrão, A20 (armazenada à temperatura de 20°C) e A30 (armazenada à temperatura de 30°C), durante 7 semanas.

Este resultado demonstrou que a aceitabilidade da mortadela diminuiu durante a vida de prateleira e a diferença entre as amostras da mortadela padrão e as amostras de mortadela armazenadas em diferentes temperaturas pode ser percebida pelos consumidores, mesmo em condições adequadas de armazenamento. Observou-se, com o resultado da análise sensorial, que as amostras de mortadela avaliadas sofreram modificações perceptíveis pelo consumidor, com o tempo e com a temperatura de armazenamento.

No atributo aroma os julgadores também detectaram diferenças em relação a amostra padrão, mas com menor intensidade. Na Figura 4.7 apresentam-se as médias atribuídas às amostras de mortadela em relação ao atributo aroma, conforme Tabela 4.1.

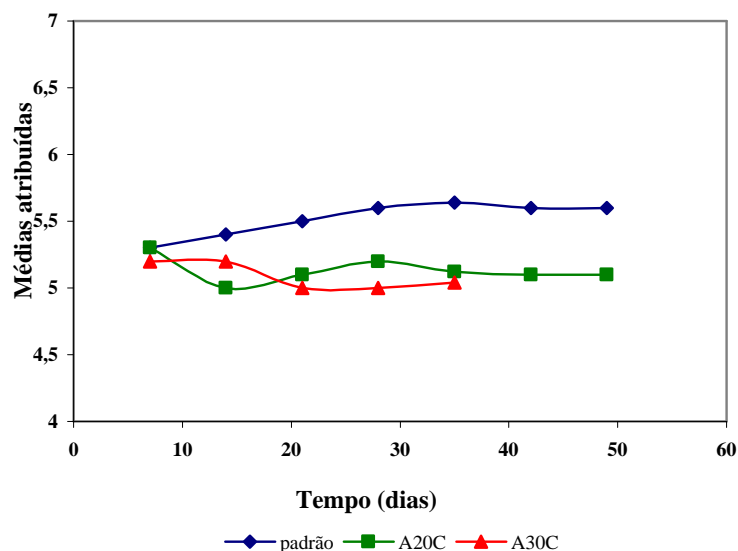


Figura 4.7 Médias atribuídas às amostras de mortadela padrão, A20C (armazenada à temperatura de 20°C) e A30C (armazenada à temperatura de 30°C) em relação ao aroma

Em relação ao aroma todas as amostras de mortadela avaliadas apresentaram médias muito próximas, mas conforme Teste de Tukey, as amostras armazenadas às temperaturas de 20°C e 30°C, apresentaram diferença nas médias entre as amostras maiores que a D.M.S. quando comparadas com a amostra padrão, logo houve diferença significativa entre as amostras e a amostra padrão. Entre as amostras armazenadas às temperaturas de 20°C e 30°C, não houve diferença significativa. Os outros dois atributos avaliados, a consistência e a cor não apresentaram diferença significativa entre as amostras, conforme análise estatística.

4.2.2.2 Teste Duo Trio

O Teste Duo Trio foi realizado pelo período de 42 dias, pelo grupo treinado de julgadores, com as amostras de mortadela armazenadas a 20°C e 28 dias com as amostras armazenadas a 30°C. Na Figura 4.8, está apresentado o resultado do teste Duo Trio das avaliações realizadas com a amostra de mortadela armazenada a 20°C.

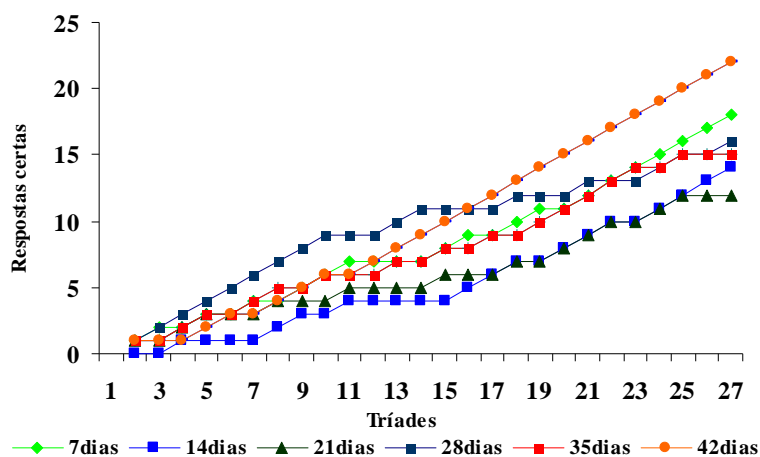


Figura 4.8 Teste Duo Trio das amostras de mortadela armazenadas à temperatura de 20°C.

Com as amostras armazenadas a 20°C, a diferença no sabor só foi percebida pelos julgadores após 42 dias, quando 22 avaliações certas foram identificadas. Conforme tabela pareado monocaudal diferença (MONTEIRO, 1984), o número de respostas certas corresponde a um nível de significância de 5%.

Na Figura 4.9 está o resultado do Teste Duo Trio das amostras armazenadas a 30°C.

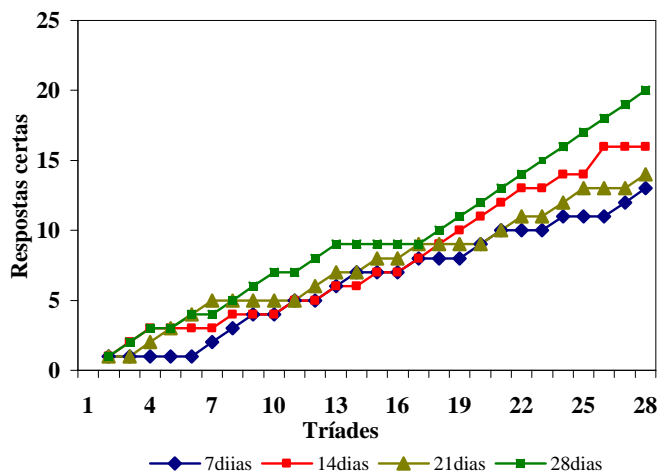


Figura 4.9 Teste Duo Trio das amostras de mortadela armazenadas à temperatura de 30°C

Nas amostras armazenadas a 30°C, a diferença no sabor foi percebida após o período de 28 dias, quando 20 avaliações corretas foram identificadas, conforme tabela pareado monocaudal diferença (MONTEIRO, 1984), o número de respostas corretas corresponde a

um nível de significância de 5%. Novamente, a temperatura e o período de armazenamento influenciaram no sabor do produto avaliado. O teste Duo Trio mostrou que, a diferença foi percebida pelos julgadores na amostra armazenada a 30°C em um período de 14 dias antes do que o observado para o produto armazenado a 20 °C.

4.2.3 Avaliação microbiológica da lingüiça defumada de suíno armazenada às temperaturas de 5°C e 10°C.

As amostras retiradas a cada três dias do armazenamento a 10°C e as amostras retiradas a cada cinco dias do armazenamento a 5°C, tiveram a vida de prateleira avaliada durante noventa dias, que é a vida de prateleira proposta para este produto. Os resultados obtidos para contagem padrão (PCA) foram avaliados durante a vida de prateleira da lingüiça defumada e estão apresentados na Figura 4.10.

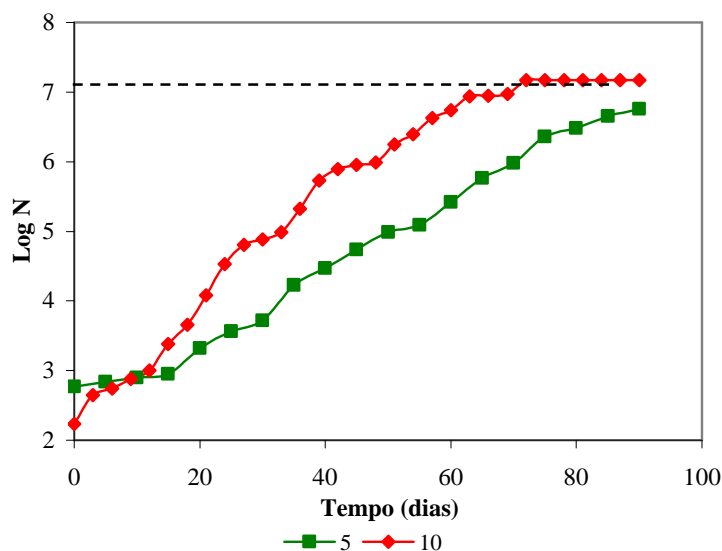


Figura 4.10 Contagem padrão (PCA) das amostras de lingüiça defumada armazenada às temperaturas de 10°C e 5°C .

As amostras de lingüiça defumada, armazenadas às temperaturas de 10°C e 5°C, apresentaram fase lag de 9 e 15 dias, respectivamente. O crescimento microbiano aumentou rapidamente com as amostras armazenadas à temperatura mais alta, atingindo a contagem 10^7 UFC/g, em aproximadamente 45 dias. As amostras armazenadas à temperatura mais baixa (5°C), apresentaram crescimento microbiano mais lento, atingindo a contagem microbiana de

10^6 UFC/g com 90 dias de armazenamento, ou seja, não alcançou a contagem 10^7 UFC/g, o que indicaria o final da vida de prateleira, sob ponto de vista microbiológico.

As bactérias ácido lácticas foram também avaliadas durante a vida de prateleira dos produtos armazenados nas duas temperaturas propostas. Na Tabela 4.11, estão apresentadas as contagens de bactérias ácido lácticas das amostras de lingüiça defumada armazenadas às temperaturas de 10°C e de 5°C .

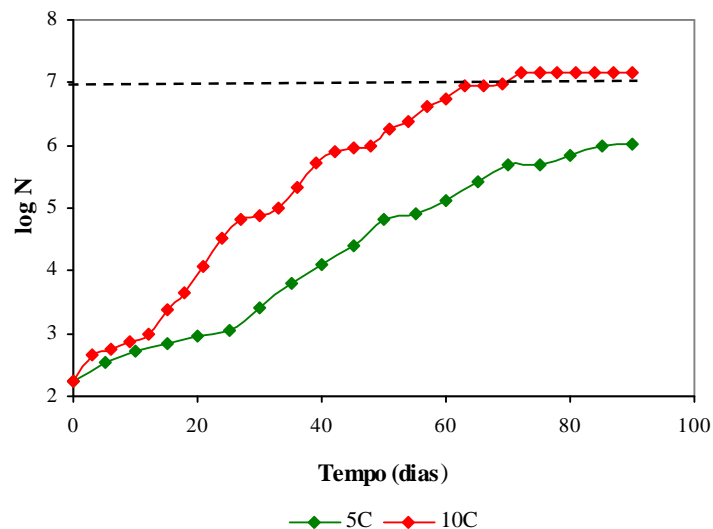


Figura 4.11 Contagem de bactérias ácido lácticas (MRS) das amostras de lingüiça defumada armazenadas às temperaturas de 10°C e 5°C .

O crescimento das bactérias ácido lácticas das amostras de lingüiça defumada armazenada à temperatura de 10°C , atingiu a contagem 10^7 UFC/g em aproximadamente 60 dias de armazenamento, enquanto que a temperatura mais baixa (5°C), as amostras avaliadas em 90 dias, proposto como vida de prateleira, atingiu contagem de bactérias ácido lácticas de 10^6 UFC/g. O crescimento das bactérias ácido lácticas é altamente afetado pela temperatura e tempo de armazenamento, provocando alterações nos produtos, levando à deterioração dos mesmos.

4.2.4 Análise Sensorial da lingüiça defumada de suíno armazenada às temperaturas de 10°C e 5°C.

4.2.4.1 Teste da Escala Hedônica de sete pontos

O Teste da Escala Hedônica de sete pontos, com quatro atributos avaliados (sabor, textura, aroma, cor), com as amostras de lingüiça defumada de suíno, foi realizado semanalmente por 40 julgadores e acompanhado até o 35º dia de armazenamento para o produto armazenado a 10°C, e até 90º dia para o produto armazenado a 5°C. Após estes períodos, as amostras de lingüiça defumada já apresentavam sinais de deterioração e a análise sensorial foi encerrada.

Foram calculadas as médias de todas as amostras de lingüiça defumada de suíno em relação aos atributos avaliados e estão apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Teste da Escala Hedônica de sete pontos da lingüiça defumada.

Amostra	* Média dos julgamentos dos atributos			
	Textura	Cor	Sabor	Aroma
Padrão	5,5±0,9 ^a	6,1±0,8 ^a	6,1±0,6 ^a	5,8±1,1 ^a
A5°C	5,9 ±1,3 ^b	5,6±1,1 ^b	5,1±1,3 ^b	5,2±0,9 ^b
A10°C	4,1±1,5 ^c	5,3±1,1 ^b	4,4±1,4 ^c	5,3±1,2 ^b
Valor p	1,88.10 ⁻⁹	1,96.10 ⁻⁵	6,1.10 ⁻¹⁰	1,3.10 ⁻³
DMS**	0,42	0,35	0,42	0,49

*Média de 40 julgadores Escala Hedônica: (7) gostei muitíssimo; (6) gostei muito; (5) gostei regularmente; (4) nem gostei nem desgostei; (3) desgostei regularmente; (2) desgostei muito; (1) desgostei muitíssimo.

** D. M. S. Diferença Mínima Significativa pelo Teste de Médias de Tukey, ao nível de 5%.

A10°C = amostra armazenada a 10°C e A5°C = amostra armazenada a 5°C.

^{a,b,c}Letras iguais nas colunas (médias dos atributos de cada amostras) não apresentam diferenças entre si

Após análise estatística dos dados, observou-se que houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade, em relação a todos os atributos (textura, cor, sabor e aroma), pois o valor de $p < 0,05$. Quanto aos atributos sabor e textura verificou-se que, houve diferença significativa entre as amostras ao nível de 5%, pois todas (Padrão, A5°C e A10°C) apresentaram diferença entre as médias das amostras maior que a D.M.S. Quanto aos atributos cor e aroma, as amostras A10°C e A5°C apresentaram diferença significativa em relação à

amostra Padrão, mas não apresentaram diferença significativa entre si (A10°C e A5°C), conforme Teste de Tukey.

No teste da Escala Hedônica de sete pontos, das amostras de lingüiça defumada, o tempo e temperatura influenciaram na média dos atributos avaliados, conforme ficha de avaliação no anexo 1. A média dos atributos avaliados da amostra padrão (Padrão), amostra armazenada 5°C (A5°C) e amostra armazenada a 10°C (A10°C), estão apresentadas na Figura 4.12.

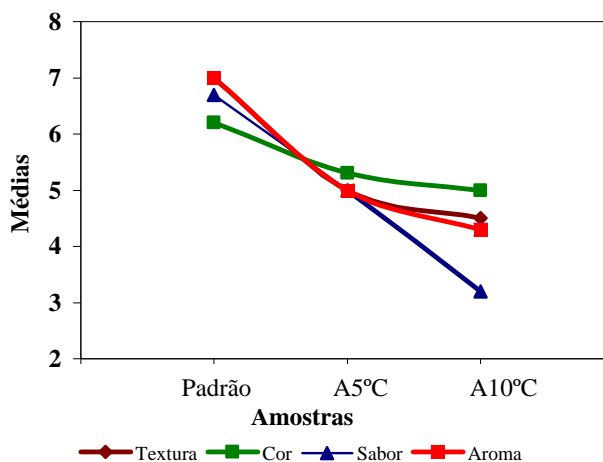


Figura 4.12 Média dos atributos avaliados nas amostras de lingüiça defumada: padrão , A5°C (armazenada à temperatura de 5°C) e A10°C (armazenada à temperatura de 10°C).

O sabor foi o atributo que mais se destacou na avaliação dos julgadores, passando de “gostei muito” a “nem gostei e nem desgostei”, entre as amostras avaliadas.

Na Figura 4.13, pode ser visualizado o índice de aceitabilidade das amostras de lingüiça defumada, determinado ao longo da vida de prateleira.

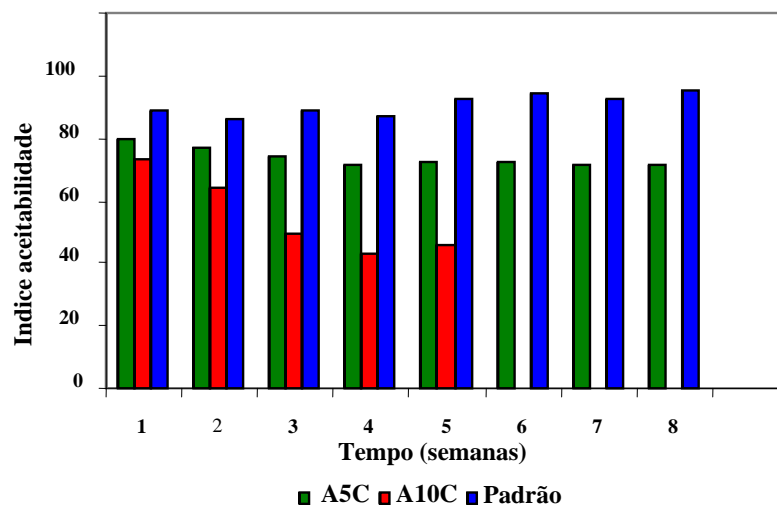


Figura 4.13 Índice de aceitabilidade das amostras de lingüiça defumada: amostra padrão, A5C (armazenada à temperatura de 5°C) e A10C (armazenada à temperatura de 10°C), durante 8 semanas de armazenamento.

Nas amostras de lingüiça defumada armazenadas a 10°C, a análise sensorial foi interrompida após 35 dias, devido à alta contagem microbiana a partir da sexta semana e, como pode ser visualizado na Figura 4.13, o índice de aceitabilidade nestas condições diminuiu com o tempo e se manteve sempre abaixo, comparado com as outras amostras avaliadas (padrão e A5). As amostras de lingüiça defumada armazenadas à temperatura 5°C apresentaram um índice de aceitabilidade com variação muito pequena ao longo de tempo, de 79,4 a 71,4 aproximadamente. Como as análises são realizadas comparativamente, o produto padrão obteve o maior valor, chegando ao final com o índice de aceitabilidade de aproximadamente 96,0. Este resultado demonstrou que a aceitabilidade da lingüiça defumada diminuiu durante a vida de prateleira e a diferença entre a amostra padrão e as amostras armazenadas em diferentes temperaturas podem ser percebidas pelos consumidores, mesmo em condições adequadas de armazenamento.

4.2.4.2 Teste Duo Trio

No Teste Duo Trio, o grupo treinado detectou a diferença no sabor da lingüiça defumada armazenada à temperatura de 5°C após 42 dias, representado na Figura 4.14. Com as amostras de lingüiça defumada armazenadas a 5°C, a diferença no sabor só foi percebida pelos julgadores após 42 dias, quando 23 avaliações certas foram identificadas. Conforme

tabela pareado monocaudal diferença (MONTEIRO,1984), o número de respostas certas corresponde a um nível de significância de 1%.

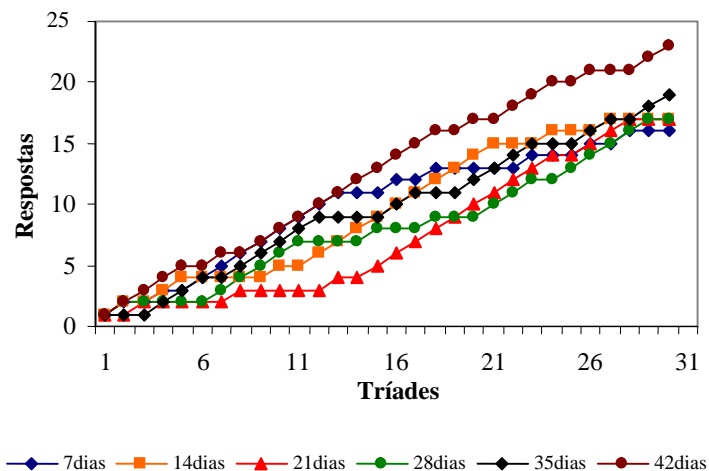


Figura 4.14 Teste Duo Trio das amostras de lingüiça defumada armazenadas à temperatura de 5°C.

Nas amostras de lingüiça defumada armazenadas a 10°C, o grupo treinado percebeu a diferença com apenas 21 dias, como apresentado na Figura 4.15. A diferença no sabor foi percebida pelos julgadores após 21 dias, quando 22 avaliações certas foram identificadas. Conforme tabela pareado monocaudal diferença (MONTEIRO,1984), o número de respostas certas corresponde a um nível de significância de 1%.

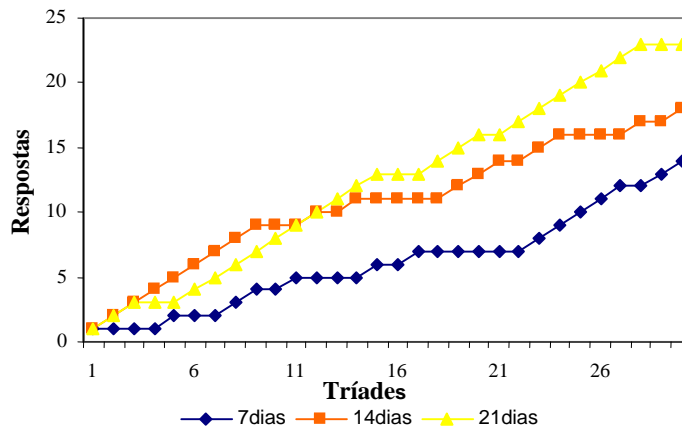


Figura 4.15 Teste Duo Trio das amostras de lingüiça defumada armazenadas à temperatura de 10°C.

A temperatura de armazenamento influenciou nas características sensoriais da lingüiça defumada, que foi percebida pelos julgadores. Quanto maior a temperatura, menor era o tempo para que os avaliadores percebessem a diferença no sabor dos produtos avaliados, demonstrando assim, que a temperatura é fundamental nas alterações das propriedades sensoriais dos produtos, em função do crescimento das bactérias ácido lácticas.

4.3 Avaliação do crescimento de *L. sakey* e de *L. plantarum* em caldo MRS.

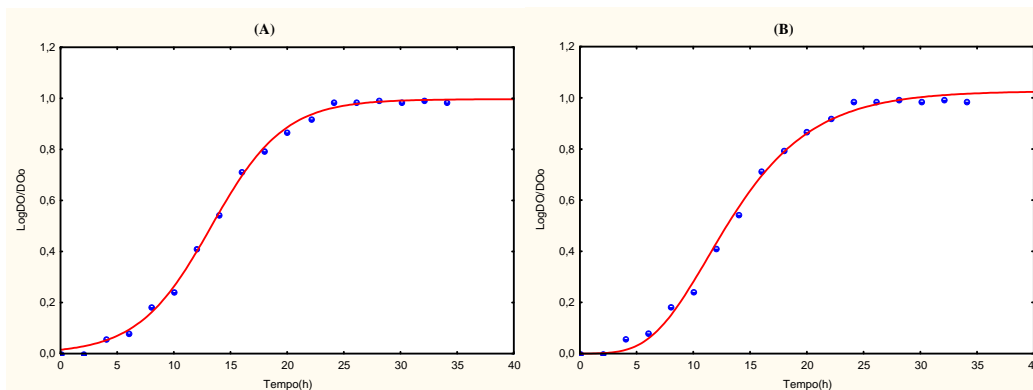
Este estudo foi realizado para avaliação da influência dos diferentes ingredientes na formulação dos produtos cárneos sobre o crescimento das bactérias ácido lácticas. Foram selecionados para este estudo as bactérias lácticas *L. plantarum* e *L. sakey* devido à sua importância na deterioração de produtos cárneos industrializados. Foram avaliados os seguintes ingredientes presentes nas formulações da mortadela e lingüiça defumada: sal, lactato, polifosfato, alho e o nitrito/nitrato de sódio em concentrações variadas, por serem componentes de efeito reconhecido sobre a atividade microbiana em produtos cárneos, com objetivo de selecionar aqueles que apresentavam maior influência no crescimento microbiano (SALLAM et al., 2004; CASSENS, 1997; NEUMEYER et al., 1997).

A avaliação do crescimento em caldo MRS foi realizada separadamente para *L. sakey* e *L. plantarum*, através de um planejamento fatorial fracionado de resolução cinco, com triplicata no ponto central, apresentado na Tabela 3.2. Após a avaliação e seleção dos fatores envolvidos, um delineamento composto central rotacional foi realizado, conforme Tabela 3.5. Os experimentos foram acompanhados por medida de absorvância através das curvas de crescimento, até atingir a fase estacionária. Os modelos de Gompertz Modificado e Logístico foram ajustados aos dados experimentais para a obtenção dos parâmetros de crescimento de cada bactéria.

4.3.1 Avaliação do crescimento de *L. sakey* – Planejamento Fatorial Fracionado

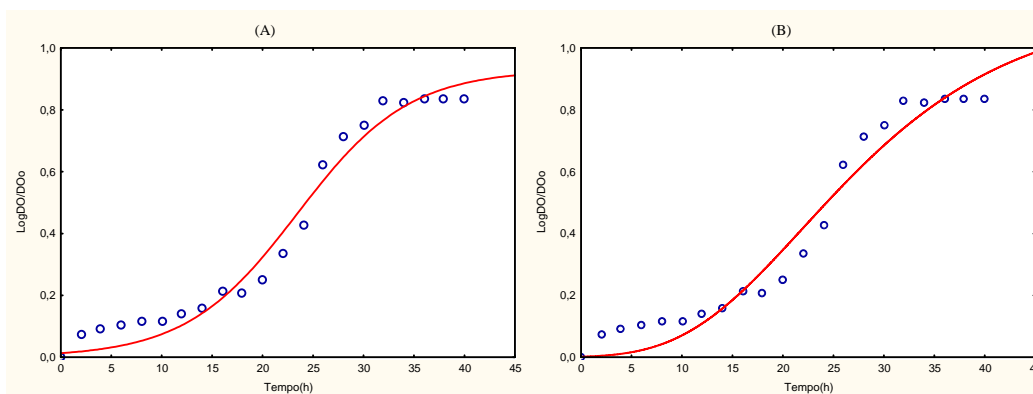
Com os 19 experimentos realizados com *L. sakey*, conforme Tabela 3.2 e os respectivos níveis descritos na Tabela 3.3, mais o experimento controle (20), foram calculados os parâmetros microbiológicos de crescimento, com o objetivo de avaliar os fatores de maior influência. Os parâmetros, velocidade máxima de crescimento (μ), aumento logarítmico da população (A) e duração da fase lag (λ) foram estimados utilizando o Modelo de Gompertz Modificado e o Modelo Logístico, através do *Software* Statistica 6.0, e neste caso se ajustando

melhor com o Modelo Logístico, conforme índices estatísticos MSE, Fator bias e Fator de exatidão. Como exemplo nas Figuras 4.16 e 4.17 estão apresentadas as curvas de crescimento dos experimentos 16 e 19 obtidas com o Modelo Logístico (A) e Modelo de Gompertz Modificado (B), realizados conforme Tabela 3.2 e 3.3.



Experimento 16: 1,7% sal; 0,1% Pfosfato; 1% lactato; 10ppm (nitri+nitra); 0,4% alho

Figura 4.16 Curva de crescimento do experimento 16 para *L. sakey*, obtida com o Modelo Logístico (A) e Modelo Gompertz Modificado (B) no planejamento fatorial fracionado.



Experimento 19: 2,5% sal; 0,3% Pfosfato; 2% lacatato; 50ppm (nitri+nitra); 0,2% alho

Figura 4.17 Curva de crescimento do experimento 19 para *L. sakey* obtida com o Modelo Logístico (A) e Modelo de Gompertz Modificado (B) no planejamento fatorial fracionado.

As curvas dos experimentos realizados com o planejamento fatorial fracionado para *L. sakey*, conforme Tabela 3.2, obtidas com o Modelo Logístico e com o Modelo de Gompertz Modificado apresentaram ajustes similares, mas a maioria dos experimentos se ajustou melhor com o Modelo Logístico, como se observa na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 Índices estatísticos para avaliação de *L. sakey* no planejamento fatorial fracionado, com os Modelos Logísticos e Gompertz Modificado.

Experimentos	M. Logístico			M. Gompertz Modificado		
	Índices Estatísticos			Índices Estatísticos		
	MSE	Fbias	Fexat	MSE	Fbias	Fexat
3	0,0012	1,1412	1,1733	0,0023	1,3991	1,4502
5	0,0030	1,5727	1,6424	0,0043	1,3044	1,3444
7	0,0011	1,0109	1,0482	0,0020	1,0433	1,0803
8	0,0010	1,1100	1,1496	0,0018	1,4822	1,5268
11	0,0102	1,4288	1,4821	0,0158	1,9364	2,0015
12	0,0040	1,1958	1,2449	0,0056	1,8020	1,8876
14	0,0025	1,0861	1,1737	0,0037	1,3578	1,4512
15	0,0055	1,4424	1,3985	0,0643	0,9645	1,1566
16	0,0054	1,2760	1,6529	0,0544	0,9865	1,7476
17	0,0021	1,2290	1,1503	0,0036	1,3789	1,4278
18	0,0029	1,1412	1,1915	0,0047	1,2287	1,2977
19	0,0013	1,0975	1,1440	0,0024	1,3136	1,3785
20	0,0273	0,9998	1,0835	0,0266	0,9982	1,0970

MSE= Erro médio quadrático; Fbias= Fator bias; Fexat= Fator de exatidão

O experimento 20 não faz parte do planejamento fatorial fracionado e foi realizado apenas para verificar o crescimento de *L. sakey* em caldo MRS, condições otimizadas (caldo MRS e 10% de inóculo), para controle do processo.

Analisando-se os índices estatísticos: erro médio quadrático, fator bias e fator de exatidão pode-se constatar que o Modelo Logístico apresentou melhor ajuste aos dados experimentais. Os valores do MSE da grande maioria dos experimentos foi menor para o Modelo Logístico do que para o Modelo de Gompertz Modificado, assim como os valores de fator bias e fator de exatidão foram mais próximos do valor 1 no Modelo Logístico. Desde modo, os parâmetros de crescimento para o planejamento fatorial fracionado para *L. sakey*, foram obtidos com o ajuste do Modelo Logístico. A Tabela 4.4 apresenta os parâmetros de crescimento dos experimentos realizados com *L. sakey* obtidos com o ajuste do Modelo Logístico.

Tabela 4.4 Parâmetros de crescimento do *L. sakey* obtidos pelo ajuste do Modelo Logístico no planejamento fatorial fracionado.

Experimento	Sal	Lact	PFosf	Nitri/nitra	Alho	A	μ	λ
1	1	1	1	1	1	0,00	0,00	40,00
2	1	1	1	-1	-1	0,00	0,00	40,00
3	1	1	-1	1	-1	0,79	0,04	12,70
4	1	1	-1	-1	1	0,00	0,00	40,00
5	1	-1	1	1	-1	1,00	0,07	20,41
6	1	-1	1	-1	1	0,00	0,00	40,00
7	1	-1	-1	1	1	0,89	0,03	9,41
8	1	-1	-1	-1	-1	0,83	0,04	13,82
9	-1	1	1	1	-1	0,00	0,00	40,00
10	-1	1	1	-1	1	0,00	0,00	40,00
11	-1	1	-1	1	1	1,61	0,10	18,15
12	-1	1	-1	-1	-1	0,84	0,04	14,91
13	-1	-1	1	1	1	0,00	0,00	40,00
14	-1	-1	1	-1	-1	1,26	0,05	13,86
15	-1	-1	-1	1	-1	1,70	0,09	2,14
16	-1	-1	-1	-1	1	0,99	0,07	6,87
17	0	0	0	0	0	0,98	0,06	16,44
18	0	0	0	0	0	1,04	0,04	12,59
19	0	0	0	0	0	0,63	0,04	11,28

A= aumento logarítmico da população; μ = velocidade máxima de crescimento (h^{-1}); λ =duração da fase lag (h).

Nos experimentos 1, 2, 4, 6, 9, 10 e 13 não ocorreu crescimento microbiano durante o período avaliado. Este fato pode ter sido devido à combinação dos níveis dos fatores avaliados, ou seja a concentração de sal, de lactato, de Pfosfato de nitrito/nitrato de sódio (nitri+nitra) e de alho. Deste modo, o aumento logarítmico da população (A) e velocidade específica máxima de crescimento (μ), foram considerados iguais a zero, durante o período de avaliação e a duração da fase lag, máxima, com o valor de 40 horas, que foi o tempo máximo dos experimentos avaliados.

Os experimentos do planejamento fatorial fracionado, avaliados com Modelo Logístico, para *L. sakey*, apresentaram baixa velocidade máxima de crescimento (μ) e, em geral, alta duração da fase lag (λ). No experimento 11 onde se observou a maior velocidade máxima de crescimento (μ), a concentração de lactato, de alho e de nitrito/nitrato de sódio se encontravam em níveis superiores, e as concentrações de sal e de Pfosfato estavam no nível mínimo. Este fato indica que a combinação destes fatores, influenciou efetivamente nos

parâmetros de crescimento, já que no experimento 1 com todos os fatores na concentração máxima, não houve crescimento. O aumento logarítmico da população (A) atingiu o maior valor no experimento 15, onde apenas a concentração de nitrito/nitrato de sódio se encontrava no nível superior, enquanto que todos os outros fatores se encontravam em níveis inferiores, mas a duração da fase lag (λ) foi baixa neste caso. Com os parâmetros de crescimento calculados foi realizada uma análise estatística para avaliar a influência de cada um dos fatores no crescimento microbiano.

Os resultados da Tabela 4.4 foram submetidos à análise de variância e estimativa dos efeitos, através do *Software* STATÍSTICA 6.0. Na Tabela 4.5 estão apresentados os fatores que influenciaram nas variáveis respostas A, μ , λ , assim como, os efeitos significativos.

Tabela 4.5 Análise da variância e estimativa dos efeitos significativos de *L. sakey* com o planejamento fatorial fracionado.

Fatores	Variável Resposta					
	A		μ		λ	
	Efeito	Valor-p	Efeito	Valor-p	Efeito	Valor-p
(1)Sal	-0,36221	0,08308	-0,02154	0,08306	7,5512	0,03014
(2)Lactato	-0,43221	0,06054	-0,02171	0,08191	19,9051	0,00451
(3)PFosfato	-0,67695	0,02606	-0,03958	0,02692	32,0320	0,00175
(4)Nitri/nitra	0,26083	0,14417	0,01558	0,14308	-5,8321	0,04905
(5)Alho	-0,36645	0,08140	-0,01722	0,12172	17,0706	0,00612
(1) por (2)	-0,05388	0,67658	-0,00371	0,63197	2,3570	0,22100
(1) por (3)	0,29771	0,11626	0,02601	0,05924	-5,9143	0,04779
(1) por (4)	0,20540	0,20671	0,01297	0,18945	-16,9917	0,00618
(1) por (5)	-0,06568	0,61541	-0,01378	0,17320	3,5443	0,11836
(2) por (3)	-0,13490	0,34983	-0,00953	0,28724	1,5233	0,37391
(2) por (4)	0,13019	0,36324	0,00931	0,29520	-5,1812	0,06097
(2) por (5)	0,36171	0,08328	0,01826	0,11034	-4,4367	0,08054
(3) por (4)	-0,32534	0,10008	-0,01112	0,23547	7,4689	0,03078
(3) por (5)	-0,20066	0,21364	-0,01402	0,16872	4,3578	0,08312
(4) por (5)	0,11839	0,39950	-0,00076	0,91971	-3,9939	0,09673

A = aumento logarítmico da população; μ = velocidade máxima de crescimento (h^{-1}); λ =duração da fase lag (h).

Os fatores e os efeitos foram considerados estaticamente significativos quando $p < 0,05$. Nas variáveis respostas, A e μ apenas o Pfosfato foi estatisticamente significativo, apresentando um efeito negativo, ou seja, o aumento da sua concentração poderia estar contribuindo para a diminuição dos valores das variáveis respostas avaliadas. Na variável λ , todos os fatores foram considerados estatisticamente significativos, além das interações entre o sal e o Pfosfato, o sal e o nitrito/nitrato, e entre o Pfosfato e o nitrito/nitrato. Na duração da

fase lag, também se observou que a concentração de nitrito mais nitrato de sódio apresentou efeito negativo, o que é considerado indesejável para esta variável resposta. As variáveis respostas foram avaliadas individualmente, em relação aos fatores estatisticamente significativos, através das curvas de nível. Na Figura 4.18 apresenta-se a variável resposta A (aumento logarítmico da população) avaliada através das curvas de nível para os fatores Sal/Pfosfato (1) e lactato/Pfosfato (2).

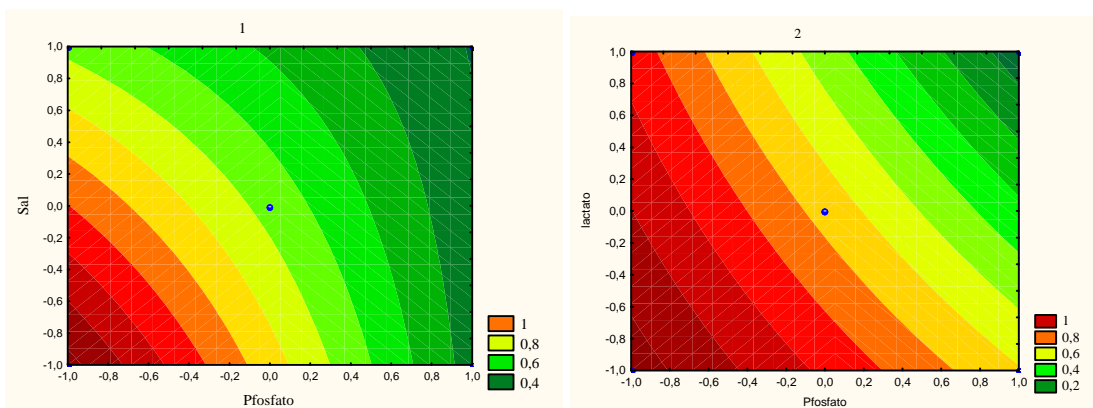


Figura 4.18 Curva de nível para variável resposta A (aumento logarítmico da população) sobre o crescimento de *L. sakey* com o planejamento fatorial fracionado, para os fatores Sal/Pfosfato (1) e lactato/Pfosfato (2).

Verifica-se na Figura 4.18 em (1), a passagem do nível inferior para o nível superior nos fatores sal e Pfosfato levam a uma diminuição no valor da variável resposta A. Observou-se que a variável resposta A, atingiu o valor mais elevado quando a concentração dos fatores sal e Pfosfato encontravam-se em níveis inferiores. Também se observa que o sal na concentração máxima avaliada provoca diminuição na variável resposta A, mas a concentração do Pfosfato nas mesmas condições provoca uma diminuição mais acentuada. Mas, avaliando-se a combinação dos dois fatores (Sal e Pfosfato) verifica-se que a concentração no nível zero de ambos poderá provocar um efeito significativo, diminuindo o valor da variável resposta A. Na Figura 4.18 em (2), observa-se que os fatores (lactato e Pfosfato), individualmente, apresentam uma influência muito pequena sobre a variável resposta A. A combinação dos dois fatores avaliados provoca uma diminuição significativa na variável resposta A, apenas em níveis superiores.

A variável μ também foi avaliada através das curvas de nível, como mostra a Figura 4.19.

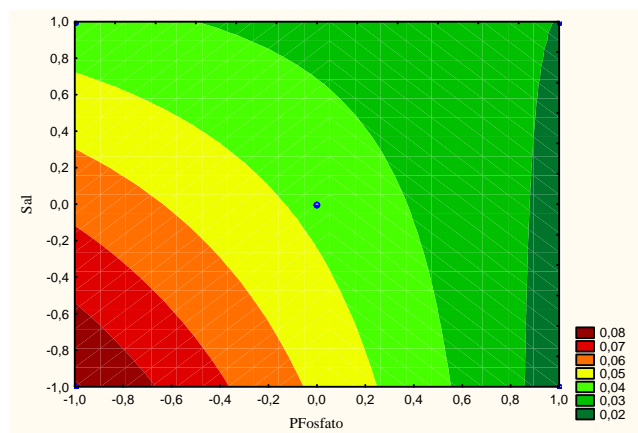


Figura 4.19 Curva de nível para variável resposta μ sobre o crescimento de *L. sakey* com o planejamento fatorial fracionado para os fatores Sal/Pfosfato.

Na Figura 4.19, analisando-se a variável resposta μ , onde apenas o Pfosfato apresentou efeito significativo ($p < 0,05$), verifica-se uma estimativa de diminuição da velocidade máxima de crescimento de 75%, quando este fator passa do nível inferior para o nível superior. Analisando os dois fatores combinados (Sal e Pfosfato), observa-se que partir do nível zero, estes fatores proporcionam uma diminuição acentuada na variável resposta μ .

Na Figura 4.20, apresenta-se a variável λ avaliada através das curvas de nível para os fatores, Sal/Pfosfato (1) e Sal/lactato (2).

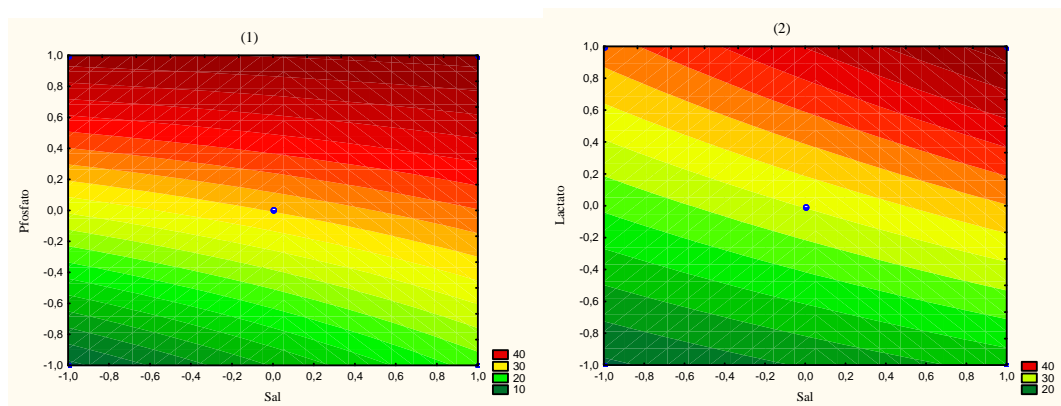


Figura 4.20 Curva de nível para variável resposta λ sobre o crescimento de *L. sakey* com o planejamento fatorial fracionado para os fatores Sal/Pfosfato (1) e Sal/lactato (2).

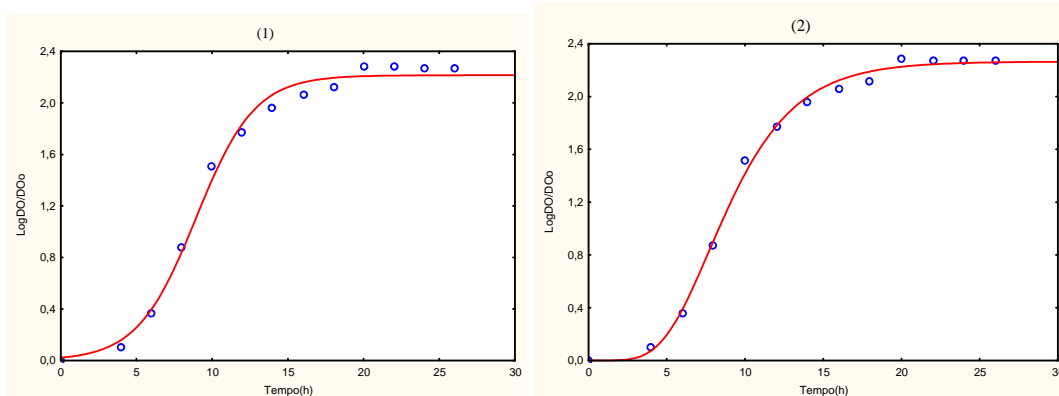
Na avaliação da variável resposta λ (duração da fase lag) foi observado que todos os fatores apresentaram efeitos significativos estatisticamente. A Figura 4.20 mostra que, em qualquer concentração de sal, a variável resposta λ se mantém sempre no mínimo. Para que ocorra um aumento no valor da variável resposta avaliada, é necessário um aumento

simultâneo da concentração dos dois fatores, sal e Pfosfato como mostra Figura 4.20 (1), ou, sal e lactato na Figura 4.20 (2).

Com o planejamento fatorial fracionado na avaliação do crescimento de *L. sakey*, foi possível observar que a variação da concentração de Pfosfato apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) sobre os três parâmetros de crescimento: A (aumento logarítmico da população), μ (velocidade máxima de crescimento) e λ (duração da fase lag). Observou-se ainda que, a variação da concentração de nitrito/nitrato de sódio não foi significativa para as variáveis respostas A e μ , mas apresentou um efeito negativo sobre a variável λ . Ou seja, o aumento da concentração deste sal levou a uma diminuição da duração da fase lag, que é um resultado indesejável. Este componente, portanto, deverá permanecer no valor mínimo de concentração, garantindo assim suas funções específicas, principalmente de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, especialmente o *Clostridium botulinum* (PARDI et al.,1996; JAY,2005).

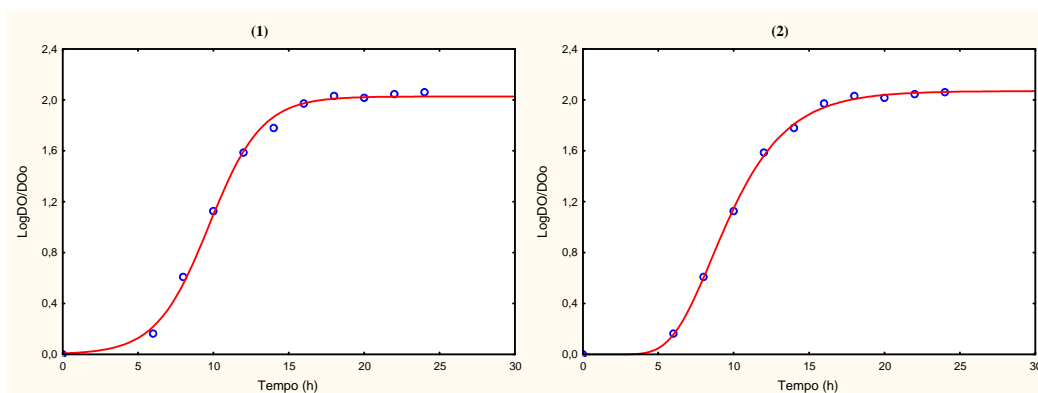
4.3.2 Avaliação do crescimento de *L. plantarum* – Planejamento Fatorial Fracionado

Foram realizados os mesmos experimentos, nas mesmas condições anteriores, com o *L. plantarum*, conforme Tabela 3.2 e 3.3. Foram calculados os parâmetros microbiológicos de crescimento, com objetivo de avaliar os fatores que afetam significativamente o crescimento, do ponto de vista estatístico. Os parâmetros microbiológicos, velocidade máxima de crescimento (μ), aumento logarítmico da população (A) e duração da fase lag (λ) foram estimados, utilizando os Modelo de Gompertz Modificado e o Modelo Logístico, através do *Software* Statistica 6.0. A escolha do modelo foi realizada através da avaliação dos índices estatísticos MSE, Fator Bias e Fator de Exatidão. Nesta avaliação, os Modelos de Gompertz Modificado e Logístico apresentaram ajustes similares aos dados experimentais avaliados. Como exemplo nas Figuras 4.21 e 4.22 estão as curvas de crescimento dos experimentos 9 e 5, respectivamente, obtidas com o Modelo Logístico (1) e com o Modelo Gompertz Modificado (2).



Experimento 9: 1,7% sal; 0,5% Pfosfato; 3% lactato; 90ppm (nitri+nitra); 0,01% alho.

Figura 4.21 Curva de crescimento do experimento 9 para *L. plantarum* obtidas com os Modelos Logístico (1) e Gompertz Modificado (2) no planejamento fatorial fracionado.



Experimento 5: 3,3% sal; 1% lactato; 0,5% Pfosfato; 90ppm (nitri+nitra); 0,01% alho.

Figura 4.22 Curva de crescimento do experimento 5 para *L. plantarum* obtidas com os Modelos Logístico (1) e Gompertz Modificado (2) no planejamento fatorial fracionado.

As curvas dos experimentos realizados com o planejamento fatorial fracionado para *L. plantarum*, conforme Tabela 3.2, obtidas com o Modelo Logístico e com o Modelo de Gompertz Modificado apresentaram ajustes similares como se pode observar através da avaliação dos índices estatísticos na Tabela 4.6

Tabela 4.6 Índices estatísticos para avaliação de *L. plantarum* no planejamento fatorial fracionado, com os Modelos Logístico e Gompertz Modificado.

Experimento	M. Logístico			M. Gompertz Modificado		
	Índices Estatísticos					
	MSE	Fbias	Fexat	MSE	Fbias	Fexat
1	0,0011	0,9930	1,0238	0,0017	1,0403	1,0539
2	0,0059	1,0002	1,0218	0,0025	1,0022	1,0097
3	0,0026	0,9743	1,0448	0,0013	0,9952	1,0160
4	0,0008	1,0210	1,0450	0,0037	1,3651	1,3882
5	0,0032	0,9923	1,0214	0,0008	1,0026	1,0070
6	0,0018	0,9423	1,0704	0,0066	0,9922	1,0182
7	0,0013	1,0363	1,0501	0,0051	1,3413	1,3653
8	0,0014	0,9992	1,0185	0,0015	1,0695	1,0713
9	0,0074	0,9808	1,0377	0,0029	1,0100	1,0258
10	0,0028	0,9687	1,0475	0,0011	0,9969	1,0087
11	0,0040	0,6859	1,4577	0,0012	0,9962	1,0133
12	0,0025	0,9850	1,0271	0,0012	1,0558	1,0685
13	0,0023	0,9331	1,0842	0,0004	1,0581	1,0639
14	0,0029	0,9894	1,0192	0,0017	1,0608	1,0674
15	0,0020	0,9968	1,0064	0,0017	1,0433	1,0542
16	0,0032	0,9746	1,0841	0,0066	1,0949	1,1296
17	0,0059	0,9143	1,1181	0,0026	1,1984	1,2235
18	0,0023	0,9990	1,0306	0,0026	1,2318	1,2469
19	0,0045	0,8965	1,1342	0,0018	0,9858	1,0256
20	0,1946	1,2407	1,2407	0,0028	1,0198	1,0361

MSE= Erro médio quadrático; Fbias= Fator Bias; Fexat= Fator de Exatidão.

O experimento 20 não faz parte do planejamento fatorial fracionado e foi realizado apenas para verificar o crescimento de *L. plantarum* em caldo MRS, condições otimizadas (caldo MRS e 10% de inóculo), para controle do processo.

Avaliando-se os índices estatísticos obtidos observa-se que os valores do MSE obtidos para a maioria dos experimentos avaliados, foram menores para o Modelo de Gompertz Modificado. Os valores do fator bias e do fator de exatidão no Modelo Logístico e Modelo de Gompertz Modificado foram similares. O Modelo de Gompertz Modificado foi selecionado para continuidade deste trabalho. Desde modo, os parâmetros de crescimento para *L. plantarum*, no planejamento fatorial fracionado apresentados na Tabela 4.7, foram obtidos com o ajuste deste modelo.

Tabela 4.7. Parâmetros de crescimento do *L. plantarum* obtidos pelo ajuste do Modelo de Gompertz Modificado com o planejamento fatorial fracionado.

Experimento	Sal	Lactato	Fosfato	Nitri+nitra	Alho	A	μ	λ
1	1	1	1	1	1	1,58	0,20	9,27
2	1	1	1	-1	-1	1,94	0,21	7,40
3	1	1	-1	1	-1	1,90	0,25	6,26
4	1	1	-1	-1	1	1,73	0,17	6,49
5	1	-1	1	1	-1	2,07	0,28	5,87
6	1	-1	1	-1	1	1,79	0,25	7,16
7	1	-1	-1	1	1	1,88	0,24	5,25
8	1	-1	-1	-1	-1	2,09	0,27	5,25
9	-1	1	1	1	-1	2,26	0,28	4,69
10	-1	1	1	-1	1	1,74	0,27	6,49
11	-1	1	-1	1	1	1,85	0,28	5,67
12	-1	1	-1	-1	-1	2,04	0,31	5,07
13	-1	-1	1	1	1	1,90	0,35	5,40
14	-1	-1	1	-1	-1	2,10	0,36	4,95
15	-1	-1	-1	1	-1	2,06	0,35	4,55
16	-1	-1	-1	-1	1	1,95	0,25	4,03
17	0	0	0	0	0	2,06	0,27	5,18
18	0	0	0	0	0	2,01	0,25	4,94
19	0	0	0	0	0	1,90	0,27	5,54

A = aumento logarítmico da população; μ = velocidade máxima de crescimento (h^{-1}); λ = duração da fase lag (h).

Em todos os experimentos realizados com o planejamento fatorial fracionado e ajustados com o Modelo de Gompertz Modificado ocorreu crescimento microbiano. As diferenças nos valores dos parâmetros de crescimento foram resultado da variação da concentração dos fatores avaliados. Os resultados da Tabela 4.7 foram submetidos à análise de variância e estimativa dos efeitos, através do *Software* STATÍSTICA 6.0. Na Tabela 4.8, estão apresentados os fatores que influenciaram nas variáveis respostas A, μ , λ , assim como, os efeitos significativos

Tabela 4.8 Análise da variância e estimativa dos efeitos significativos para *L. plantarum* com o planejamento fatorial fracionado.

Fatores	Variável Resposta					
	A		μ		λ	
	Efeito	Valor-p	Efeito	Valor-p	Efeito	Valor-p
(1)Sal	-0,1165	0,1010	-0,0742	0,0073	1,5099	0,0099
(2)Lactato	-0,0978	0,1351	-0,0502	0,0158	1,1083	0,0182
(3)PFosfato	-0,0143	0,7563	0,0094	0,2781	1,0838	0,0190
(4)Nitri/nitra	0,0143	0,7557	0,0147	0,1480	0,0153	0,9287
(5)Alho	-0,2543	0,0240	-0,0395	0,0252	0,7135	0,0423
(1) por (2)	-0,0683	0,2309	-0,0036	0,6313	0,3637	0,1386
(1) por (3)	-0,0405	0,4189	-0,0064	0,4198	0,5285	0,0734
(1) por (4)	-0,0456	0,3740	-0,0002	0,9784	0,0711	0,6855
(1) por (5)	-0,0008	0,9856	-0,0023	0,7573	0,1342	0,4697
(2) por (3)	0,0164	0,7218	-0,0223	0,0730	0,0091	0,9575
(2) por (4)	0,0191	0,6814	-0,0075	0,3635	0,0945	0,5970
(2) por (5)	-0,0559	0,2985	0,0047	0,5369	0,4089	0,1144
(3) por (4)	0,0472	0,3610	-0,0106	0,2398	-0,2090	0,3021
(3) por (5)	-0,0872	0,1620	0,0246	0,0611	0,6369	0,0523
(4) por (5)	-0,0177	0,7030	0,0155	0,1366	0,3405	0,1539

Como mostrado na Tabela 4.8, os fatores e as interações foram considerados significativos estatisticamente quando $p < 0,05$. Analisando-se as variáveis respostas, verificou-se que o fator alho foi considerado estatisticamente significativo para todas as variáveis respostas obtidas, enquanto que, o fator nitri/nitra, não apresentou efeito significativo para nenhuma das variáveis respostas, pois o valor $p > 0,05$. Para a variável resposta A, aumento logarítmico da população, apenas o alho foi estatisticamente significativo, apresentando efeito negativo, o que contribuiria para diminuir a variável resposta avaliada. Nenhuma interação entre os fatores foi observada. Para a variável μ , a velocidade máxima atingida, além do alho, os fatores lactato e o sal, foram estatisticamente significativos. Observou-se que todos os fatores considerados significativos apresentaram efeito negativo, ou seja, o aumento da concentração destes fatores leva à diminuição da variável resposta avaliada. Apenas a interação entre o lactato sobre e o Pfosfato foi observada. Para a variável resposta λ , duração da fase lag, apenas nitri/nitra não apresentou efeito significativo. Observou-se que os fatores significativos, sal, lactato, Pfosfato e alho apresentaram efeito positivo, o que leva ao aumento da variável resposta avaliada. Não houve interação entre os fatores avaliados.

As variáveis respostas foram avaliadas individualmente, em relação aos fatores estatisticamente significativos, através das curvas de nível. Na Figura 4.23, está apresentada a curva de nível para a variável resposta A, sobre o crescimento de *L. plantarum* com o planejamento fatorial fracionado.

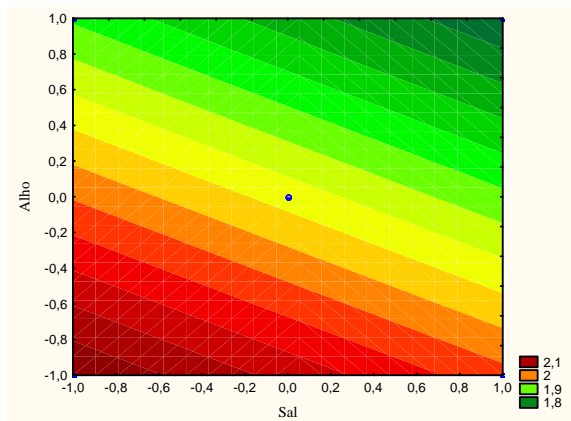


Figura 4.23 Curva de nível para variável resposta A sobre o crescimento de *L. plantarum* com o planejamento fatorial fracionado para os fatores Sal/ alho.

Na Figura 4.23 verificou-se que a concentração de alho, ao passar do nível inferior para o nível superior, provoca uma diminuição no valor de A mais acentuada do que a concentração do fator sal na mesma condição.

Na Figura 4.24, apresenta-se a variável resposta μ avaliada através das curvas de nível para os fatores alho/sal (1) e lactato/sal (2) sobre o crescimento de *L. plantarum* com o planejamento fatorial fracionado.

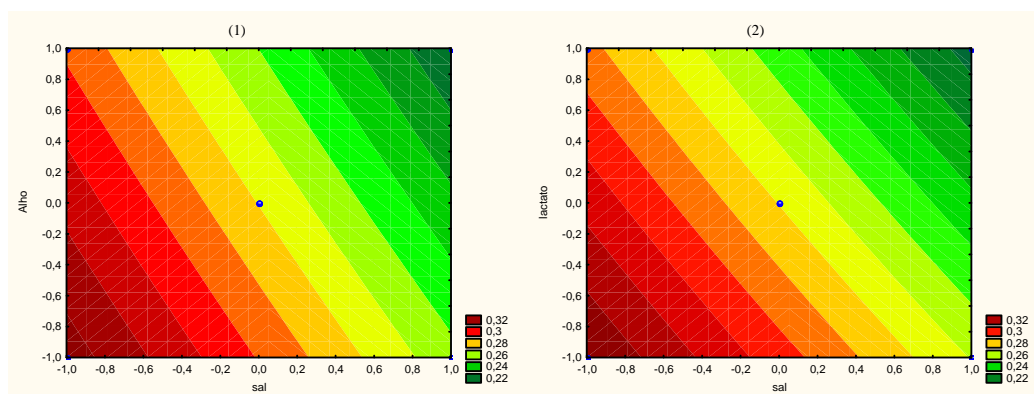


Figura 4.24 Curva de nível para variável resposta μ sobre o crescimento de *L. plantarum* com o planejamento fatorial fracionado, para os fatores alho/sal (1) e lactato/sal (2).

Como mostrado na Figura 4.24 (1), o efeito da variação da concentração do sal sobre a variável resposta μ é muito mais acentuado do que o efeito da variação da concentração de alho, sendo que a passagem do nível inferior para o nível superior no fator sal proporciona uma diminuição significativa no valor de μ . Observa-se que a combinação dos dois fatores sal e alho, podem ser mais efetivos, ou seja, poderia provocar uma maior diminuição na variável resposta μ . Na Figura 4.24 (2), analisando-se os fatores sal e lactato, pode-se verificar que o comportamento é similar, logo a influência destes dois fatores tem comportamento similar ao apresentado para alho e sal na variável resposta μ .

Na Figura 4.25 estão apresentadas curvas de nível para a variável resposta λ , sobre o crescimento de *L. plantarum* com o planejamento fatorial fracionado, para os fatores alho/sal (1) e lactato/sal (2).

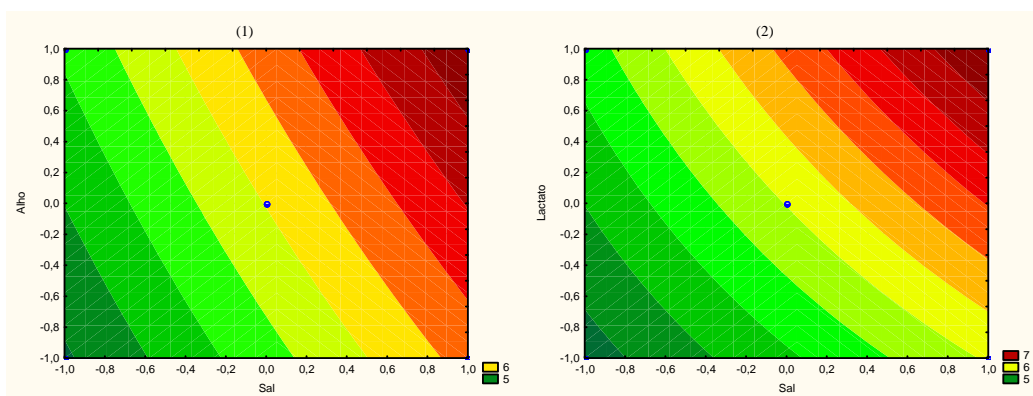


Figura 4.25 Curva de nível para a variável λ sobre o crescimento de *L. plantarum* com o planejamento fatorial fracionado, para os fatores alho/sal (1) e lactato/sal (2).

Na Figura 4.25(1), verificou-se que a concentração de sal, passando do nível inferior para nível superior, provoca um aumento da variável resposta λ (duração da fase lag). Observou-se que o fator alho e o fator sal no nível zero, simultaneamente, promovem um aumento da variável resposta λ . Na Figura 4.25 (2) observou-se um comportamento similar na avaliação dos fatores lactato e do sal.

O planejamento fatorial fracionado foi utilizado com o objetivo de otimizar o número de experimentos para o *L. sakei* e para *L. plantarum* e, ao mesmo tempo, avaliar e selecionar os fatores significativos estatisticamente, além de verificar os efeitos que podem influenciar nos parâmetros de crescimento destes microrganismos. A partir das observações realizadas, para as duas bactérias avaliadas, foi possível excluir nitrito/nitrato desta avaliação, pois o mesmo não atuou inibindo o crescimento dos microrganismos avaliados nas condições determinadas, não sendo considerado estatisticamente significativo na maioria das condições

avaliadas. As concentrações de nitrito/nitrato devem ser mantidas na formulação dos produtos avaliados na concentração mínima indicada pela indústria, conforme legislação, para que possa atuar com as suas funções específicas, principalmente inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, especialmente o *Clostridium botulinum*. Segundo Franco & Landgraf (1996) e Jay (2005), os sais de nitrito/nitrato são ineficazes contra bactérias ácido lácticas. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a literatura.

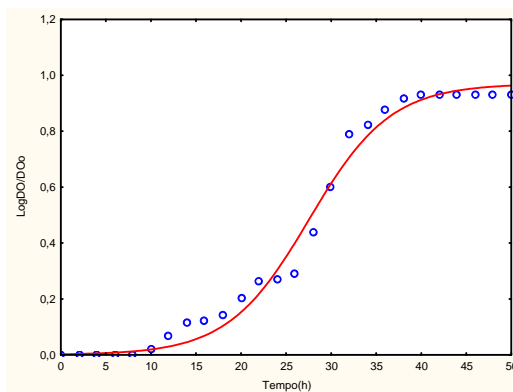
A avaliação do crescimento em caldo MRS, através do planejamento fatorial fracionado, mostrou que os fatores mais significativos estatisticamente foram o sal, lactato, Pfosfato e alho. Apesar do alho, em muitas situações, só atuar combinado com outros fatores, é necessário uma investigação mais ampla, para verificar e concluir sobre a sua importância neste estudo. Segundo autores (HARRIS, et al., 2001; SALLAM, et al., 2004) o alho possui atividade antimicrobiana e estudos mostram que este ingrediente pode contribuir para prolongar a vida de prateleira de produtos cárneos.

Para um estudo mais amplo, a partir da seleção dos fatores sal, lactato, Pfosfato e alho, foram realizados experimentos em caldo MRS, segundo um delineamento composto central rotacional. Os níveis para o delineamento composto central rotacional, foram selecionados conforme resultados obtidos no planejamento fatorial fracionado.

4.3.3 Avaliação do crescimento do *L. sakey* – Delineamento composto central rotacional (DCCR)

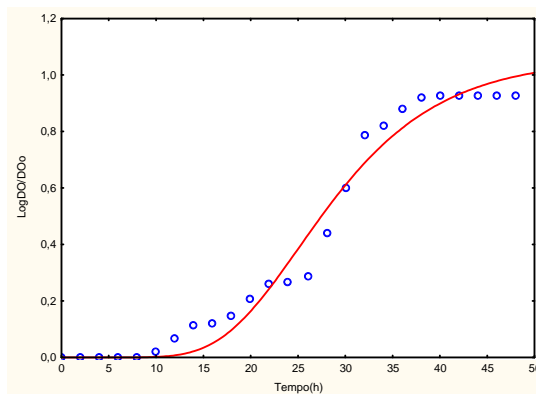
Os experimentos foram realizados conforme Tabela 3.4 e Tabela 3.5 com *L. sakey*. As curvas de crescimento foram acompanhadas até fase estacionária e após, foram calculados os parâmetros microbiológicos de crescimento, com objetivo de avaliar os fatores de maior influência. Estes parâmetros, velocidade máxima de crescimento (μ), aumento logarítmico da população (A) e duração da fase lag (λ) foram estimados utilizando-se os Modelo de Gompertz Modificado e o Modelo Logístico, através do *Software* Statistica 6.0. A escolha do modelo que apresentou melhor ajuste foi realizada através da avaliação dos índices estatísticos MSE, Fator Bias e Fator de Exatidão. Neste estudo foi verificado que o Modelo Logístico se ajustou melhor aos dados propostos. Neste planejamento de experimentos, foram adicionados dois pontos axiais (mínimo e máximo) para cada fator avaliado e triplicata no ponto central, para que se pudesse ter uma visão mais ampla das regiões das variáveis. Como exemplo nas Figuras 4.26 e 4.27 estão as curvas de crescimento do experimento 26 para *L.*

sakey obtida com o Modelo Logístico e com o Modelo de Gompertz Modificado, respectivamente,



Experimento 26: 3% sal; 2% lactato; 0,3% Pfosfato; 0,3% alho.

Figura 4.26 Curva de crescimento do experimento 26 para *L. sakey* obtida com o Modelo Logístico no delineamento composto central rotacional.



Experimento 26: 3% sal; 2% lactato; 0,3% Pfosfato; 0,3% alho.

Figura 4.27 Curva de crescimento do experimento 26 para *L. sakey* obtida com o Modelo Gompertz Modificado no delineamento composto central rotacional.

O ajuste das curvas dos experimentos realizados com o delineamento composto central rotacional para *L. sakey*, obtidas com o Modelo Logístico e com o Modelo de Gompertz Modificado foram avaliadas através dos índices estatísticos como pode-se observar na Tabela 4.9

Tabela 4.9 Índices estatísticos para avaliação de *L. sakey* com os experimentos do delineamento composto central rotacional, com o Modelo Logístico e Modelo Gompertz Modificado.

Experimentos	M. Logístico			M.Gompertz Modificado		
	MSE	Fbias	Fexat	MSE	Fbias	Fexat
1	0,0045	1,2878	1,3152	0,0079	1,6760	1,7047
2	0,0047	2,0077	2,0484	0,0084	1,4436	1,4748
3	0,0117	1,4035	1,4866	0,0129	2,1468	2,1958
5	0,0071	1,9698	2,0140	0,0097	1,1036	1,1238
7	0,0106	2,1259	2,1559	0,0144	1,3668	1,3836
8	0,0052	1,5549	1,5823	0,0095	2,0197	2,0774
11	0,0189	1,9421	2,0174	0,2876	2,4035	2,4035
13	0,0004	1,3058	1,3297	0,0008	1,7953	1,8311
17	0,0027	1,5940	1,6141	0,0068	3,7241	3,7679
19	0,0033	1,3770	1,3950	0,0070	1,4336	1,4517
21	0,0041	1,2283	1,2574	0,0080	2,1454	2,1947
23	0,0030	1,4782	1,5093	0,0700	1,7254	1,7254
24	0,0007	1,1353	1,1515	0,0015	1,4161	1,4361
25	0,0008	1,1511	1,1716	0,0021	2,4147	2,4743
26	0,0025	1,0692	1,1019	0,0043	1,1934	1,2420
27	0,0005	1,4556	1,4658	0,0011	1,8412	1,8555
28	0,0004	0,9992	1,0127	0,0034	1,1236	1,1371

MSE= Erro médio quadrático; Fbias= Fator Bias; Fexat= Fator de Exatidão

O experimento 28 não faz parte do delineamento composto central rotacional e foi realizado apenas para verificar o crescimento de *L. sakey* em caldo MRS, em condições otimizadas (caldo MRS e 10% de inóculo), para controle do processo.

Após a avaliação do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico através da Tabela 4.9, observou-se com o Modelo Logístico um melhor ajuste aos dados experimentais, pois o mesmo apresentou os menores valores do MSE e os valores do Fator de Exatidão mais próximo de 1 na maioria dos experimentos. Assim os parâmetros de crescimento para *L. sakey* foram obtidos pelo ajuste do Modelo Logístico e estão apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 Parâmetros de crescimento do *L. sakey* obtidos pelo ajuste do Modelo Logístico com o delineamento composto central rotacional.

Experimentos	Sal	Lact	Pfosf	Alho	A	μ	λ
1	-1	-1	-1	-1	1,80	0,14	18,44
2	-1	-1	-1	1	1,75	0,18	21,10
3	-1	-1	1	1	1,45	0,09	22,59
4	-1	1	1	1	0,00	0,00	40,00
5	-1	1	-1	1	1,09	0,11	23,51
6	-1	1	1	-1	0,00	0,00	40,00
7	-1	-1	1	-1	1,52	0,18	23,48
8	-1	1	-1	-1	1,50	0,11	19,33
9	1	1	1	-1	0,00	0,00	40,00
10	1	1	-1	-1	0,00	0,00	40,00
11	1	-1	-1	-1	1,58	0,10	22,71
12	1	-1	1	-1	0,00	0,00	40,00
13	1	-1	-1	1	0,49	0,04	20,90
14	1	1	-1	1	0,00	0,00	40,00
15	1	-1	1	-1	0,00	0,00	40,00
16	1	1	1	1	0,00	0,00	40,00
17	-2	0	0	0	1,84	0,19	20,34
18	2	0	0	0	0,00	0,00	40,00
19	0	-2	0	0	1,67	0,18	22,67
20	0	2	0	0	0,00	0,00	40,00
21	0	0	-2	0	1,48	0,10	18,34
22	0	0	2	0	0,00	0,00	40,00
23	0	0	0	-2	1,36	0,10	20,16
24	0	0	0	2	1,09	0,12	25,15
25	0	0	0	0	0,81	0,05	17,20
26	0	0	0	0	0,97	0,05	18,55
27	0	0	0	0	0,82	0,12	22,78

A = aumento logarítmico da população; μ = velocidade máxima de crescimento (h^{-1}); λ = duração da fase lag (h).

Nos experimentos 4, 6, 9, 10, 12, 14, 15 e 16, 18, 20 e 22 não ocorreu crescimento microbiano durante o período avaliado. Este fato pode ter sido devido à combinação dos níveis dos fatores avaliados, ou seja à concentração de sal, de lactato, de Pfosfato e de alho. Deste modo, o aumento logarítmico da população (A) e velocidade específica máxima de crescimento (μ), foram considerados iguais a zero, durante o período de avaliação e a duração da fase lag, máxima, com o valor de 40 horas, que foi o tempo máximo de avaliação dos experimentos. Os experimentos do planejamento fatorial fracionado, avaliados com Modelo Logístico, apresentaram duração da fase lag (λ) bastante longa, este comportamento pode ser explicado pela influência da concentração dos diferentes fatores avaliados, sobre o crescimento de *L. sakey*. Conforme Tabela 4.10, pode-se observar que no experimento 1, onde as concentrações de todos os fatores avaliados encontravam-se em níveis inferiores, o

crescimento microbiano foi observado, enquanto que, no experimento 16 onde as concentrações de todos fatores avaliados encontravam-se em níveis superiores, o crescimento microbiano não foi observado. Com os parâmetros de crescimento calculados, foi realizada uma análise estatística para avaliar a influência de cada um dos fatores no crescimento microbiano.

Os resultados da Tabela 4.10 foram submetidos à análise de variância e estimativa dos efeitos, através do *Software* STATÍSTICA 6.0. Na Tabela 4.11, estão apresentados os fatores que influenciaram as variáveis respostas A, μ , λ , assim como os efeitos significativos.

Tabela 4.11 Análise da variância e estimativas dos efeitos significativos para *L. sakey* com o delineamento composto central rotacional.

Fatores	Variável Resposta					
	A		μ		λ	
	Efeito	Valor-p	Efeito	Valor-p	Efeito	Valor-p
(1)Sal (L)	-0,8776	0,0001	-0,0876	0,0063	18,2172	0,0004
(1)Sal (Q)	-0,0465	0,2348	0,0017	0,9071	11,6404	0,0015
(2)Lactato (L)	-0,7959	0,0001	-0,0725	0,0107	20,3467	0,0003
(2)Lactato (Q)	-0,0885	0,0668	-0,0004	0,9776	12,2207	0,0013
(3)Pfosfato (L)	-0,6671	0,0002	-0,0515	0,0271	18,9607	0,0003
(3)Pfosfato (Q)	-0,1368	0,0223	-0,0215	0,2005	11,1391	0,0017
(4)Alho (Q)	-0,1148	0,0336	-0,0014	0,9178	-1,5158	0,2311
(4)Alho (L)	0,1052	0,0440	0,0078	0,5964	2,8829	0,0680
(1) por (2)	0,2082	0,0117	0,0278	0,1758	1,8789	0,2263
(1) por (3)	0,1604	0,0238	0,0149	0,4150	-2,8943	0,1014
(1) por (4)	0,0274	0,5282	0,0056	0,7515	-5,0082	0,0287
(2) por (3)	-0,0173	0,6766	-0,0031	0,8573	1,2650	0,3820
(2) por (4)	0,0019	0,9639	0,0075	0,6752	4,5665	0,0364
(3) por (4)	0,2834	0,0052	-0,0017	0,9239	-4,7771	0,0325

A = aumento logarítmico da população; μ = velocidade máxima de crescimento (h^{-1}); λ = duração da fase lag (h).

Como mostra a Tabela 4.11, os fatores foram considerados significativos estatisticamente, quando $p < 0,05$. Na avaliação dos fatores, observa-se que o alho foi significativo apenas para a variável resposta A, que ao mesmo tempo foi influenciada pelos fatores sal, lactato e Pfosfato, além das interações do sal sobre o lactato e Pfosfato e do Pfosfato sobre o alho. Na avaliação da variável resposta μ , observa-se que os fatores sal, lactato e Pfosfato demonstram efeito significativo, mas não houve interação entre os fatores. Na variável resposta λ , verifica-se que os fatores avaliados, sal, lactato e Pfosfato, apresentam efeitos significativos, neste caso, as interações do sal, do lactato e do Pfosfato, com alho

foram consideradas significativas. As variáveis respostas foram avaliadas individualmente, em relação aos fatores estatisticamente significativos, através das curvas de nível.

A Figura 4.28 apresenta as curvas de nível para as variáveis respostas A, para os fatores alho/sal (1) e lactato/sal (2), sobre o crescimento de *L. sakey* com o delineamento composto central rotacional

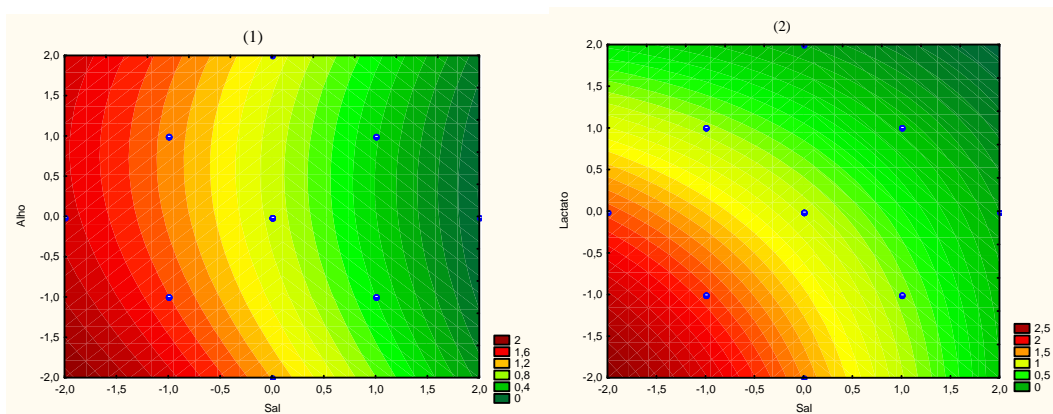


Figura 4.28 Curva de nível para a variável resposta A para os fatores alho/sal (1) e lactato/sal (2). sobre o crescimento de *L. sakey* com o delineamento composto central rotacional.

Observa-se na Figura 4.28 (1), que a concentração de alho só apresenta influência na variável A combinada com a concentração de sal. Com o aumento da concentração de sal, mesmo com o alho no nível inferior, ocorre uma redução no aumento logarítmico da população (A). Avaliando-se o fator lactato, na Figura 4.28 (2), verifica-se que o aumento da concentração deste a partir do nível zero, juntamente com o aumento da concentração do sal no mesmo nível leva à diminuição da variável resposta A. O aumento da concentração de ambos promove uma redução no valor da variável resposta A. Com o Pfosfato e sal, o comportamento é similar.

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível para a variável resposta A, considerando-se apenas os efeitos significativos, está apresentada na Equação 4.1:

$$A = 0,86 - 0,43*sal - 0,39*lactato - 0,33*Pfosfato - 0,06*Pfosfato^2 + 0,05*alho + 0,05*alho^2 + 0,104*sal*lactato + 0,08*sal*Pfosfato + 0,14*Pfosfato*alho \quad (4.1)$$

A Figura 4.29 apresenta as curvas de nível para as variáveis respostas μ , para os fatores lactato/sal (1) e Pfosfato/sal (2), sobre o crescimento de *L. sakey*, com o delineamento composto central rotacional

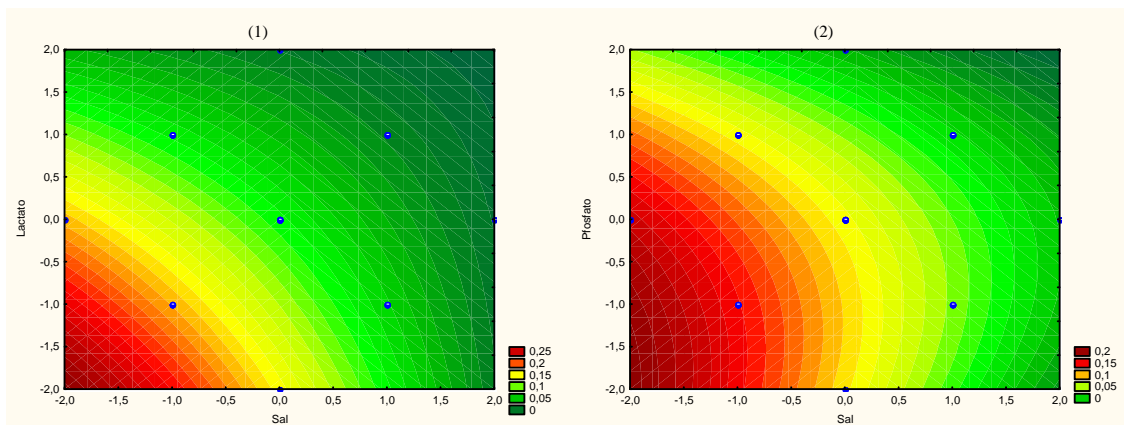


Figura 4.29 Curva de nível para variável resposta μ para os fatores lactato/sal (1) e Pfosfato/sal (2), sobre o crescimento de *L. sakey* com o delineamento composto central rotacional.

Conforme mostrado na Figura 4.29, o aumento da concentração de sal provoca a redução na velocidade específica máxima. O aumento da concentração de sal, como mostrado na Figura 4.29 (1), acima do nível -1 com o lactato aumentando acima do nível zero, provoca uma redução na velocidade específica máxima de crescimento de 0,25 para 0,15 aproximadamente. Na Figura 4.29 (2), observa-se que o aumento da concentração de sal, a partir do nível zero, com o Pfosfato no mesmo nível, promove uma redução na velocidade específica máxima de crescimento de 0,2 para 0,1 aproximadamente. Verifica-se também que, aumentando a concentração de lactato ou de Pfosfato, mantendo a concentração de sal no nível zero, tem-se uma diminuição da variável resposta μ . Esta observação é muito importante pois, mantendo a concentração de sal utilizada pela indústria (nível zero), e aumentando as concentração dos outros fatores, poder-se-ia diminuir o μ (velocidade específica máxima) dos microrganismos deteriorantes, ao mesmo tempo os produtos cárneos seriam bem aceitos sensorialmente, além de contribuir para que o consumidor tenha um produto mais saudável.

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível para a variável resposta μ , considerando-se apenas os efeitos significativos, está apresentada na Equação 4.2:

$$\mu = 0,07 - 0,04*\text{sal} - 0,036*\text{lactato} - 0,025*\text{Pfosfato} \quad (4.2)$$

A Figura 4.30 apresenta as curvas de nível para as variáveis respostas λ , para os fatores lactato/sal (1) e Pfosfato/sal (2), sobre o crescimento de *L. sakey*, com o delineamento composto central rotacional

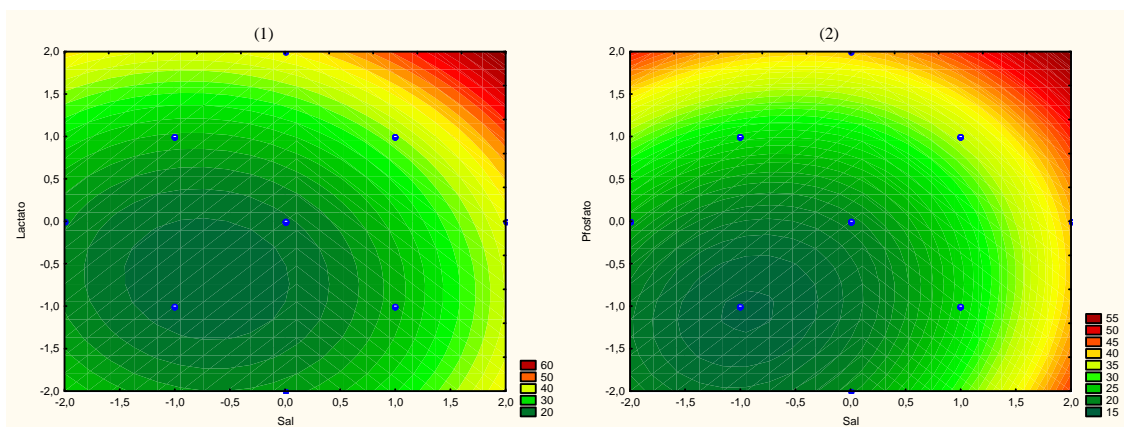


Figura 4.30 Curva de nível para a variável λ , para os fatores lactato/sal (1) e Pfosfato/sal (2), sobre o crescimento de *L. sakey*, com o delineamento composto central rotacional.

Como mostrado nas Figuras 4.30 (1) e (2), o comportamento dos fatores avaliados é similar. Quando a concentração dos fatores se encontra no nível máximo, provoca aumento da variável resposta λ , ou seja aumento do tempo de duração da fase lag. Verifica-se também que, quando a concentração de lactato (1), ou a de Pfosfato (2), encontram-se no nível máximo, e com concentrações de sal a partir do nível zero simultaneamente, provoca um aumento na variável resposta λ , de 20 para 40 horas.

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível para a variável resposta λ , considerando-se apenas os efeitos significativos, está apresentada na Equação 4.3:

$$\lambda = 19,5 + 9,10 \cdot \text{sal} + 5,82 \cdot \text{sal}^2 + 10,17 \cdot \text{lactato} + 6,11 \cdot \text{lactato}^2 + 9,48 \cdot \text{Pfosfato} + 5,56 \cdot \text{Pfosfato}^2 - 2,50 \cdot \text{sal} \cdot \text{alho} + 2,28 \cdot \text{lactato} \cdot \text{alho} - 2,38 \cdot \text{Pfosfato} \cdot \text{alho} \quad (4.3)$$

Observa-se que, dos fatores avaliados sobre o crescimento de *L. sakey*, com o delineamento composto central rotacional, a concentração de alho foi a que apresentou a menor influência na avaliação das variáveis respostas.

4.3.4 Avaliação do crescimento do *L. plantarum* – Delineamento composto central rotacional (DCCR).

Os experimentos foram realizados conforme Tabela 3.4 e Tabela 3.5 com *L. plantarum*. As curvas de crescimento foram acompanhadas até fase estacionária e após foram calculados os parâmetros microbiológicos de crescimento, com objetivo de avaliar os fatores de maior influência sobre o crescimento de *L. plantarum*. Estes parâmetros, velocidade máxima de crescimento (μ), aumento logarítmico da população (A) e duração da fase lag (λ)

foram estimados utilizando-se os Modelo de Gompertz Modificado e o Modelo Logístico, através do *Software* Statística 6.0. A escolha do modelo que apresentou melhor ajuste foi realizada através da avaliação dos índices estatísticos MSE, Fator Bias e Fator de Exatidão. Neste estudo foi verificado que o Modelo Logístico e o Modelo de Gompertz Modificado apresentam ajustes similares. Neste planejamento de experimentos, foram adicionados dois pontos axiais (mínimo e máximo) para cada fator avaliado e triplicata no ponto central, para que se pudesse ter uma visão mais ampla das regiões das variáveis. Como exemplo nas Figuras 4.31 (1) e (2) estão apresentadas as curvas de crescimento dos experimentos 4 (1) e 26 (2) obtidas com o Modelo de Gompertz Modificado.

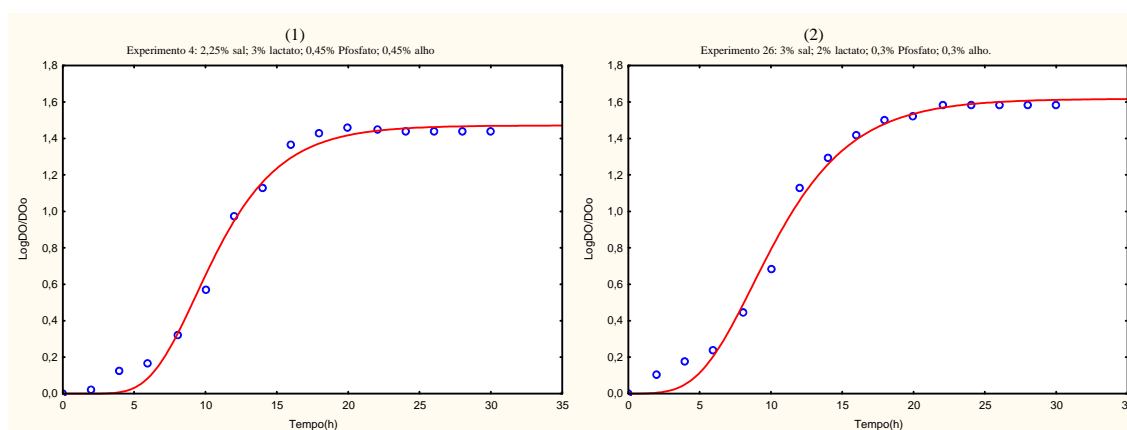


Figura 4.31 Curvas de crescimento dos experimentos 4 (1) e 26 (2) para *L. plantarum*, obtida com o Modelo de Gompertz Modificado no delineamento composto central rotacional.

Como exemplo nas Figuras 4.32 (1) e (2) estão apresentadas as curvas de crescimento dos experimentos 4 (1) e 26 (2) obtidas com o Modelo Logístico.

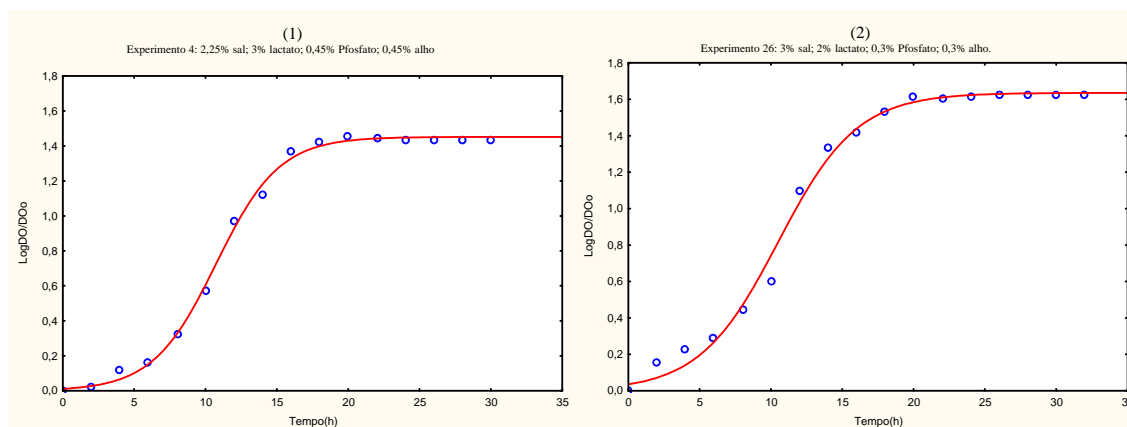


Figura 4.32 Curvas de crescimento dos experimentos 4 (1) e 26 (2) para *L. plantarum*, obtida com o Modelo Logístico no delineamento composto central rotacional.

O ajuste das curvas dos experimentos realizados com o delineamento composto central rotacional para *L. plantarum*, obtidas com o Modelo Logístico e com o Modelo de Gompertz

Modificado foram avaliadas através dos índices estatísticos (MSE, F.bias, F Exatidão) como se pode observar na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 Índices estatísticos para avaliação de *L. plantarum* no delineamento composto central rotacional, com o Modelo Logístico e o Modelo de Gompertz Modificado.

Experimentos	M. Logístico			M.Gompertz Modificado		
	MSE	Fbias	Fexat	MSE	Fbias	Fexat
1	0,0025	1,0536	1,0719	0,0059	1,4629	1,4934
2	0,0039	0,9721	1,1151	0,0080	1,1773	1,2043
3	0,0026	0,9880	1,0749	0,0055	1,2094	1,2378
4	0,0013	1,0125	1,0618	0,0037	1,4574	1,4811
5	0,0016	0,9969	1,0663	0,0043	1,1686	1,1985
6	0,0022	1,0207	1,0406	0,0136	1,1950	1,2616
7	0,0014	0,9462	1,1004	0,0912	1,2229	1,2229
8	0,0041	1,0046	1,0283	0,0391	0,9368	1,0987
9	0,0039	0,9707	1,1138	0,0077	1,1566	1,1821
10	0,0034	1,0292	1,0419	0,0068	1,0711	1,0981
11	0,0048	1,0272	1,0496	0,0098	1,0937	1,1338
12	0,0008	1,0311	1,0422	0,0042	1,2443	1,2646
13	0,0015	1,0176	1,0346	0,0040	1,1232	1,1501
14	0,0046	1,0192	1,1011	0,0094	1,1544	1,2022
15	0,0018	1,0585	1,0722	0,0059	1,3581	1,3909
16	0,0019	0,9602	1,1160	0,0044	1,1906	1,2115
17	0,0037	1,0341	1,0628	0,0068	1,2538	1,2839
18	0,0037	1,0718	1,0893	0,0092	1,2314	1,2684
19	0,0038	1,0582	1,0877	0,0084	1,2505	1,2803
20	0,0015	0,9823	1,0327	0,0012	1,0431	1,0537
21	0,0056	0,9822	1,0380	0,0033	0,9998	1,0195
22	0,0021	0,9291	1,1391	0,0054	1,0158	1,1003
23	0,0038	0,9776	1,0327	0,0036	1,0672	1,0849
24	0,0012	1,0354	1,0488	0,0046	1,1353	1,1623
25	0,0062	1,0414	1,0490	0,0047	1,2033	1,2297
26	0,0042	1,0492	1,0724	0,0092	1,1552	1,1927
27	0,0019	1,0309	1,0481	0,0050	1,1356	1,1588
28	0,0020	0,9182	1,0980	0,0005	1,0517	1,0611

MSE= Erro médio quadrático; Fbias= Fator Bias; Fexat= Fator de Exatidão.

O experimento 28 não faz parte do delineamento composto central rotacional e foi realizado apenas para verificar o crescimento de *L. plantarum* em caldo MRS, condições otimizadas (caldo MRS e 10% de inóculo), para controle do processo.

Após a avaliação do Modelo de Gompertz Modificado e Modelo Logístico através da Tabela 4.12, observa-se que os dois modelos apresentam ajustes similares, mas no Modelo Logístico os valores do MSE foram menores, além dos valores do Fator bias e Fator de exatidão se encontrarem mais próximos de 1 na maioria dos experimentos. Assim os parâmetros de crescimento para *L. plantarum* no delineamento composto central rotacional, foram obtidos pelo ajuste do Modelo Logístico e estão apresentados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 Parâmetros de crescimento de *L. plantarum* obtidos pelo ajuste do Modelo Logístico com o delineamento composto central rotacional.

Experimento	Sal	Lact	PFosf	Alho	A	μ	λ
1	-1	-1	-1	-1	1,68	0,19	6,39
2	-1	-1	-1	1	1,60	0,18	5,60
3	-1	-1	1	1	1,65	0,18	5,70
4	-1	1	1	1	1,45	0,16	6,31
5	-1	1	-1	1	1,55	0,15	5,58
6	-1	1	1	-1	1,67	0,14	5,82
7	-1	-1	1	-1	1,86	0,19	5,13
8	-1	1	-1	-1	1,63	0,19	5,99
9	1	1	1	-1	1,63	0,13	6,81
10	1	1	-1	-1	1,65	0,12	6,66
11	1	-1	-1	-1	1,68	0,13	4,74
12	1	-1	1	-1	1,75	0,15	6,43
13	1	-1	-1	1	1,58	0,13	5,39
14	1	1	-1	1	1,47	0,12	6,66
15	1	-1	1	-1	1,54	0,14	6,67
16	1	1	1	1	1,28	0,12	6,25
17	-2	0	0	0	1,63	0,22	4,94
18	2	0	0	0	1,55	0,12	6,34
19	0	-2	0	0	1,65	0,18	4,71
20	0	2	0	0	1,46	0,14	8,06
21	0	0	-2	0	1,60	0,19	6,55
22	0	0	2	0	1,71	0,16	5,05
23	0	0	0	-2	1,72	0,22	5,86
24	0	0	0	2	1,55	0,14	4,93
25	0	0	0	0	1,59	0,16	5,25
26	0	0	0	0	1,64	0,15	4,99
27	0	0	0	0	1,64	0,15	4,88

A = aumento logarítmico da população; μ = velocidade máxima de crescimento (h^{-1}); λ = duração da fase lag (h).

Na Tabela 4.13, verificou-se o comportamento das variáveis respostas A, μ e λ nas condições propostas com a inclusão dos pontos axiais. Foi possível avaliar a influência dos fatores nos níveis superiores (2) e inferiores (-2), mantendo os demais fatores no nível zero. Observa-se que a concentração de sal, quando avaliada nos níveis inferior e superior, mantendo os demais fatores no nível zero, provoca uma alteração na variável resposta μ de 0,22 para 0,12h⁻¹, respectivamente, enquanto que, na variável resposta A, variação foi de 1,63 para 1,55 e para variável resposta λ de 4,94 para 6,34 h. Verifica-se que a concentração de lactato apresenta maior influência na variável resposta λ , duração da fase lag, quando da avaliação nos níveis -2 e 2, observa-se um aumento de 4,71 para 8,06 h, respectivamente.

Os resultados da Tabela 4.13 foram submetidos à análise de variância e estimativa dos efeitos, através do *Software* STATÍSTICA 6.0. Na Tabela 4.14, estão apresentados os fatores que influenciaram as variáveis respostas A, μ , λ , assim como, os efeitos significativos.

Tabela 4.14 Análise da variância e estimativa dos efeitos significativos para *L. plantarum* com o delineamento composto central rotacional.

Fatores	Variável Resposta					
	A		μ		λ	
	Efeito	Valor-p	Efeito	Valor-p	Efeito	Valor-p
(1)Sal (L)	-0,0364	0,4404	-0,0424	0,0003	0,2253	0,1044
(1)Sal (Q)	-0,0133	0,7743	0,0010	0,6993	0,2918	0,0630
(2)Lactato (L)	-0,0873	0,1232	-0,0163	0,0055	0,7672	0,0043
(2)Lactato (Q)	-0,0358	0,4606	0,0004	0,8660	0,7279	0,0055
(3)Pfosfato (L)	-0,0287	0,5343	-0,0056	0,0886	-0,0196	0,8537
(3)Pfosfato (Q)	0,0168	0,7183	0,0032	0,2689	0,3304	0,0467
(4)Alho (L)	-0,1217	0,0612	-0,0128	0,0116	-0,2997	0,0566
(4)Alho (Q)	0,0067	0,8852	0,0055	0,1012	0,1916	0,1540
(1) por (2)	-0,0354	0,5364	-0,0054	0,1516	0,5411	0,0210
(1) por (3)	0,0199	0,7221	0,0185	0,0071	0,2422	0,1397
(1) por (4)	-0,0040	0,9431	-0,0006	0,8361	-0,3287	0,0767
(2) por (3)	-0,0959	0,1561	0,0024	0,4513	0,0649	0,6296
(2) por (4)	-0,1105	0,1234	-0,0091	0,0509	0,4474	0,0364
(3) por (4)	0,0236	0,6801	0,0164	0,0106	-0,2179	0,1767

Como mostrado na Tabela 4.14, os fatores e as interações foram considerados significativos estatisticamente quando $p < 0,05$. Verificou-se que na variável resposta A, aumento logarítmico da população, nenhum dos fatores avaliados foi estatisticamente significativo. Na variável μ , as concentrações de sal, de lactato e de alho foram

estatisticamente significativas, além da interação da concentração do Pfosfato com a concentração de alho. Observa-se que o efeito negativo do sal contribui para diminuir a velocidade máxima de crescimento. Na variável resposta λ , os fatores de maior influência foram o lactato e o Pfosfato, e as interações do sal sobre o lactato e do lactato sobre o alho. Observa-se que o efeito positivo do lactato contribui para aumentar a duração da fase lag. Segundo alguns autores, o lactato poderia prolongar a vida de prateleira de produtos cárneos cozidos (DE WIT & ROMBOUTS, 1990; HOUTSMA et al., 1993), devido às suas funções antimicrobianas e redução da atividade de água. Segundo Drosinos et al.(2006) a adição de lactato em concentrações de 2%, inibe o crescimento de bactérias ácido lácticas nos produtos cárneos, sem provocar alterações no sabor, além disso, sua atividade pode aumentar, quando combinado com outros antimicrobianos, como sal, acetato de sódio, sorbato de potássio.

As variáveis respostas foram avaliadas individualmente, em relação aos fatores estatisticamente significativos, através das curvas de nível.

A Figura 4.33 mostra as curvas de nível para a variável resposta μ para os fatores lactato/sal (1) e alho/sal (2), sobre o crescimento de *L. plantarum* com o delineamento composto central rotacional.

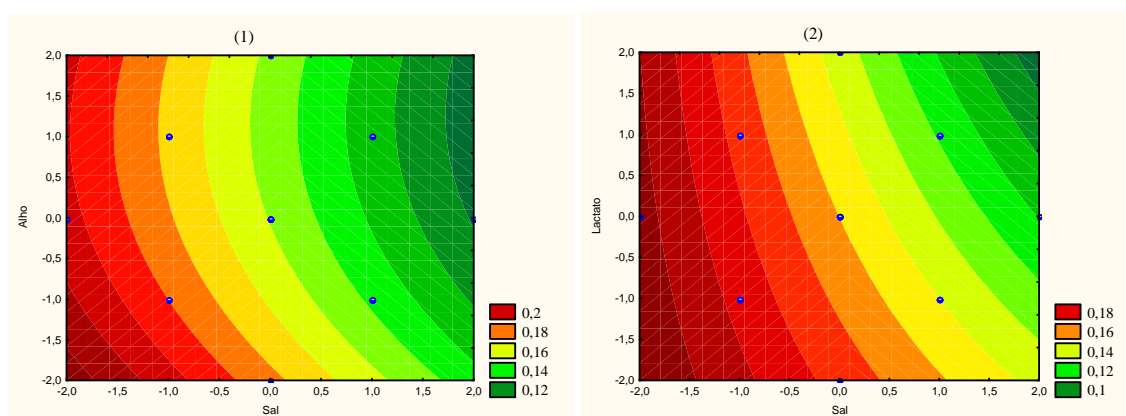


Figura 4.33 Curva de nível para variável resposta μ , para os fatores lactato/sal (1) e alho/sal (2), sobre o crescimento de *L. plantarum* com o delineamento composto central rotacional.

Como mostra a Figura 4.33, a concentração de sal, passando do nível inferior para o nível superior, provoca diminuição na variável resposta μ , com qualquer concentração de alho ou de lactato.

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível para a variável resposta μ , considerando-se apenas os efeitos significativos, está apresentada na Equação 4.4:

$$\mu = 0,149 - 0,021*sal - 0,0082*lactato - 0,0063*alho + 0,0092*sal*Pfosfato + 0,0082*Pfosfato*alho \quad (4.4)$$

A Figura 4.34 mostra a curvas de nível para variável resposta λ , para os fatores lactato/Pfosfato, sobre o crescimento de *L. plantarum* com o delineamento composto central rotacional.

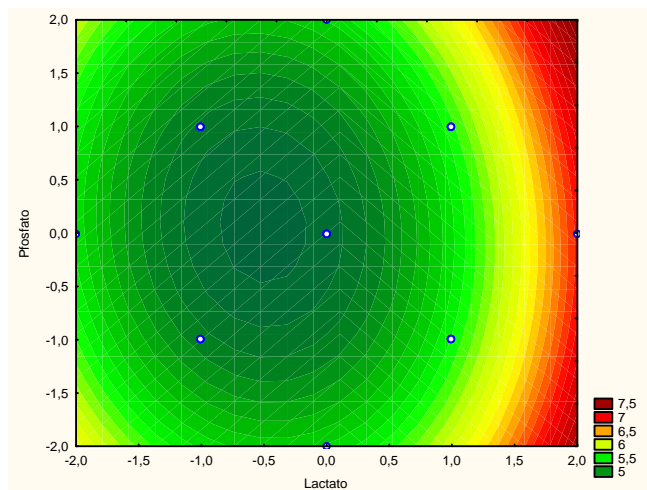


Figura 4.34 Curva de nível para a variável resposta λ para os fatores lactato/Pfosfato, sobre o crescimento de *L. plantarum* com o delineamento composto central rotacional.

Na Figura 4.34, observa-se que a variável resposta λ , apresenta um aumento no seu valor quando a concentração do lactato passa do nível inferior para nível superior. Os demais fatores avaliados neste caso não apresentaram influência significativa. Segundo Devlieghere (2000), a temperatura de armazenamento, a atividade de água e a porcentagem de lactato, podem influenciar no crescimento de *L. plantarum*.

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível para a variável resposta λ , considerando-se apenas os efeitos significativos, está apresentada na Equação 4.5:

$$\lambda = 4,63 + 0,38*lactato + 0,36*lactato^2 + 0,16*Pfosfato^2 + 0,27*sal*lactato + 0,22*lactato*alho \quad (4.5)$$

Após avaliação dos experimentos do delineamento composto central rotacional, com os fatores avaliados (sal, lactato, Pfosfato e alho), o fator que apresentou resultado menos significativo foi o alho, atuando mais intensamente muitas vezes com os outros fatores avaliados, conforme Tabelas 4.11 e 4.14. Sendo assim, não será necessário o estudo

específico deste componente na próxima etapa do trabalho, mas o alho será incluído nas novas formulações propostas, no nível zero, ou seja, na concentração adotada pela indústria, para que possa atuar com suas funções específicas, saborizante, antioxidantes e antimicrobiana (LEUSCHNER & IELSCH, 2003). Os fatores sal, lactato e Pfosfato foram avaliados individualmente e foram selecionados níveis onde estes fatores atuariam com maior eficácia contra o crescimento microbiano, conforme mostram as Figuras 4.33 e 4.34.

Avaliando o crescimento *L.sakey* e *L. plantarum*, com o delineamento composto central rotacional, em diferentes níveis de concentrações dos fatores sal, lactato e Pfosfato, através das equações do modelo da superfície de resposta e da curva de nível das variáveis respostas A , μ e λ , foi possível encontrar níveis de concentrações dos fatores avaliados para que o produto possa ter a vida de prateleira estendida. Na seleção dos níveis de concentração de cada fator, verificou-se a quantidade permitida conforme legislação, e as suas finalidades. O Pfosfato tem por finalidade básica produzir estabilidade aos produtos, e o limite máximo permitido é de 0,5% em conservas de carnes e embutidos cozidos (PARDI et al., 1996). O sal entre as inúmeras finalidades, é utilizado para dar sabor aos produtos, e também na conservação, mas a quantidade deve ser controlada, em função da rejeição sensorial, e dos problemas relacionados com a saúde em altas concentrações. O lactato de sódio pode ser adicionado em quantidades que não interfiram no sabor dos produtos e pesquisas apontam o efeito deste sal para inibir o crescimento de bactérias ácido lácticas (DE WIT & ROMBOUTS, 1990). Baseado na avaliação dos fatores propostos novas formulações podem ser produzidas com maior expectativa de vida de prateleira, desde modo, conforme Tabela 3.4. a concentração de alho deve permanecer no nível zero, mas a concentração de sal pode ser aumentada próxima do nível 1, a concentração do lactato no nível 2 e a concentração de Pfosfato próxima do nível 2, levando em conta o máximo permitido, conforme legislação.

4.4 Avaliação da vida de prateleira da mortadela e da lingüiça defumada com as novas formulações

4.4.1 Produção das novas formulações de mortadela e lingüiça defumada

A partir dos níveis selecionados para os fatores sal, lactato e Pfosfato, no estudo anterior, foram produzidas novas formulações dos produtos mortadela e lingüiça defumada de suíno, variando apenas as concentrações dos fatores acima, conforme Tabela 4.15. A mortadela e a lingüiça defumada foram produzidas com a mesma formulação proposta pela

indústria, com as mesmas matérias-primas cárneas e os mesmos ingredientes usados rotineiramente, variando apenas as concentrações do sal, lactato e de Pfosfato. Duas formulações foram propostas para cada produto, variando entre elas a concentração de sal. As novas formulações foram produzidas na indústria, na mesma linha de produção da formulação padrão que, neste caso, é a formulação adotada pela indústria, produzidas todas no mesmo dia e, em seguida, as novas formulações e a padrão foram armazenadas nas temperaturas de 20, 25 e 30°C. A Tabela 4.15 mostra a proposta das novas formulações para a mortadela e para lingüiça defumada.

Tabela 4.15 Proposta das novas formulações da mortadela e da lingüiça defumada

Fatores	Produtos/Formulação			
	Mortadela1	Mortadela2	Lingüiça1	Lingüiça2
Pfosfato (%)	0,50	0,50	0,50	0,50
Lactato (%)	4,00	4,00	4,00	4,00
Sal (%)	2,82	3,50	2,40	3,50

4.4.2 Avaliação microbiológica e sensorial das novas formulações de lingüiça defumada

4.4.2.1 Avaliação microbiológica das novas formulações de lingüiça defumada

As novas formulações de lingüiça defumada de suíno foram armazenadas a 10°C e, a cada três dias, era retirada uma amostra de cada formulação e avaliada conforme procedimento descrito em 3.4.1 para contagem de bactérias ácido lácticas (MRS). A formulação padrão é a amostra produzida conforme formulação da indústria, a lingüiça defumada 1 e a lingüiça defumada 2 são as formulações descritas na Tabela 4.15.

Na Figura 4.35, estão apresentados os resultados para contagem de bactérias ácido lácticas (MRS), para as novas formulações de lingüiça defumada e da formulação padrão.

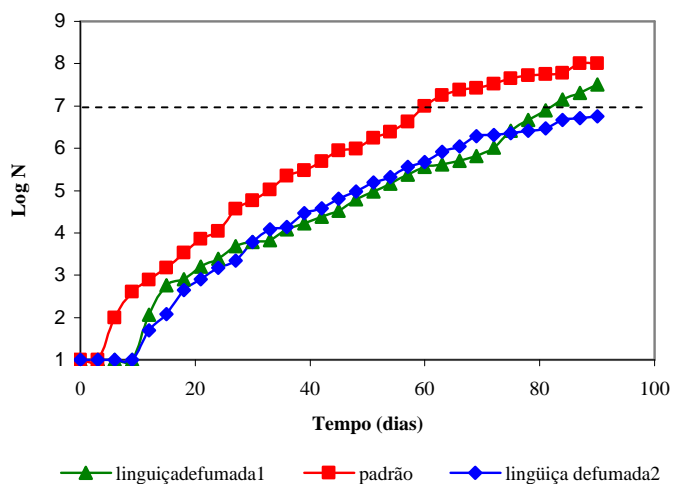


Figura 4.35 Contagem de bactérias ácido lácticas (MRS) para as novas formulações da lingüiça defumada (lingüiça defumada 1 e lingüiça defumada 2) e amostra padrão (padrão), armazenadas à temperatura de 10°C.

Conforme Figura 4.35, observa-se que a duração da fase lag da formulação padrão foi de 3 dias, enquanto que as duas novas formulações de lingüiça defumada propostas, conforme Tabela 4.15, tiveram um ganho de 6 dias, atingindo 9 dias a duração da fase lag. Verifica-se que o crescimento de bactérias ácido lácticas da amostra padrão foi superior às novas formulações da lingüiça defumada, armazenada nas mesmas condições, chegando a contagem de 10^7 UFC/g em sessenta dias. As novas formulações, lingüiça defumada 1 e lingüiça defumada 2, apresentaram crescimento de bactérias ácido láctica similares ao longo do tempo, entretanto a lingüiça defumada 1 atingiu contagem 10^7 UFC/g em noventa dias de armazenamento, que é o tempo indicado pela indústria, e a lingüiça defumada 2 apresentou contagem abaixo de 10^7 UFC/g, no mesmo período de avaliação. Verifica-se que as novas formulações propostas, armazenadas por noventa dias, na temperatura de 10°C, acima daquela indicada pela indústria para os produtos avaliados, apresentaram aumento na duração da fase lag nestas condições. A temperatura de armazenamento influencia no crescimento microbiano, aumentando a temperatura, aumenta a população microbiana, assim como, pode alterar a flora de bactérias ácido lácticas, sendo que, os *Lactobacillus* apresentam maior velocidade de crescimento em temperaturas de acima de 7°C (BORCH et al.,1996). Nesta avaliação, apenas a lingüiça defumada 2 não atingiu a contagem 10^7 UFC/g após noventa dias de armazenamento na temperatura de 10°C, comparada com a formulação lingüiça defumada 1, que obteve a contagem de 10^7 UFC/g em 82 dias na mesma temperatura de armazenamento, que é superior a temperatura indicada pela indústria para estes produtos

(máxima de 8°C). Foi observado também que a contagem microbiana da lingüiça defumada com formulação 2, com 70 dias de armazenamento se encontrava praticamente estabilizada, mas em seguida apresentou um leve aumento até 82 dias, mas não atingindo ainda a contagem de 10^7 UFC/g.

4.4.2.2 Avaliação sensorial das novas formulações da lingüiça defumada

O Teste da Escala Hedônica de 7 pontos, com 4 atributos avaliados (sabor, textura, aroma, cor), com as novas formulações de lingüiça defumada (lingüiça defumada 1 e lingüiça defumada 2), conforme Tabela 4.15, foi realizado semanalmente por 40 julgadores, conforme descrito no item 3.6, e acompanhado até 35º dia (quinta semana) de armazenamento a temperatura de 10°C. Após este período, a amostra padrão apresentava contagem microbiana total próxima de 10^7 UFC/g e sinais de deterioração, logo, a análise sensorial foi encerrada. A amostra padrão, nesta etapa, foi a amostra produzida com a formulação padrão da indústria e armazenada junto com as novas formulações de lingüiça defumada (lingüiça defumada 1 e lingüiça defumada 2), à temperatura de 10°C.

Foram calculados a média e o desvio padrão, das novas formulações de lingüiça defumada (lingüiça defumada 1 e lingüiça defumada 2), e da amostra padrão, em relação aos atributos avaliados. Na Tabela 4.16, estão apresentadas as médias e o desvio padrão da amostra padrão e das novas formulações de lingüiça defumada (lingüiça defumada 1 e lingüiça defumada 2), armazenadas a temperatura de 10°C, avaliadas no teste da Escala Hedônica com os atributos, textura, sabor, aroma e cor.

Tabela 4.16 Médias dos julgamentos dos atributos da amostra padrão e das novas formulações de lingüiça defumada (lingüiça 1 e lingüiça), obtidas após 35 dias de armazenamento a temperatura de 30°C pelo teste da Escala Hedônica de sete pontos.

Amostras	* Média dos julgamentos dos atributos			
	Textura	Cor	Sabor	Aroma
Padrão	5,6 ± 1,2	5,9 ± 1,0	5,8 ± 0,8	5,9 ± 0,9
Lingüiça 1	5,6 ± 1,2	5,8 ± 1,2	5,7 ± 0,9	5,8 ± 0,9
Lingüiça 2	5,2 ± 1,1	5,6 ± 1,0	5,5 ± 1,1	5,6 ± 0,8
Valor p	$2,3 \cdot 10^{-1}$	$2,8 \cdot 10^{-1}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$2,1 \cdot 10^{-1}$

*Média de 40 julgadores - Escala Hedônica: (7) gostei muitíssimo; (6) gostei muito; (5) gostei regularmente; (4) nem gostei nem desgostei; (3) desgostei regularmente; (2) desgostei muito; (1) desgostei muitíssimo

Após análise estatística dos dados, observou-se que houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade apenas em relação ao atributo sabor, devido ao valor de $p < 0,05$. Verifica-se que no atributo sabor, a diferença entre as amostras foi detectada, sendo que a amostra lingüiça defumada 2 obteve a menor média e nas observações foram verificadas sugestões para diminuir a quantidade de sal da amostra. Após avaliação sensorial pode-se concluir que a formulação da lingüiça defumada 1 seria a mais indicada para aumentar a vida de prateleira, comparada com a amostra padrão.

4.4.3 Avaliação microbiológica e sensorial das novas formulações de mortadela

4.4.3.1 Avaliação microbiológica das novas formulações de mortadela

As novas formulações de mortadela (mortadela 1 e mortadela 2) e a amostra padrão foram armazenadas à temperatura de 30°C e, a cada três dias, era retirada uma amostra de cada formulação e avaliada conforme procedimento descrito em 3.4.1 apenas para contagem de bactérias ácido lácticas (MRS).

Na Figura 4.36 estão apresentados os resultados para contagem de bactérias ácido lácticas (MRS), para as novas formulações da mortadela e para a amostra padrão. A amostra padrão é a amostra produzida com a formulação da indústria e as amostras mortadela 1 e mortadela 2 são as formulações propostas, conforme Tabela 4.15.

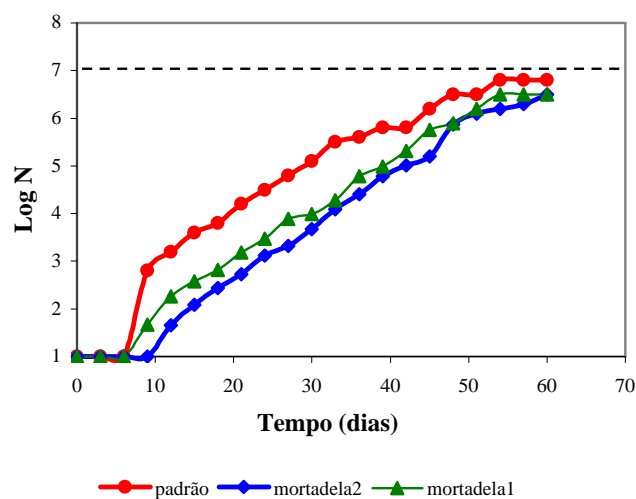


Figura 4.36 Contagem de bactérias ácido lácticas (MRS), para as novas formulações de mortadela (mortadela 1 e mortadela 2) e amostra padrão, armazenadas à temperatura de 30°C.

Na Figura 4.36, observa-se que a duração da fase lag da mortadela 2 foi de 9 dias enquanto que, a duração da fase lag da amostra padrão e da mortadela 1 foi de 6 dias, neste caso, verifica-se que o sal contribuiu para este aumento, já que a mortadela 2, conforme Tabela 4.15, apresenta concentração de sal maior do que a mortadela 1. Observa-se que a amostra padrão apresentou crescimento de bactérias ácido láctica superior às duas novas formulações de mortadela avaliadas, atingindo contagem muito próxima de 10^7 UFC/g, após 60 dias de armazenamento, à temperatura de 30°C. Nas duas novas formulações avaliadas, verifica-se que as mesmas apresentam crescimento de bactérias ácido láctica muito próximo, com uma pequena vantagem para mortadela 1. No entanto, as duas formulações atingem aproximadamente a mesma contagem, 10^6 UFC/g, após 60 de armazenamento à temperatura de 30°C. O sal tem como principal efeito a redução da atividade de água (a_w), além do efeito bacteriostático. Estudos mostram que o lactato de sódio também pode reduzir a atividade de água em produtos cárneos (PAPADOPOULOS et al., 1991). As bactérias ácido lácticas são as principais responsáveis pela deterioração de produtos cárneos, as espécies que podem se desenvolver, dependerá da composição dos produtos, bem como das condições de produção e armazenamento (BORCH et al., 1996).

4.4.3.2 Avaliação sensorial das novas formulações de mortadela

O Teste da Escala Hedônica de 7 pontos, com 4 atributos avaliados (sabor, textura, aroma, cor), com as novas formulações de mortadela (mortadela 1 e mortadela 2), conforme Tabela 4.15, foi realizado semanalmente por 40 julgadores, conforme descrito no item 3.6, e acompanhado até 35° (quinta semana) de armazenamento a temperatura de 30°C. Após estes períodos, a amostra padrão apresentava contagem microbiana total próxima de 10^7 UFC/g e sinais de deterioração, logo, a análise sensorial foi encerrada. A amostra padrão, nesta etapa, foi a amostra produzida com a formulação padrão da indústria e armazenada junto com as novas formulações de mortadela (mortadela 1 e mortadela 2), à temperatura de 30°C.

Foram calculados a média e o desvio padrão das novas formulações de mortadela (mortadela 1 e mortadela 2), e da amostra padrão, em relação aos atributos avaliados. Na Tabela 4.17, estão apresentadas as médias e o desvio padrão da amostra padrão e das novas formulações da mortadela (mortadela 1 e mortadela 2), armazenadas à temperatura de 30°C por 35 dias avaliadas com o Teste da Escala Hedônica através dos atributos, textura, sabor, aroma e cor.

Tabela 4.17 Médias dos julgamentos dos atributos da amostra padrão e das novas formulações de mortadela (mortadela 1 e mortadela 2), obtidas após 35 dias de armazenamento a temperatura de 30°C pelo teste da Escala Hedônica de sete pontos.

Amostra	* Média dos julgamentos dos atributos			
	Textura	Cor	Sabor	Aroma
Padrão	5,8± 0,9	6,1±1,0	5,7±1,1	5,8±1,1
Mortadela 1	5,8 ±1,0	5,9±1,1	5,6±1,1	5,6±1,1
Mortadela 2	5,6±1,0	6,0±1,1	5,2±1,4	5,4±1,0
Valor p	1,0.10 ⁻¹	1,1.10 ⁻¹	8,9.10 ⁻³	2,8.10 ⁻¹

*Média de 40 julgadores - Escala Hedônica: (7) gostei muitíssimo; (6) gostei muito; (5) gostei regularmente; (4) nem gostei nem desgostei; (3) desgostei regularmente; (2) desgostei muito; (1) desgostei muitíssimo.

Após análise estatística dos dados, observou-se que houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade apenas em relação ao atributo sabor, devido ao valor de $p < 0,05$. O atributo sabor foi determinante na seleção da nova formulação. Observa-se que das médias das amostras avaliadas, a mortadela 2 foi a que apresentou a menor média, além de sugestões adicionais na ficha de avaliação, para diminuir a quantidade de sal.

A atuação dos fatores sal, lactato e Pfosfato foram importantes na vida de prateleira da mortadela, o sal tem sua função específica, mas aumentando a quantidade utilizada na formulação dos produtos, pode-se deparar com o problema de saúde do consumidor que este aumento poderia causar, além da rejeição do produto devido ao sabor. O lactato e o Pfosfato assim como o sal podem diminuir a atividade de água do produto. Observa-se que a nova formulação, a mortadela 1, onde apenas os fatores lactato e Pfosfato foram alterados em relação à amostra padrão, promoveu melhorias na avaliação microbiológica dos produtos quando comparados com a amostra padrão, durante o armazenamento a temperatura de 30°C. Como o resultado do crescimento de bactérias lácticas nas novas formulações 1 e 2 da mortadela foram próximos, optou-se pela continuidade dos estudos com a mortadela de formulação 1 por esta apresentar menor teor de sal, o que é interessante do ponto de vista sensorial e de saúde pública.

Dos dois produtos cárneos, mortadela e lingüiça defumada, avaliados através do acompanhamento da qualidade das matérias-primas, da produção, da vida de prateleira em diferentes temperaturas de armazenamento, das novas formulações, da análise sensorial, a mortadela 1 e a lingüiça defumada 1 foram selecionadas como propostas de novas formulações que apresentaram maior expectativa de vida de prateleira, comparadas com a

formulação padrão. A indústria indica para a mortadela o armazenamento em temperatura ambiente e para lingüiça defumada, armazenamento a temperatura máxima de 8°C,

4.5 Armazenamento isotérmico da mortadela padrão e mortadela 1

Em função do grande número de experimento e o tempo necessário pra realização dos mesmos, foi selecionada entre os dois produtos testados, (mortadela e lingüiça defumada) a mortadela para a continuidade deste trabalho. A modelagem do crescimento microbiano e a avaliação em armazenamento sob variação de temperatura (armazenamento não isotérmico), foi realizada apenas com o produto cárneo mortadela, avaliando o produto com formulação padrão e com a nova formulação selecionada, mortadela 1. A formulação da mortadela 1 foi selecionada para a continuidade do trabalho, após avaliação microbiológica e sensorial, levando em consideração também a concentração do sal. As mudanças propostas na formulação, concentração de lactato e de Pfosfato, estão dentro dos padrões permitidos pela legislação.

Neste trabalho foi avaliado o crescimento microbiano da mortadela padrão e da mortadela 1 em armazenamento isotérmico não isotérmico. O Modelo Não Isotérmico que foi testado neste trabalho é o de Corradini & Peleg (2005) e Corradini et al., (2006). Este modelo requer a avaliação e o conhecimento da influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento, devido a isso, foram selecionadas três temperaturas diferentes para avaliação da vida de prateleira da mortadela padrão e mortadela 1 .O Modelo Não Isotérmico que foi testado neste trabalho requer a obtenção dos parâmetros de crescimento através do Modelo Logístico Modificado, logo este modelo foi incluído neste trabalho

4.5.1 Influência da temperatura no crescimento microbiano da mortadela padrão e mortadela 1 em armazenamento isotérmico.

A formulação selecionada mortadela 1, e amostra padrão foram submetidas a três temperaturas de armazenamento, 20, 25 e 30°C . A cada três dias, era retirada uma amostra de cada produto armazenado e avaliada conforme procedimento descrito em 3.4.1 apenas para contagem de bactérias ácido lácticas (MRS).

A Figura 4.37 mostra o resultado da contagem de bactéria ácido lácticas para a formulação da mortadela 1, armazenada nas diferentes temperaturas constantes.

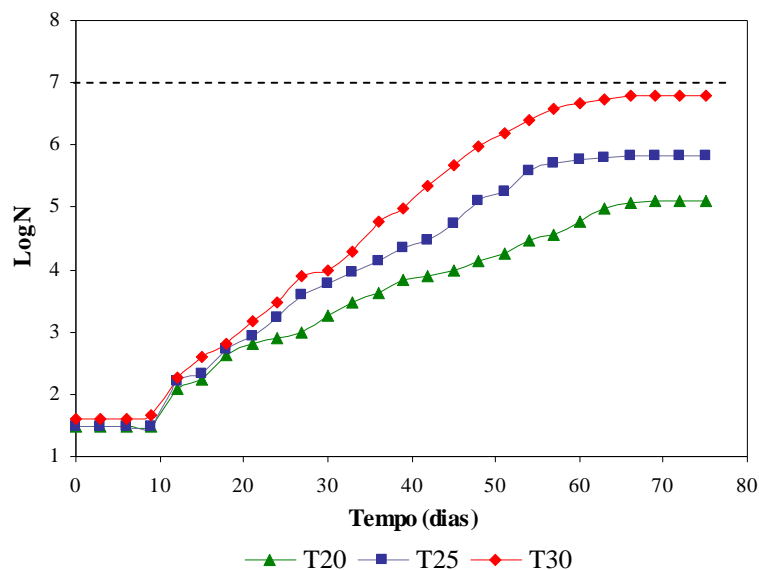


Figura 4.37 Contagem de bactérias ácido lácticas para mortadela 1 armazenada em condições isotérmicas de 20, 25 e 30 °C.

Observa-se que as amostras da mortadela 1 armazenadas nas três temperaturas diferentes, após 60 dias, que é tempo indicado pela indústria para vida de prateleira da mortadela, não atingiram a contagem de 10^7 UFC/g bactérias ácido lácticas, que é considerada máxima, sob ponto de vista microbiológico. Quando as amostras foram armazenadas nas temperaturas de 20 e 25°C, atingiram a contagem microbiana de aproximadamente 10^5 UFC/g e 10^6 UFC/g, respectivamente. O tempo para alcançar a contagem 10^7 UFC/g, e a evidente deterioração é influenciada pela temperatura de armazenamento, quanto maior a temperatura de armazenamento, menor o tempo para se observar deterioração (BORCH et al., 1996). Segundo Hugas (1998) as bactérias ácido lácticas também podem interferir na multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas por vários mecanismos diferentes, como a competição de nutrientes e oxigênio, produção de substâncias como ácido láctico, ácido acético, acetoina, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, alterando a vida de prateleira dos produtos. A qualidade de um produto alimentício e sua vida útil é fortemente dependente do histórico da temperatura, desde a produção, distribuição e armazenamento, até chegar ao consumidor (TAOUKIS & LABUZA, 1989).

A Figura 4.38 mostra o resultado da contagem de bactéria ácido lácticas para a formulação padrão de mortadela, armazenada nas temperaturas de 20, 25 e 30°C.

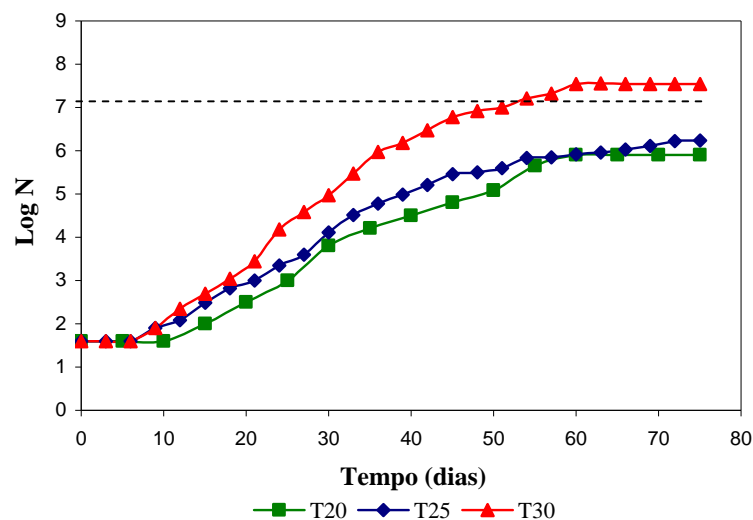


Figura 4.38 Contagem de bactérias ácido lácticas para formulação padrão da mortadela, armazenada em condições isotérmicas de 20, 25 e 30°C.

Verifica-se que nas amostras com a formulação padrão, avaliadas nas três diferentes temperaturas de armazenamento, durante aproximadamente 60 dias, apenas as amostras armazenadas a temperatura de 30°C atingiram a contagem 10^7 UFC/g bactérias ácido lácticas, antes do período indicado pela indústria. As amostras com a formulação padrão armazenadas a temperatura e 20 e 25°C, atingiram contagem 10^6 UFC/g bactérias ácido lácticas com aproximadamente 60 dias de armazenamento. A temperatura é um fator que afeta diretamente o crescimento microbiano.

A nova formulação proposta, mortadela 1, comparada com a amostra com formulação padrão apresentou diferenças significativas, durante o armazenamento nas mesmas condições. A mortadela 1 e a formulação com amostra padrão foram avaliadas com os modelos de Gompertz Modificado, Logístico e Logístico Modificado, ajustadas aos dados experimentais para a obtenção dos parâmetros de crescimento, através do *Software Statistica 6.0*. O Modelo Logístico Modificado foi incluído na avaliação pois o Modelo Não Isotérmico proposto por Corradini & Peleg (2005) e Corradini et al., (2006). testado neste trabalho, utiliza o mesmo.

4.5.2 Modelagem do crescimento microbiano da mortadela com formulação padrão em armazenamento isotérmico.

As amostras com a formulação padrão conforme Tabela 4.15 foram armazenadas nas temperaturas constantes 20, 25 e 30°C, e a vida de prateleira acompanhada através da contagem de bactérias ácido lácticas até a fase estacionária, conforme mostrado na Figura 4.38. Os parâmetros de crescimento foram estimados utilizando-se os Modelo de Gompertz Modificado, Modelo Logístico Modificado e o Modelo Logístico, através do *Software* Estatística 6.0. A escolha do modelo que apresentou melhor ajuste foi realizada através da avaliação dos índices estatísticos: coeficiente de determinação (R^2), MSE, Fator Bias e Fator de Exatidão. A Figura 4.39 mostra as curvas de crescimento do experimento com a formulação padrão da mortadela, armazenada na temperatura de 30°C, obtidas com os Modelos Gompertz Modificado (1) e Logístico Modificado (2).

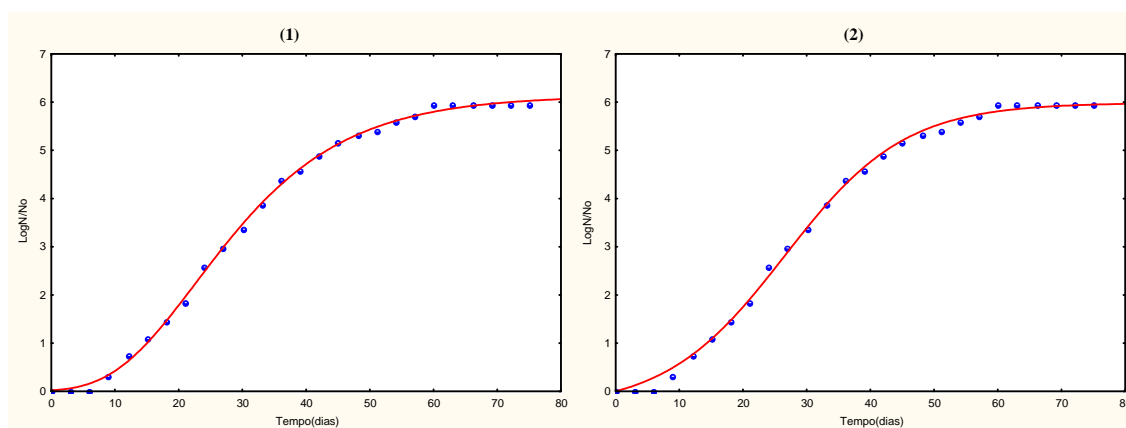


Figura 4.39 Curvas de crescimento do experimento com a formulação da mortadela padrão, armazenada a temperatura de 30°C, obtidas com os Modelos de Gompertz Modificado (1) e Logístico Modificado (2).

Na Figura 4.40 observam-se as curvas de crescimento do experimento com a formulação padrão da mortadela, armazenada na temperatura de 20°C, obtidas com os Modelo Logístico (1) e Logístico Modificado (2).

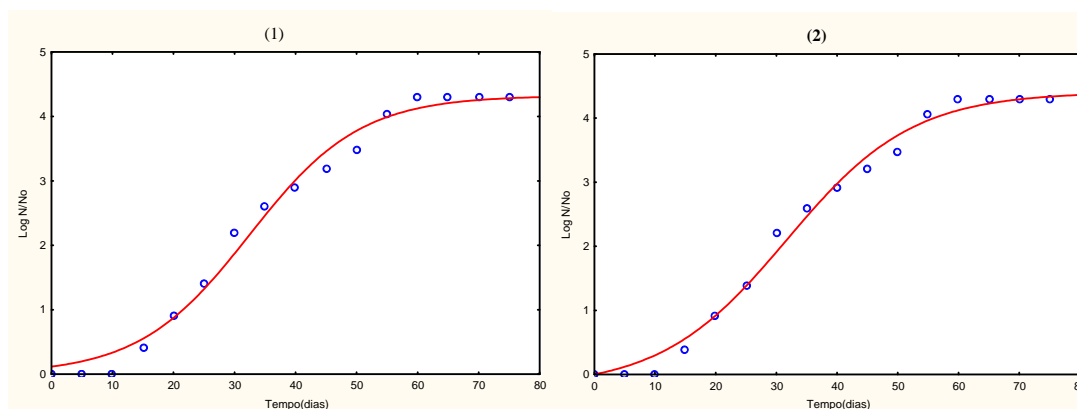


Figura 4.40 Curva de crescimento do experimento com a formulação da mortadela padrão, armazenada na temperatura de 20°C, obtidas com o Modelo Logístico (1) e Modelo Logístico Modificado (2).

Os Modelos de Gompertz Modificado, Logístico e Logístico Modificado, utilizados para a obtenção do ajuste das curvas de crescimento da formulação padrão da mortadela, foram comparados e avaliados estatisticamente através dos índices estatísticos: coeficiente de determinação (R^2), erro médio quadrático (MSE), fator bias e fator de exatidão. Na Tabela 4.18 estão apresentados os índices estatísticos para formulação da mortadela padrão armazenada nas temperaturas de 20, 25 e 30°C, para avaliação dos modelos de Gompertz Modificado, Logístico e Logístico Modificado.

Tabela 4.18 Valores dos índices, erro médio quadrático (MSE), coeficiente de determinação (R^2), fator bias e fator de exatidão, para os Modelos de Gompertz Modificado, Logístico e Logístico Modificado, da formulação padrão da mortadela, armazenada nas temperaturas de 20, 25 e 30°C.

Índices	Temperaturas / modelos matemáticos								
	20°C			25°C			30°C		
	GM	LG	LGM	GM	LG	LGM	GM	LG	LGM
R²	0,9930	0,9884	0,9912	0,9942	0,9874	0,9972	0,9988	0,9952	0,9978
MSE	0,0257	0,0411	0,0299	0,0061	0,0268	0,0070	0,0078	0,0233	0,0104
F.bias	1,0116	0,9972	0,9924	1,0042	1,0111	1,0683	1,0064	0,8732	0,9931
F.exat.	1,0220	1,0316	1,0279	1,0128	1,0315	1,0936	1,0514	1,0194	1,0144

GM: Modelo Gompertz Modificado; LG: Modelo Logístico; LGM: Modelo Logístico Modificado.

R^2 : Coeficiente de determinação; MSE: Erro médio quadrático; F.bias: Fator bias; F.exat: Fator de exatidão.

Conforme Tabela 4.18, os valores de MSE para os três modelos avaliados nas temperaturas de 20 e 25°C e 30°C, demonstraram que o Modelo de Gompertz Modificado e o Modelo Logístico Modificado apresentaram ajustes similares, ou seja, melhor predição dos dados de crescimento com os menores valores, comparados com o Modelo Logístico. Os valores do Fator bias para os modelos avaliados nas temperaturas de 20 e 25°C foram muito próximos de 1 indicando que a resposta observada foi igual à predita. Na temperatura de 30°C os valores do Fator bias para os Modelos de Gompertz Modificado e Logístico Modificado indicaram ajustes similares, com o Modelo Logístico na mesma temperatura o Fator bias menor que 1, indicou que o valor predito foi menor que o observado.

Com os valores do Fator de exatidão muito próximos de 1, nas temperaturas de 20°C, 25 e 30°C indica que todos os modelos avaliados apresentam boa exatidão, sendo que quanto maior o valor deste índice, menor será a exatidão.

Os valores de R^2 obtidos nas condições propostas, demonstram que entre os modelos avaliados existe uma boa correlação entre os dados. Estes índices estatísticos são considerados ferramentas importantes na determinação da performance dos modelos (NEUMEYER et al., 1997).

Pode-se considerar que, pela avaliação dos índices estatísticos calculados para a avaliação dos Modelos de Gompertz Modificado, Logístico e Logístico Modificado, da formulação padrão da mortadela armazenadas nas temperaturas de 20, 25 e 30°C, o Modelo Logístico Modificado, e o Modelo de Gompertz Modificado apresentaram vantagens significativas sobre o Modelo Logístico. Os parâmetros de crescimento para avaliação da mortadela com a formulação padrão foram obtidos com o Modelo de Gompertz Modificado e com o Modelo Logístico Modificado.

Na Tabela 4.19 observam-se os parâmetros de crescimento microbiológicos, velocidade máxima de crescimento (μ), aumento logarítmico da população (A), duração da fase lag (λ), aumento logarítmico da população (k), aumento logarítmico da população (a) e ponto de inflexão na curva de crescimento (t_c), estimados utilizando o Modelo de Gompertz Modificado, e o Modelo Logístico Modificado, através do *Software* Statistica 6.0, para a formulação padrão da mortadela.

Tabela 4.19 Parâmetros de crescimento microbiológicos para formulação padrão da mortadela, armazenada nas temperaturas de 30, 25 e 20°C, obtidos pelo ajuste do Modelo de Gompertz Modificado e Modelo Logístico Modificado.

T °C	Modelo Gompertz Modificado			Modelo Logístico Modificado		
	A	μ (1/dia)	λ (dia)	a	k(1/dia)	tc(dia)
30	6,135	0,174	9,796	6,339	0,106	26,577
25	4,919	0,122	10,580	4,881	0,097	27,112
20	4,490	0,120	13,439	4,611	0,097	31,695

A - aumento logarítmico da população; μ - velocidade máxima de crescimento; λ - duração da fase lag; a - aumento logarítmico da população; k - velocidade máxima de crescimento; tc : ponto de inflexão na curva.

Observa-se na Tabela 4.19 que os parâmetros de crescimento A e μ do Modelo de Gompertz Modificado são correspondentes aos parâmetros a e k do Modelo Logístico Modificado, sendo que os mesmos aumentam com o aumento da temperatura, verifica-se também que no Modelo Logístico Modificado os valores dos parâmetros avaliados são menores. Existe uma proporcionalidade entre λ (duração da fase lag) do Modelo Gompertz Modificado e tc (ponto que inflexão na curva) do Modelo Logístico Modificado, pois este último inclui a fase lag e a variação dos parâmetros diminui com o aumento da temperatura.

4.5.3 Modelagem do crescimento microbiano da mortadela 1 em armazenamento isotérmico.

As amostras com a formulação da mortadela 1 conforme Tabela 4.15 foram armazenadas nas temperaturas constantes de 20, 25 e 30°C, e a vida de prateleira acompanhada através da contagem de bactérias ácido lácticas até a fase estacionária, conforme mostrada na Figura 4.37. Os parâmetros de crescimento foram estimados utilizando-se os Modelo de Gompertz Modificado, Modelo Logístico Modificado e o Modelo Logístico, através do *Software* Statistica 6.0. A escolha do modelo que apresentou melhor ajuste foi realizada através da avaliação dos índices estatísticos MSE, Fator bias e Fator de exatidão. A Figura 4.41 mostra as curvas de crescimento do experimento com a formulação da mortadela 1, armazenada na temperatura de 30°C, obtidas com os Modelos Gompertz Modificado (1) e Logístico Modificado (2).

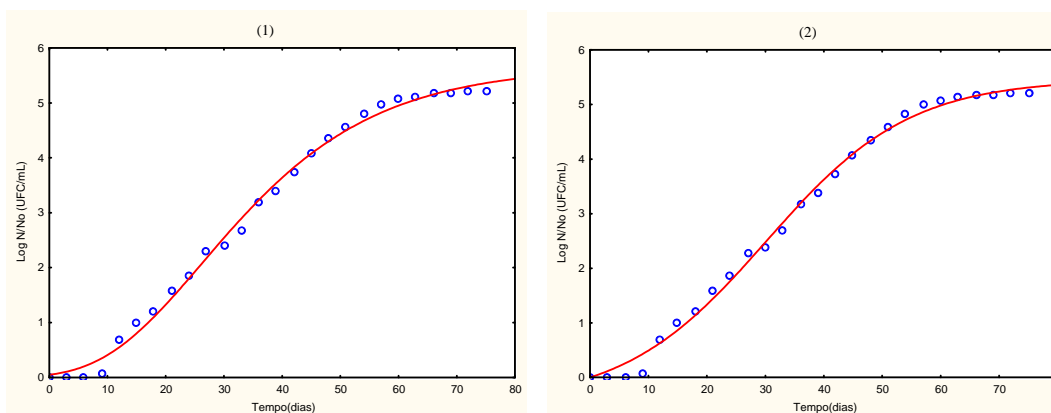


Figura 4.41 Curvas de crescimento do experimento com a formulação da mortadela 1, armazenada na temperatura de 30°C, obtidas com os Modelos Gompertz Modificado (1) e Logístico Modificado (2).

Na Figura 4.42, observam-se as curvas de crescimento do experimento com a formulação da mortadela 1, armazenada na temperatura de 25°C, obtidas com os Modelos Logístico (1) e Logístico Modificado (2).

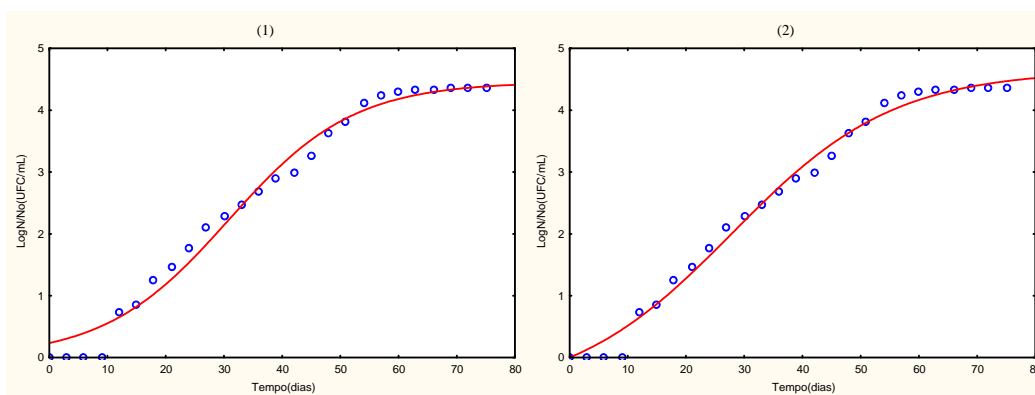


Figura 4.42 Curvas de crescimento do experimento com a formulação da mortadela 1, armazenada na temperatura de 25°C e obtidas com os Modelos Logístico (1) e Logístico Modificado (2).

Os Modelos de Gompertz Modificado, Logístico e Logístico Modificado, utilizados para a obtenção do ajuste das curvas de crescimento, da formulação da mortadela 1, foram comparados e avaliados estatisticamente, através dos índices estatísticos: coeficiente de determinação (R^2), erro médio quadrático (MSE), fator bias e fator de exatidão. Na Tabela 4.20 estão apresentados os índices estatísticos para formulação da mortadela 1 armazenada

nas temperaturas de 20, 25 e 30°C, para avaliação dos modelos de Gompertz Modificado, Logístico e Logístico Modificado.

Tabela 4.20 Valores dos índices estatísticos, erro médio quadrático (MSE), coeficiente de determinação (R^2), fator bias e fator de exatidão, para os Modelos de Gompertz Modificado, Logístico e Logístico Modificado, da formulação da mortadela 1, armazenada nas temperaturas de 20, 25 e 30°C.

Índices	Temperaturas/ modelos matemáticos								
	20°C			25°C			30°C		
	GM	LG	LGM	GM	LG	LGM	GM	LG	LGM
R²	0,9850	0,9737	0,9874	0,9902	0,9836	0,9906	0,9952	0,9918	0,9958
MSE	0,0283	0,0509	0,0404	0,0261	0,0456	0,0258	0,0195	0,032	0,0176
F. bias	1,0122	1,0143	0,9972	1,0107	1,0148	1,0073	0,9813	0,9738	0,9744
F. exat	1,0252	1,0305	1,0239	1,0107	1,0148	1,0170	1,0189	1,0268	1,0262

GM: Modelo Gompertz Modificado; LG: Modelo Logístico; LGM: Modelo Logístico Modificado.

R^2 : Coeficiente de determinação; MSE: Erro médio quadrático; F.bias: Fator bias; F.exat: Fator de exatidão.

Conforme Tabela 4.20, os valores do MSE para os três modelos avaliados nas temperaturas de 20, 25 e 30°C demonstram que os Modelos de Gompertz Modificado e Logístico Modificado apresentam a melhor predição dos dados de crescimento em todas temperaturas avaliadas, com valores menores quando comparados com o Modelo Logístico.

Com o Fator bias observa-se comportamento semelhante, quando da avaliação nas temperaturas de 20 e 25°C os valores se apresentaram muito próximos de 1 para os três modelos avaliados, indicando bom ajuste aos dados experimentais. Na temperatura de 30°C verifica-se que o Fator bias foi menor que 1, indicando que o valor predito é menor que o valor observado para os três modelos avaliados.

Os valores do Fator de exatidão indicam que os modelos avaliados nas temperaturas de 20, 25 e 30°C apresentam em média, respostas preditas que diferem das observadas para os Modelos Gompertz Modificado, Logístico e Logístico Modificado, respectivamente. Os valores de R^2 avaliados nas condições propostas, demonstram que entre os modelos existe uma boa correlação entre os dados, com pequena diferença entre os valores, mas em todas as temperaturas avaliadas o Modelo Logístico Modificado sempre apresentou o valor mais próximo de 1, seguido do Modelo de Gompertz Modificado, indicando assim, maior correlação entre os dados.

Pode-se concluir pela avaliação dos índices estatísticos calculados, para a comparação dos Modelos de Gompertz Modificado, Logístico e Logístico Modificado, da formulação da mortadela 1, armazenada nas temperaturas de 20, 25 e 30°C, que o Modelo Logístico Modificado, e o Modelo de Gompertz Modificado apresentaram vantagens significativas sobre o Modelo Logístico. Os parâmetros de crescimento para avaliação com a formulação da mortadela 1 foram obtidos com o Modelo de Gompertz Modificado e com o Modelo Logístico Modificado. Na Tabela 4.21 observam-se os parâmetros de crescimento microbiológicos, velocidade máxima de crescimento (μ), aumento logarítmico da população (A), duração da fase lag (λ), aumento logaritmo da população (k), aumento logarítmico da população (a) e ponto de inflexão na curva de crescimento (tc), estimados utilizando o Modelo de Gompertz Modificado, e o Modelo Logístico Modificado, através do *Software* Statística 6.0, para a formulação da mortadela 1.

Tabela 4.21 Parâmetros de crescimento microbiológicos para nova formulação da mortadela 1, armazenada nas temperaturas de 30, 25 e 20°C, obtidos pelo ajuste do Modelo de Gompertz Modificado, e Modelo Logístico Modificado.

T °C	Modelo Gompertz Modificado			Modelo Logístico Modificado		
	A	μ (1/dia)	λ (dia)	a	k(1/dia)	tc (dia)
30	5,668	0,124	5,196	5,929	0,081	25,539
25	5,338	0,097	7,554	5,264	0,072	27,912
20	3,484	0,069	9,430	5,098	0,043	30,173

A - aumento logarítmico da população; μ - velocidade máxima de crescimento; λ - duração da fase lag; a - aumento logarítmico da população; k - velocidade máxima de crescimento; tc : ponto de inflexão na curva.

Observa-se na Tabela 4.21 que os parâmetros de crescimento A e μ do Modelo de Gompertz Modificado são correspondentes aos parâmetros a e k do Modelo Logístico Modificado, sendo que os mesmos aumentam com o aumento da temperatura, verifica-se também que no Modelo Logístico Modificado os valores do parâmetro k são menores quando comparados com μ . Existe uma proporcionalidade entre λ (duração da fase lag) do Modelo Gompertz Modificado e tc (ponto que inflexão na curva) do Modelo Logístico Modificado, pois este último inclui a fase lag e a variação destes parâmetros diminui com o aumento da temperatura.

4.6 Armazenamento não isotérmico da mortadela padrão e da mortadela 1

Um dos mais importantes fatores ambientais que afetam diretamente o crescimento microbiano em alimentos é a temperatura. A temperatura dos alimentos durante a estocagem, distribuição, armazenamento, desde a produção até chegar ao consumidor, está constantemente sujeita a alterações. Um modelo efetivo que possa descrever o crescimento microbiano sobre condições dinâmicas de temperatura, ou seja, com variação de temperatura, é necessário para aplicação prática (FUJIKAWA et al., 2004). Nos últimos anos pesquisadores estão direcionando a modelagem matemática para obtenção de modelos que possam prever a vida de prateleira dos alimentos em condições de temperatura flutuante, mas ainda são poucas aplicações disponíveis. Para que os modelos possam ser aplicados a alimentos armazenados em condições reais, quer dizer, condições onde a temperatura varia com o tempo, devem ser consideradas no modelo o efeito das mudanças das variáveis externas sobre o crescimento microbiano, com o objetivo de obter predições mais precisas para assegurar a vida útil dos mesmos (CAYRÉ et al., 2003). Os produtos indicados para armazenamento à temperatura ambiente, em função das variações de temperatura ocasionadas por influência do dia e da noite, da região onde será comercializado, pelo local de exposição para comercialização, podem sofrer alterações que poderiam provocar variações na composição, na população microbiana, que levariam a degradação precoce, conseqüentemente a diminuição da vida de prateleira. Neste trabalho foi realizado um estudo da vida de prateleira da mortadela em condições isotérmica e não isotérmica, e neste caso as amostras da formulação padrão e da mortadela 1 foram armazenadas 12 horas à temperatura de 20°C e 12 horas à temperatura de 30°C, e avaliadas em intervalos de tempo pré-selecionado para contagem de bactérias ácido lácticas (MRS), conforme procedimento descrito, em 3.4.1.

4.6.1 Descrição do perfil de temperatura para armazenamento não isotérmico

Para aplicação do Modelo não Isotérmico foi necessário descrever o perfil de temperatura dos produtos avaliados durante o armazenamento. Este perfil de temperatura foi descrito por duas equações, pois no armazenamento as amostras de mortadela com a formulação padrão e as amostras com a nova formulação, mortadela 1, eram submetidas à variação de temperatura em intervalos de tempo constantes. As amostras permaneciam

armazenadas a temperatura de 20°C por 12 horas, em seguida retiradas e levadas ao armazenamento à temperatura de 30°C por mais 12 horas e assim sucessivamente.

O perfil de temperatura descrito foi obtido através das equações 3.4, 3.5 e 3.6, conforme item 3.10. O perfil de temperatura obtido com as equações propostas foi determinado em função do tempo com as equações 4.6 e 4.7.

$$T = 30 - 10 \left(- \left(\frac{1}{1,15} \right)^{*t+1,31} \right) \quad 4.6$$

$$T = 20 + 10 \left(- \left(\frac{1}{1,15} \right)^{*t+1,02} \right) \quad 4.7$$

Onde:

T = Temperatura (°C)

t = Tempo (h)

Com as equações propostas, foi possível obter a variação da temperatura com o tempo em cada etapa do armazenamento, possibilitando descrever um perfil de temperatura para o armazenamento da mortadela com a formulação padrão e mortadela 1 através das Equações 4.6 e 4.7. Para melhor visualização do perfil de temperatura descrito, o mesmo foi apresentado na Figura 4.43 por apenas 300 horas não com as duas mil cento e sessenta horas de acompanhamento das amostras.

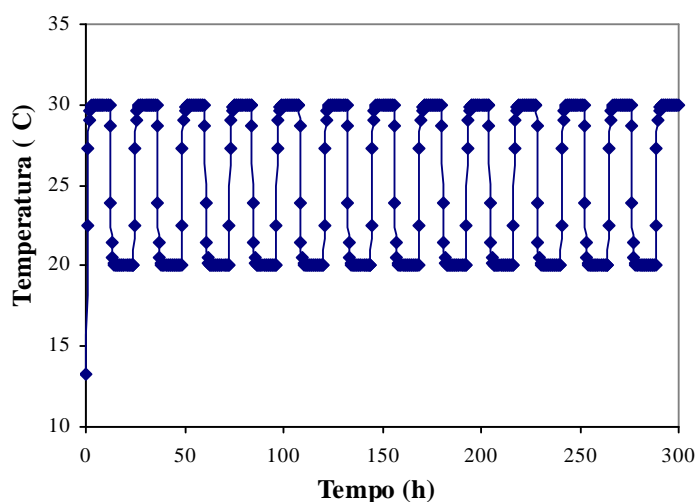


Figura 4.43 Perfil de temperatura descrito para o armazenamento não isotérmico da mortadela com formulação padrão e mortadela 1.

4.6.2 Avaliação do crescimento microbiano da mortadela com formulação padrão e da mortadela 1 em armazenamento não isotérmico.

Após avaliação da formulação da mortadela padrão e da mortadela 1 em armazenamento isotérmico em três diferentes temperaturas, conforme descrito no item 4.5, as mesmas foram avaliadas em armazenamento não isotérmico. As amostras da formulação padrão e da mortadela 1 foram produzidas na indústria no mesmo dia, com as mesmas matérias-primas e, em seguida, armazenadas por aproximadamente noventa dias. A mortadela com formulação padrão e a mortadela 1, armazenadas em condições de variação de temperatura, foram avaliadas periodicamente, através da contagem de bactérias ácido lácticas. Na Figura 4.44 estão apresentados os resultados para contagem de bactérias ácido lácticas (MRS) da formulação padrão da mortadela e da nova formulação, mortadela 1, em armazenamento não isotérmico.

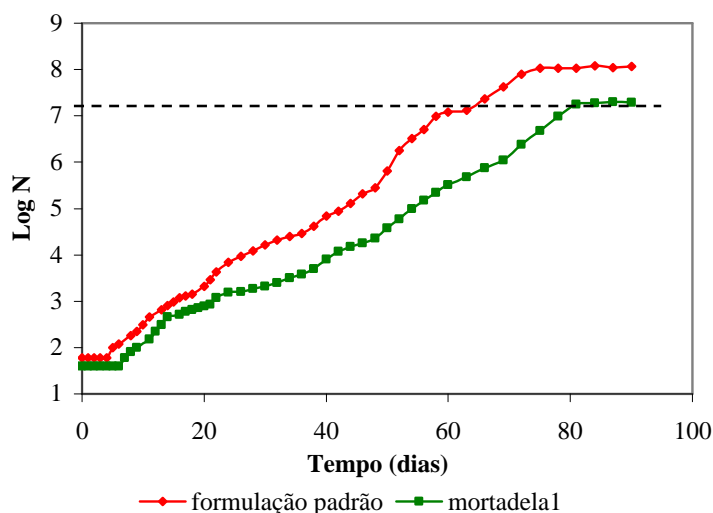


Figura 4.44 Contagem de bactérias ácido lácticas (MRS) para a formulação da mortadela padrão e da mortadela 1, em armazenamento não isotérmico.

Conforme Figura 4.44 verifica-se que com a mortadela com a formulação padrão em armazenamento não isotérmico, a duração da fase lag foi de 4 dias e atingiu a contagem 10^7 UFC/g em cinquenta e oito dias. Com a nova formulação, mortadela 1, houve um aumento de 2 dias na duração da fase lag, alcançando 6 dias, e a vida de prateleira da mortadela 1, apresentou um ganho de vinte e dois dias, também em armazenamento não isotérmico.

Para se avaliar a influência das condições de armazenamento no crescimento de bactérias ácido lácticas, na Figura 4.45 observam-se as curvas de crescimento microbiano para mortadela padrão armazenada à temperatura de 20 e 30°C, e em armazenamento não isotérmico.

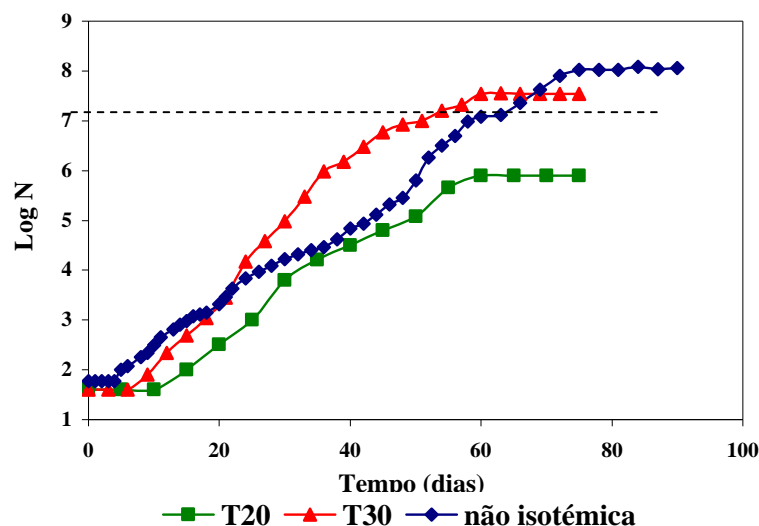


Figura 4.45 Contagem de bactérias ácido lácticas (MRS) da formulação padrão da mortadela com armazenamento isotérmico e não isotérmico.

Na Figura 4.45 pode-se observar que o produto em armazenamento isotérmico 30°C com 51 dias atinge a contagem de 10^7 UFC/g, enquanto que, a temperatura de 20°C não atinge a contagem máxima sob o ponto de vista microbiológico na duração da vida de prateleira indicada pela indústria. A duração da fase lag da mortadela padrão foi de 10, 6 e 4 dias quando da avaliação em armazenamento à temperatura de 20 e 30°C e em condições não isotérmica, respectivamente. Pode-se verificar que a variação de temperatura no armazenamento provocou uma diminuição na duração da fase lag da mortadela padrão, comparada com o armazenamento à temperatura isotérmica. Com o armazenamento não isotérmico verifica-se que a mortadela padrão atingiu a contagem 10^7 UFC/g em cinquenta e oito dias, quando se observa uma desaceleração que poderia indicar o início da fase estacionária mas, em seguida, ocorre novamente um aumento da população microbiana. Este fato pode ser decorrente do crescimento de algum microrganismo que se adaptou às condições expostas, ou ainda, diante da variação de temperatura no armazenamento, pode ter ocorrido o fenômeno da homeostase. A homeostasia é um processo de auto-regulagem, pelo qual os sistemas biológicos, como células e microrganismos, trabalham para a manutenção de sua

estabilidade pelo ajuste das condições necessárias para um ótimo de sobrevivência sob variação de pH, temperatura, atividade de água, etc. (FEEMA, 1990). Conseqüentemente, este auto-ajuste pode levar a que o microrganismo atinja uma população mais elevada em condições variáveis de temperatura do que em condições isotérmicas.

Na Figura 4.46 observam-se as curvas de crescimento microbiano para mortadela 1 armazenada à temperatura de 20 e 30°C, e em armazenamento não isotérmico.

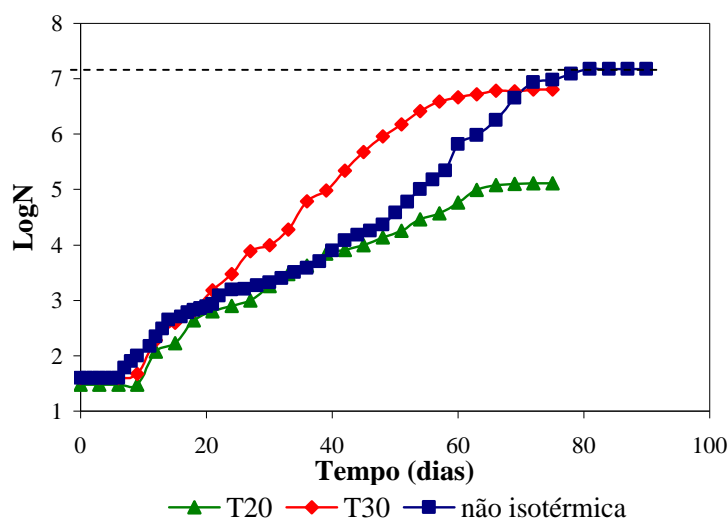


Figura 4.46 Contagem de bactérias ácido lácticas (MRS) da formulação da mortadela 1 com armazenamento isotérmico e não isotérmico.

Conforme se observa na Figura 4.46 a duração da fase lag para a mortadela 1 foi de 9, 6 e 7 dias em armazenamento a temperatura de 20 e 30°C e em condições não isotérmicas, respectivamente. Verifica-se que, em aproximadamente 20 dias de armazenamento nas temperaturas de 20 e 30°C e em armazenamento não isotérmico, a contagem de bactérias ácido lácticas para a mortadela 1 foi muito próxima. Após 20 dias de armazenamento, a mortadela 1 armazenada à temperatura de 30°C apresentou crescimento microbiano maior comparado com o armazenamento à temperatura de 20°C e em condição não isotérmica. Mas, após 40 dias em armazenamento isotérmico, a mortadela 1 apresentou crescimento microbiano crescente, atingindo contagem de bactérias ácido lácticas maior comparada com a mortadela 1 armazenada à temperatura de 30°C, ao final de aproximadamente 70 dias. Neste caso, também se observou a desaceleração do crescimento em 60 dias mas, em seguida,

ocorreu a continuidade do crescimento microbiano atingindo a fase estacionária em 75 dias, que pode ser decorrente do mesmo fenômeno citado para armazenamento da mortadela padrão, a homeostase.

Alimentos expostos durante o armazenamento à variação de temperatura, umidade relativa, luz, podem apresentar velocidade nas reações de deterioração diferentes daquelas observadas quando armazenadas em condições constantes. Em geral, é reconhecido que a perda da qualidade é maior quando há flutuação de temperatura, do que quando o produto é mantido a temperatura igual à média da variação da temperatura (MOURA & GERMER, 2004). A temperatura é um dos fatores ambientais que mais afetam o crescimento bacteriano em alimentos. A temperatura de armazenamento e distribuição dos alimentos está constantemente sujeita a alterações, é necessário a aplicação de um modelo efetivo que possa descrever o crescimento microbiano sob condições práticas (FUJIKAWA et al.,2004).

4.6.3 Modelo Não Isotérmico

Neste trabalho, a partir dos dados experimentais obtidos com a avaliação da mortadela em armazenamento isotérmico em diferentes temperaturas, os Modelos de Gompertz Modificado, Logístico e Logístico Modificado foram testados e avaliados para descrição dos parâmetros de crescimento. A mortadela padrão e a mortadela 1 foram avaliadas também em armazenamento não isotérmica e o Modelo não Isotérmico citado acima foi testado conforme descrito. O trabalho de Corradini & Peleg (2005) apresenta um Modelo Não Isotérmico que teve como objetivo demonstrar que modelos empíricos primários e secundários, derivados de dados experimentais à temperatura constante, podem ser utilizados para prever padrões de crescimento microbiano sob variação de temperatura. Este modelo utiliza o modelo Logístico Modificado, como modelo primário e modelo exponencial como modelo secundário e está disponível em www.unix.oit.umass.edu/~aew2000/MicrobeGrowthModelA.html utilizando-se o *Microsoft EXCELL* 2000 para sua resolução (CORRADINI & PELEG, 2005; CORRADINI et al.,2006).

Como se verificou nos itens 4.5.2 e 4.5.3 na avaliação dos modelos testados para obtenção dos parâmetros de crescimento, o Modelo de Gompertz Modificado e o Modelo Logístico Modificado apresentaram ajustes similares aos dados experimentais propostos. Como o Modelo Não Isotérmico foi descrito na literatura utilizando o Modelo Logístico Modificado, neste trabalho para o cálculo dos parâmetros de crescimento também foi utilizado o modelo. Na Tabela 4.22 estão os valores dos parâmetros obtidos com o Modelo Logístico

Modificado para as duas formulações propostas, armazenadas nas temperaturas de 20, 25 e 30°C. Na continuidade deste trabalho, os parâmetros a , k e t_c serão avaliados em horas, e não em dias como anteriormente apresentado, em função da unidade utilizada do software disponível.

Tabela 4.22 Parâmetros obtidos com Modelo Logístico Modificado para a formulação padrão de mortadela e para mortadela 1, armazenadas às temperaturas de 20, 25 e 30°C.

T °C	Formulação padrão			Mortadela 1		
	a	k (1/h)	tc (h)	a	k (1/h)	tc (h)
20	4,611	$4,0 \cdot 10^{-4}$	760,68	5,098	$1,8 \cdot 10^{-4}$	724,15
25	4,881	$4,0 \cdot 10^{-4}$	650,68	5,264	$3,0 \cdot 10^{-4}$	669,89
30	6,339	$4,4 \cdot 10^{-4}$	637,84	5,929	$3,4 \cdot 10^{-4}$	612,94

a - aumento logarítmico da população; k - velocidade máxima de crescimento; t_c - ponto de inflexão na curva.

Com os parâmetros de crescimento para formulação padrão e para mortadela 1, obtidos através do Modelo Logístico Modificado à temperatura constante, foi ajustado um modelo secundário para descrever a influência da temperatura nestes parâmetros. O modelo secundário está baseado em equações exponenciais, conforme Corradini e Peleg (2005), e serão avaliados dentro do limite de temperatura em que foram gerados.

Na Figura 4.47 apresentam-se os modelos secundários que descrevem como os parâmetros de crescimento variam com a temperatura, para a mortadela 1.

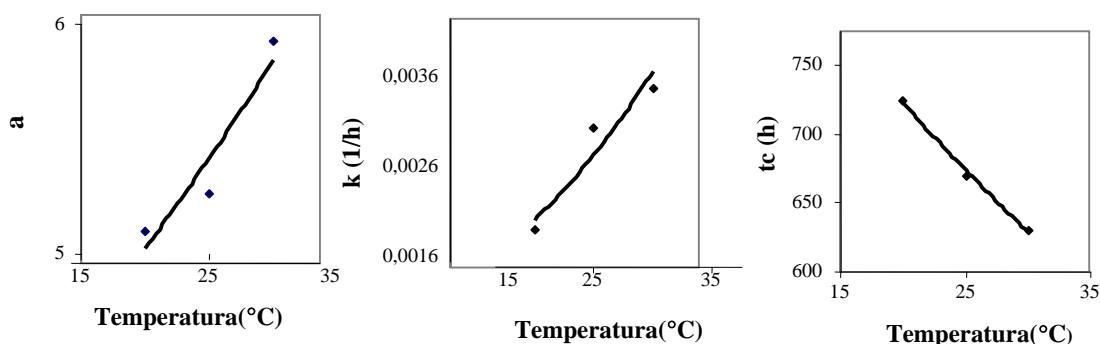


Figura 4.47 Parâmetros de crescimento (a , k e t_c) em função da temperatura da mortadela 1.

Na Tabela 4.23 estão as equações exponenciais, obtidas na Figura 4.47, que descrevem os modelos secundários para a formulação da mortadela 1.

Tabela 4.23 Equações exponenciais que descrevem os modelos secundários para os parâmetros de crescimento em função da temperatura da formulação da mortadela 1.

Parâmetros	Equação Exponencial	R ²
a	$a = 3,72 * e^{0,015 * T}$	0,900
k (h⁻¹)	$k = 0,0007 e^{0,054 * T}$	0,910
tc (h)	$tc = 952,32 e^{-0,0138 * T}$	0,994

a - aumento logarítmico da população; k - velocidade máxima de crescimento; tc - ponto de inflexão na curva.

Na Figura 4.48 apresentam-se os modelos secundários para a mortadela padrão.

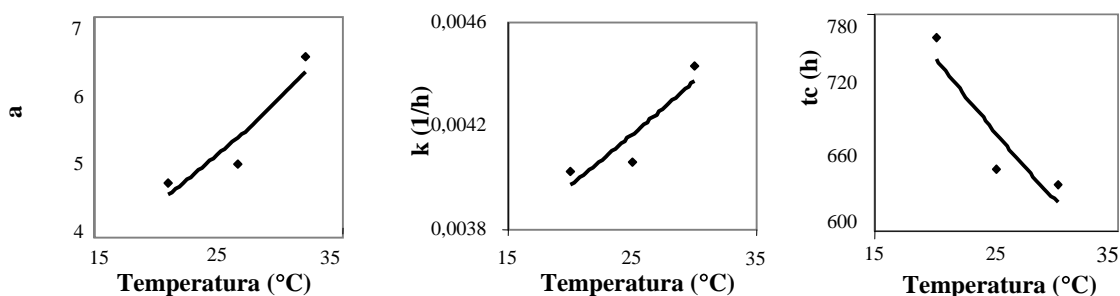


Figura 4.48 Parâmetros de crescimento (a, k e tc) em função da temperatura da mortadela padrão.

Na Tabela 4.24 estão apresentadas as equações exponenciais obtidas na Figura 4.48, que descrevem os modelos secundários para os parâmetros de crescimento da formulação padrão.

Tabela 4.24 Equações exponenciais que descrevem os modelos secundários de variação dos parâmetros de crescimento em função da temperatura da formulação padrão da mortadela.

Parâmetros	Equação Exponencial	R ²
a	$a = 2,36 * e^{0,032 * T}$	0,8792
k (h⁻¹)	$k = 0,0033 * e^{0,0097 * T}$	0,8196
tc (h)	$tc = 1057,6 * e^{-0,017 * T}$	0,8338

a = aumento logarítmico da população; k = velocidade máxima de crescimento; tc = ponto de inflexão na curva.

Observa-se que os parâmetros de crescimento podem ser descritos em função da temperatura por modelos secundários simplificados, representados graficamente nas curvas conforme Figuras 4.46 e 4.47.

Se os modelos secundários descritos através das equações propostas descreverem com fidelidade a dependência dos parâmetros em relação à temperatura, o Modelo Não Isotérmico deverá prever o crescimento microbiano com bastante exatidão. Isso é válido se o limite de temperatura em que se obteve os dados isotérmicos é considerado na avaliação do modelo proposto (CORRADINI & PELEG, 2005). Ou seja, a variação de temperatura no armazenamento não isotérmico (20 e 30°C neste caso) deve estar na faixa das curvas isotérmicas obtidas (20 a 30°C neste caso).

O modelo disponibilizado por Corradini & Peleg, (2005) e Corradini et al., (2006) considera que não há influência da temperatura no parâmetro “a”, ocorrendo apenas variação para os parâmetros “k e t_c ”. Entretanto, como pode ser observado nas Figuras 4.46 e 4.47, neste trabalho os três parâmetros variam com a temperatura. Em função disto, foi feito um contato pessoal com os autores que disponibilizaram o programa incluindo a variação do parâmetro a com a temperatura (Corradini & Peleg, comunicação pessoal).

Todas as equações descritas para este modelo (2.10, 2.11, 2.12, 2.13 e 2.14) estão inseridas no *software* disponível em www.unix.oit.umass.edu/~aew2000/MicrobeGrowthModelA.html Assim, apenas com as equações dos modelos secundários e o perfil de temperatura descrito no item 4.6.1 foi possível obter-se o ajuste do Modelo Não Isotérmico, obtendo-se as curvas apresentadas nas Figuras 4.49 e 4.50 para mortadela 1 e para mortadela padrão.

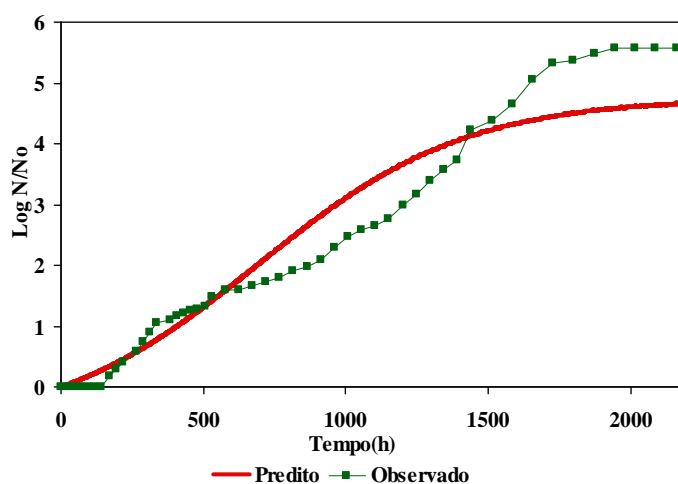


Figura 4.49 Curva de crescimento da contagem de BAL nas amostras da mortadela 1 armazenadas sob variação de temperatura. A linha contínua representa o ajuste do Modelo Não Isotérmico aos dados experimentais.

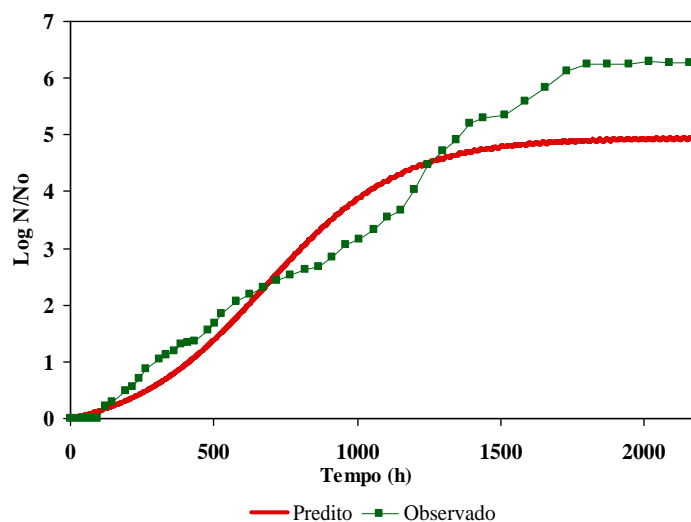


Figura 4.50 Curva de crescimento da contagem BAL nas amostras da mortadela padrão armazenada sob variação de temperatura. A linha contínua representa o ajuste do Modelo Não Isotérmico aos dados experimentais.

O Modelo Não Isotérmico ajustado aos dados experimentais da mortadela padrão e mortadela 1 foi avaliado através dos índices estatísticos MSE, Fator bias e Fator de exatidão, conforme mostra Tabela 4.25.

Tabela 4.25 Índices estatísticos para avaliação do Modelo Não Isotérmico ajustado aos dados experimentais da mortadela padrão e mortadela .

Índices Estatísticos	Mortadela1	Padrão
MSE	0,2794	0,4353
Fbias	0,9898	1,0676
Fexat	1,0719	1,0903

Verifica-se que, na avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas da mortadela armazenada sob variação de temperatura, o Modelo Não Isotérmico testado, se ajustou bem aos dados experimentais obtidos com os modelos primários e secundários. Com as duas amostras avaliadas, mortadela 1 e a mortadela com formulação padrão foi possível prever o crescimento microbiano sob variação de temperatura. Avaliando-se os índices estatísticos, MSE, fator bias e fator de exatidão para as duas amostras avaliadas, observa-se que a mortadela 1 apresentou melhor ajuste, com os menores valores para todos os índices. Avaliando-se as Figuras 4.49 e 4.50 observa-se através das linhas contínuas que o Modelo Não Isotérmico proposto prevê um crescimento menor principalmente após 1500 horas de armazenamento, comparado com os valores observados para as duas amostras avaliadas.

Este fato pode ser devido a vários fatores como:

- o Modelo Não Isotérmico utilizado, assim como todos os demais propostos na literatura, foram avaliados sempre para culturas puras. No presente trabalho, estudou-se o crescimento da flora natural de bactérias ácido lácticas incluindo diferentes espécies.
- a homeostase já anteriormente descrita no item 4.6.2, não é considerada no Modelo.
- o modelo secundário utilizado como base apresenta o estudo apenas em três temperaturas, o que pode levar a uma imprecisão dos resultados. Deve-se considerar, entretanto, o enorme volume de trabalho para a obtenção dos dados a cada temperatura.
- para cada amostra do produto, utilizava-se uma peça de mortadela com aproximadamente um quilo, de onde eram retiradas de 25 gramas aleatoriamente em diversos pontos do produto. Como a contaminação do produto não era homogênea, podem ocorrer variações entre os dados.

Corradini & Peleg (2005) consideraram que o objetivo do Modelo proposto era demonstrar que modelos empíricos primários e secundários derivados de dados experimentais à temperatura constante podem ser utilizados para prever crescimento microbiano sob variação de temperatura. No trabalho de Corradini & Peleg (2005) foram testados os dados experimentais de Fujikawa et al., (2004), para *Escherichia coli*, baseados em dados de crescimento à temperatura constante e dinâmica, com modelos primários e secundários, e demonstraram que, contanto que os modelos apresentem bons ajustes aos dados isotérmicos, podem ser usados também para prever o crescimento microbiano em armazenamento não isotérmico, pois a diferença entre os dados preditos e observados foi muito pequena.

CONCLUSÕES

Foi realizado um estudo da vida de prateleira da mortadela e da lingüiça defumada de suíno, cujas temperaturas de armazenamento, indicadas pela indústria, são ambiente e 8°C, respectivamente. Na avaliação microbiológica dos produtos, concluiu-se que o cozimento e a defumação são as etapas de maior contribuição para diminuição da população microbiana, e que os produtos finais saem da indústria com contagem microbiana baixa (em torno de 10^{-1} UFC/g). A avaliação da vida de prateleira da mortadela padrão, à temperatura de 30°C, foi de 40 dias e não 60 dias como indicado pela indústria. Com a lingüiça defumada de suíno padrão, na temperatura de 10°C, a vida de prateleira foi de 45 dias, que é a metade do tempo indicado pela indústria. O término da vida-de-prateleira foi indicado pela contagem microbiana quando esta atingiu 10^7 UFC/g. Nas avaliações sensoriais dos dois produtos, houve diferença significativa nos atributos avaliados, principalmente nos produtos armazenados às temperaturas mais altas, mas nenhum dos produtos avaliados foi rejeitado sensorialmente.

Para poder propor uma nova formulação para os produtos que permitisse um aumento na vida de prateleira, foi realizada uma avaliação dos fatores que mais influenciam o crescimento das bactérias lácticas, os principais deteriorantes destes produtos. Seleccionaram-se culturas puras de *L. sakey* e *L. plantarum*, que apresentaram comportamentos diferentes frente aos fatores propostos na avaliação do crescimento. O resultado do ajuste do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico às curvas de crescimento, em caldo MRS, indicou que, dos cinco fatores estudados (concentração de sal, de lactato, de Pfosfato, de nitrito/nitrato e de alho), o nitrito/nitrato e o alho não foram considerados estatisticamente significativos. Com os resultados obtidos neste estudo, foi possível indicar novas formulações para os produtos, variando apenas as concentrações de lactato, Pfosfato e sal.

O estudo da vida de prateleira dos produtos com as novas formulações mostrou que houve um ganho na vida de prateleira dos dois produtos avaliados, mortadela e lingüiça defumada. As duas formulações propostas para mortadela não atingiram contagem total de 10^7 UFC/g durante 60 dias de armazenamento, que é a vida prateleira proposta pela indústria, enquanto que, a formulação padrão atingiu a mesma contagem total em aproximadamente 55 dias. Na avaliação da lingüiça defumada observou-se que as novas formulações tiveram um ganho de aproximadamente 20 dias na vida de prateleira. Na análise sensorial da mortadela e da lingüiça defumada concluiu-se que as amostras dos produtos com a menor concentração de sal obtiveram maior aceitação. Após a avaliação microbiológica e sensorial, foi selecionada a

mortadela 1 que apresentava menor concentração de sal, para avaliação em armazenamento não isotérmico. Estes resultados mostraram a possibilidade de aplicação de uma metodologia simples em meio de cultura, com bactérias puras, para obter uma nova formulação para um produto cárneo, com maior vida de prateleira.

Após o ajuste de modelos primários às curvas de crescimento de BAL na mortadela 1 e na mortadela padrão, às temperaturas de 20, 25 e 30°C, obteve-se um modelo secundário que descrevia como os parâmetros do crescimento variavam com a temperatura. Estes resultados foram utilizados para o ajuste do Modelo Não Isotérmico aos dados experimentais obtidos para mortadela 1 e mortadela padrão, em armazenamento que simulava a variação de temperatura entre o dia e a noite.

Considerando vários fatores práticos da aplicação deste modelo a um alimento real com a presença de diferentes espécies de bactérias lácticas nunca antes descrito na literatura, um bom ajuste do Modelo Não Isotérmico proposto foi obtido.

Foi possível propor uma nova formulação dos produtos, com pequenas alterações, que levaram ao aumento da vida-de-prateleira, tanto em condições isotérmicas quanto em condições não isotérmicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - NBR 12994. Métodos de Análise de Alimentos e Bebidas – Classificação, São Paulo, 1993.

AMARAL-MELLO, M. R. P. Parâmetros de qualidade para avaliar a utilização de diferentes teores de carne de frango mecanicamente separada em salsicha. São Paulo, Dissertação de Mestrado. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo-USP, 1998.

ARAÚJO, J. M.; MÍDIO, A. F. Determinação espectrofotométrica de nitritos e nitratos após redução com coluna de cádmio/cobre em alimentos destinados à população infantil. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 25, n° 1, p. 570, 1989.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A., Mathematics of Predictive Food Microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p.199-218, 1995.

BARTON-GADE, P. A.; CROSS, H. R.; JONES, J. M.; WINGER, R. J. In H. R. CROSS; A. J. OVERBY, **Meat Science, Milk Science and Technology** p.141-171, Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. 1988.

BATY, B.; MULLER, M. L. D. Estimating the bacterial lag time: which model, with precision? **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.261-277, 2004.

BEGOT, C.; DESNIER, I.; DAUDIN, J. D.; LABADIE, J. C.; LEBERT, A. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, n°25, p.225-232, 1996.

BERAQUET, N. J. Panorama da carne de frango mecanicamente separada. Seminário sobre Produção e Utilização de Carne de Frango Separada Mecanicamente, Campinas, ITAL, p.1-19, 1988.

BERGARA-ALMEIDA, S.; SILVA, A. P. Hedonic scale with reference: performance in obtaining predictive models. **Food Quality and Preference**, v.13, n°1, p.57-64, 2002.

BISCONTINI, T. M. B.; MELO FILHO, A. B.; ANDRADE, S. A. C. Níveis de nitrito e nitrato em salsichas comercializadas na região metropolitana do Recife. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 24, n° 3, p. 390-392, 2004.

BORCH, E., KANT-MUERMANS, M. L., BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p.103-120, 1996.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Instrução Normativa n°4, 31 de março 2000 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 abril, 2000, Seção 1, p. 6-10.

BRASIL. Portaria nº1004, de 11 de dezembro de 1998. Regulamento técnico de atribuição de função de aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria de carnes e produtos cárneos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 de março, 1999.

BREWER, M. S.; MCKEITH, F. K.; SPROULS, G. Sodium lactate effects on microbial, sensory and physical characteristics of vacuum-packaged pork sausages. **Journal of Muscle Foods**, v. 4, p.179-192, 1993.

BUCHANAN, R. L. Predictive Microbiology. **Trends Food Science Technology**, v.4, p.6-11, 1993.

BUCHANAN, R. L.; WHITING, R. C.; DAMERT, W. C. When is simple good enough: A comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. **Food Microbiology**, v.14, p.313-326, 1997.

BUSANI, S. F. B.. Culturas “Starters” em Carnes.In: SILVA, R. Z. M.. Aplicação da Biotecnologia em Produtos Cárneos, ITAL, Campinas, p. 85-102, 1990.

CARCIOFI, B. A. M.; FAISTEL, J.; ARAGÃO, G.M.F.; LAURINDO, J. B. Determination of thermal diffusivity of mortadella using actual cooking process data. **Journal of Food Engineering**, nº 55, p. 89-94, 2002.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, nº4, p. 281-370, 2002.

CASSENS, R. G. Residual Nitrite in Cured Meat. **Food Technology**, v.51, nº 2, p. 53-55, 1997.

CAYRÉ, M. E., VIGNOLO, G.,GARRO, O., Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsion stored at three temperatures. **Food Microbiology**, v. 20, p.561-566, 2003.

CAYRÉ, M. E.; GARRO, O.; VIGNOLO, G. Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsions. **Food Microbiology**, v. 22, p.505-512, 2005.

CHEN, H. M.; MURAMOTO, K., YAMAUCHI, F.; HUANG, C. L. Natural antioxidants from rosemary and sage. **Journal of Food Science**, nº42, p.1102–1104, 1996.

CHEN, N.; SHELEF, A. Relation between water activity, salts of lactic acid and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. **Journal of Food Protection**, v. 55, p.574-578, 1992.

CHHABRA, A. T.; CARTER, W. H.; LINTON, M. A.; COUSIN, M. A. A predictive model, that evaluates the of growth conditions on the thermal resistance of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, nº 3-25, p. 235-243, 2002.

CHURCH, I. J.; PARSONS, A. L. Modified atmosphere packaging technology: a review. **Journal Science of Food Agricultural**, v. 67, p.143–152, 1995.

CORRADINI, M. G.; AMEZQUITA, A.; NORMAND, M. D.; PELEG, M. Modeling and predicting non-isothermal microbial growth using general purpose software. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p. 223-228, 2006.

CORRADINI, M. G.; PELEG, M. Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experiments data. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p 187-200, 2005.

CORREIA, R. T. P. ; MENDONÇA, S. C. ; LIMA, M. L. ; SILVA, P. D. Avaliação química e sensorial de lingüiças de peixe tipo frescal. **Boletim do CEPPA**, v. 19, n°2, p. 183-192, 2001.

DALGAARD, P.; MEJLHOLM, O.; HUSS, H. H. Application of an iterative approach for development of a microbial model predicting the shelf life of packed fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p 169-179, 1997.

DAVEY, K. R. Modeling the combined effect of temperature and pH on the rate coefficient for bacterial growth. **International Journal Food Microbiology**, v.223, p.295-303, 1994.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M.. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, n°18, v.2, 3, p.191-208, 2002.

DE WIT, J. C.; ROMBOUTS, F. M. Antimicrobial activity of sodium lactate. **Food Microbiology**, v.7, p.113–120, 1990.

DEBEVERE, J. M. The effect of sodium lactate on the shelf life of vacuum-packed coarse liver pate. **Fleischwirtschaft** 69, 223–224. 1989. In DEVLIEGHERE, F.; GEERAERD, A.H.; VERSYCK, K. J.; BERNAERT, H.; VAN IMPE, J.F.; DEBEVERE, J. M.. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. **International Journal of Food Microbiology** v.58, p.93-106, 2000.

DEUMIER, F.; COLLIGNAN, A. The effects of sodium lactate and starter cultures on pH, lactic acid bacteria, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. Levels in pure chicken dry fermented sausage. **Meat Science**, v. 65, p.1165-1174, 2003.

DEVLIEGHERE, F.; GEERAERD, A. H.; VERSYCK, K.J.; BERNAERT, H.; VAN IMPE, J. F.; DEBEVERE, J. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation, **International Journal of Food Microbiology**, v. 58, p. 93-106, 2000.

DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J.; VAN BELLE, B. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. **International Journal of Food Microbiology**, v.46, p.57-70, 1999.

DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J. (a). Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. **International Journal Food Microbiology**, v. 41, p.231-238, 1998.

DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J. (b). Concentration of predict carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p.105-113, 1998.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. Applied Regression Analysis, 1981. Apud McMEEKIN, T. A., OLLEY, M. B., ROSS, T., RATKOWSKY, D. A., Predictive Microbiology: theory and application. **Researches Studies**, p. 1-86, 1993.

DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; KAMPANI, A.; KRITIKOS, D.; METAXOPOULOS, I. Inhibitory Effect of Organic Acid Salts on Spoilage Flora in Culture Medium and Cured Cooked Meat Products Under Commercial Manufacturing Conditions. **Meat Science**, v.73, p.75-81, 2006.

EARLY, R. Guide to Quality Management Systems for the Food Industry. London: Blackie Academic and Professional, 306 p.,1995.

EBURNE, R. C.; PRENTICE, G. Modified atmosphere packed ready to cook and ready to eat meat products. In MAN, C. M. D.; JONES, A. A. Shelf life evaluation of foods, ed. Chapman & Hall, p. 156-178, 1996.

EICHHOLZER, M.; GUTZWILLER, F. Dietary nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. **Nutrition Reviews**, v.56, n°.4, p.95-105, 1998.

FARBER, J. M. Predictive Modeling of Food Deterioration and Safety, 1986. Apud NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, D. S. ; FRANCO, B. D. G. M., Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva, **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 41-51, 2000.

FARBER, J. M., Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology. A review. **Journal of Food Protection**, v. 54, p.58-70, 1991.

FEEMA- Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente **Vocabulário Básico do Meio Ambiente**, Legislação Ambiental Brasileira, Petrobrás, RJ, 1990.

FERREIRA, S. M. R.; CAMARGO, L. Aditivos em alimentos. **Boletim do CEPPA**, v. 11, n°. 2, p. 159-176, 1993.

FRANCO, B. D. G, DE MELLO; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos, Editora Atheneu São Paulo, 1996.

FRONING, G. W. Mechanically de boned poultry meat. **Food Technology**, v. 30, n. 9, p. 50-63. 1996.

FUJIKAWA, H.; KAI, A.; MOROZUMI, S.; A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. **Food Microbiology**, v.21, p.501-509, 2004.

GIANNUZZI, L.; PINOTTI, A.; ZARITZKY, N. Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef at different temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p. 101-110, 1998.

GIROTTI, A. F. Análise e Perspectivas da Suinocultura Brasileira, Embrapa Suínos e Aves Disponível em <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/>, capturado em 20/05/2005.

GRAY, J. J.; GOMAA, E. A.; BUCKLEY, D. J. Oxidative quality and shelf life of meats. **Meat Science**, v. 43, p. S 111-S123, 1996.

HARRIS, J. C.; COTTRELL, S. L.; PLUMMER, S. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). **Applied Microbiological Biotechnology**, n.57, p. 282–286, 2001.

HARTY, D. W. S., OAKEY, H. J.; PATRIKAKIS, M.; HUME, E. B. H.; KNOX, K. W. Pathogenic potential of lactobacilli. **International Journal of Food Microbiology**, v.24, p.179–189, 1994.

HIGENBART, S. Encapsulated ingredients keep problems covered. Disponível em www.foodproduct.com, capturado em 25 de maio de 2005.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, nº.22, p.273-292, 2005.

HOUTSMA, P. C., DE WIT, J. C., ROMBOUTS, F. M. Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms in meat products **International Journal of Food Microbiology**, v.20, p. 247-257, 1993.

HOUTSMA, P. C.; KANT-MUERMANS, M. L.; ROMBOUTS, F. M.; ZWIETERING, M. H. Model for the combined effect of temperature, pH and sodium lactate on growth rates of *Listeria innocua* in broth and Bologne type sausages. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p.1616-1622, 1996.

HUANG LIHAN. Estimation of growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef under fluctuating temperature conditions. **Food Microbiology**, v. 20, nº 20, p. 549-559, 2003.

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

HYLDIG, G.; NIELSEN, D. A review of sensory and instrumental methods used to evaluate the texture of fish muscle. **Journal of Texture Studies**, v. 32, p.219-242, 2001.

[ISO] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARTIZATION. Sensory Analysis: methodology evaluation of food products by method using scales. International Standard-ISO 4121, 7 p., Geneva 1987.

JAY, J. M. Microbiologia de Alimentos, 6ª edição, ARTEMED, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2005.

KANT-MUERMANS, M .L. T.; STEKELENBURG, F. K; ZWIETERING, M.H.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Modeling the Shelf life of Packed, Cooked Meat Products. **World Congress on Food Hygiene**, The Hague p.53-57, 1997.

KIM, S. M.; KUBOTA, K.; KOBAYASHI, A. Antioxidative activity of sulphur-containing flavour compounds in garlic. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, n°.61, p.1482-1485 1997.

KORKEALA, H.; BJÖRKROTH, K. J. Spoilage and contamination of vacuum packaged cooked sausages. **Journal of Food Protection**, v. 60, p.724-731, 1997.

KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E. Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 171-184, 2000.

KOUTSOUMANIS, K. Predictive Modeling of the Shelf Life of Fish under Nonisothermal Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p.1821-1829, 2001.

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

LABUZA, T. P. Shelf life dating of foods. **Food and Nutrition Press, 1982**. In NASSU, T. R. Utilização de carne de caprino no processamento de embutido fermentado, tipo salame. Tese de Doutorado, UNICAMP, 1999.

LEUSCHNER, R. G. K.; IELSCH, V. Antimicrobial effects of garlic, clove and red hot chilli on *Listeria monocytogenes* in broth model systems and soft cheese. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, n°.54, p.127-133, 2003.

LUCKE, F. K. Utilization of Microbes to Process And Preserve Meat. **Meat Science**, v.56, p.105-115, 2000.

LUNO, M.; BELTRAN, J. A.; RONCALES, P. Shelf life extension and color stabilization of beef packaged in a low O₂ atmosphere containing CO₂. loin steaks and ground meat. **Meat Science**, v. 48, p. 75-84, 1998.

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(1), p. 1-10, 2002.

MAPA-Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Agricultura Brasileira, 2004. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br> , capturado em 08/04/2005.

MAPA-Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Agronegócio Brasileiro uma Oportunidade de Investimentos, 2005. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/> capturado em 10/05/2005.

MARKETING DA CARNE. Revista Nacional da Carne, Edição n° 332, Outubro 2004.

McKELLAR, R. C.; LU, X. Modeling Microbial Response in Food. CRC series in contemporary food science. CRC PRESS Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 2004.

McKNIGHT, G. M.; DUCAN, C.W.; LEIFERT, C.; GPLDEN, M. H. Dietary nitrate in man: friend or foe? **British Journal of Nutrition**, n°81, p.349-358, 1999.

McMEEKIN, T. A. ; BROWN, J. ; KRIST, K. ; MILES, D. ; NEUMEYER, K.;NICHOLS, D.S. ; OLLEY, J. ; PRESSER, K. ; RATKOWSKY, T D. A.; ROSS, M. S.; SOONTRANON, S. Quantitative Microbiology: A Basis for Food Safety, **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n° 4, 1997.

McMEEKIN, T. A.; OLLEY, J.; RATKOWSKY, D. A.; ROSS, T. Predictive Microbiology: Towards the Interface and Beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v.73, p.395-407, 2002.

McMEEKIN, T. A.; OLLEY, M. B.; ROSS, T., RATKOWSKY, D. A., Predictive Microbiology: theory and application. **Researches Studies**, p. 1-86, 1993.

MERLO, A. Otimização de aditivos em produtos cárneos. Legislação Mercosul. In Seminário Internacional de Produtos Cárneos, Florianópolis, Santa Catarina, 1998.

MONTEIRO, C. L. B. Técnicas de Análise Sensorial. Universidade Federal do Paraná, **Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos - CEPPA**, Curitiba, Paraná, 1984.

MOURA, S. C. S. R.; GERMER, S. P. M. Reações de Transformação e Vida de Prateleira de Alimentos Processados. ITAL, **Manual Técnico**, n°. 6, 3ª.edição., 92 p., 2004.

MURIANA, P. M. Bacteriocins for Control of *Listeria* spp. in Food. **Journal Food Protection**, n°.59 p. 54-63, 1996.

MUSTEFAGA, P. S. Pecuária de Corte n° 205, Janeiro/Fevereiro, 2005. Disponível em <http://www.cna.org.br/cna/publicacao>. Capturado em 31/05/2005.

NAIDU, A.S. Activated lactoferrin: A new approach to meat safety. **Food Technology**, v.56, n°3, p. 40-45, 2002.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, D. S. ; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p.41-51, 2000.

NERBRINK, E.; BORCH, E.; BLOM, H.; NESBAKKEN, T. A model based on absorbance data on the growth rate of *Listeria monocytogenes* and including the effects of pH, NaCl, Na-lactate and Na-acetate. **International Journal of Food Microbiology**, n°.47, p. 99-109, 1999.

NETO, M. Revista Nacional da Carne, v. 249, p.50-54, 1997, disponível em www.dipemar.com.br , capturado em 04/04/2005.

NEUMEYER, K.; ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Development of a predictive model to describe the effects of temperature and, water activity on the growth of spoilage pseudomonas. **International Journal Food Microbiology**, n°38, p.45-54, 1997.

NEVES, M. F.; FILHO, C. P. M.; CARVALHO, D. T.; CASTRO, L. T. Redes Agroalimentares & Marketing da Carne Bovina em 2010. **Preços Agrícolas**, janeiro fevereiro, p. 1-14, 2001.

NUUTILA, A. M.; PUUPPONEN-PIMIA; R., AARNI, M.; OKSMAN- CALDENTY, K. M. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. **Food Chemistry**, nº81, p.485-493, 2003.

ODA, S. H. I.; SOARES, A. L. ; LARA, J. A. F.; YAMASHITA, F.; IDA, E. I. ; SHIMOKOMAKI, M. **Revista Nacional da Carne**, edição nº317, julho 2003, disponível em www.dipemar.com.br , capturado em 04/04/2005.

PAPADOPULOS, L. S.; MILLER, R. K.; ACUFF, G. R.; VANDERZANT, CROSS, H. R. Effect of sodium lactate on microbial and chemical composition of cooked beef during storage. **Journal of Food Science**, v. 56, p.341–347, 1991.

PARDI, M. C. ; SANTOS, I, F.; SOUZA DE, E. R.; PARDI, H. S. *Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne*, 1ª edição, Editora UFG, 1996.

PEARSON, A. M.; TAUBER, F. W. *Processed meats*, 2ª edição Westport AVI Publishing Company, 1984, In NASSU, T. R. *Utilização de carne de caprino no processamento de embutido fermentado, tipo salame*. Tese de Doutorado, UNICAMP, 1999.

PÉREZ-RODRIGUEZ, M. L.; BOSCH-BOSCH, N.; GARCÍA-MATA, M. Monitoring nitrite and nitrate residues in frankfurters during processing and storage. **Meat Science**, v. 44, nº1, p.65-73, 1996.

POKORNÝ, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science and Technology**, v.2, nº 9, p. 222-227, 1991.

PRESSER, K. A.; ROSS, T.; RATKOWSKY, D. A.; Modeling the growth limits (growth / no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, Lactic acid concentration and water activity. **Applied and Environmental Microbiology** v. 64, nº5, p.1773-1779, 1998.

RESURRECCION, A. V .A. Sensory aspects of consumer choices for meat and meat products. **Meat Science** v. 66, p.11–20, 2003.

ROSA, C. M.; FRANCO, B. D. G. M. MONTVILLE, T. J.; CHIKINDAS, M. Purification and mechanism action of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolate, *Lactobacillus sake* 2a. **Journal of Food Safety**, nº 22, p. 39-54, 2002.

ROSS, T.; McMEEKIN, T. A. Predictive Microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.41-264, 1994.

ROTA, E. L.; OLIVEIRA, M. M. Análise Sensorial da Carne. Disponível em <http://www.beefpoint.com.br> capturado em 19/11/2004.

RUUSUNEN, M.; SARKKA-TIRKKONEN, M.; PUOLANNE, E. The effect of salt reduction on taste pleasantness in cooked 'bologna' type sausages. **Journal of Sensory Studies**, v.14, p.263-270, 1999.

SADLER, M. J. Meat Alternatives: Market Development and Health Benefits. **Food Science Technology**, v. 15, p.250-260, 2004.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. **Food Microbiology**, v. 17, p. 329–340. 2000.

SANTOLARIA, P. Influencia de factores genéticos y ambientales sobre los parámetros sensoriales que definen la calidad de la carne añejo. p. 204. Tese Doutorado - Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, 1993.

SAÑUDO, C. Análisis Sensorial - Problemática de su aplicación practica en la carne. 1º Curso Internacional de Analise Sensorial de Carne e Produtos Cárneos. Pelotas, CD-ROM, 2004.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M. Sistemas de embalagens plásticas para preservação de carne bovina e derivados. In: **Ciência e Tecnologia da Carne Bovina**. Campinas: CTC/ITAL, p. 58-70, 1994.

SCHAFFNER, D. W.; LABUZA, T. P. Predictive Microbiology: Where are we and where are we going? **Food Technology**, v.51, n°4, 1997.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of Antagonistic Microorganisms and Bacteriocins for the Biological Preservation of Foods. **Trends Food Science Technology**, n°7 p.158-164, 1996.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of lactates: a review. **Journal of Food Protection**, v. 57, p.445–450, 1994.

SHIMONI, E.; LABUZA, T. P. Modeling Pathogen Growth in Meat Products: Future challenges. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p. 394-402, 2000.

SILVA, J. A. Ocorrência e controle de *Clostridium botulinum* em produtos cárneos curados. **Revista Tecnológica e Ciências de Carnes**, v. 1, n. 1, p. 44-56, 1999, disponível em www.dipemar.com.br , capturado em 04/04/2005.

SINGH, R. P. Scientific principle of shelf life evaluation, In MAN, C. M. D.; JONES, A. A. **Shelf Life Evaluation of Foods**, Ed. Chapman & Hall, p. 3-26, 1996.

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

SOARES, A. L.; ODA, S. H. I.; LARA, J. A. F. ; YAMASHITA, F.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M.. Ingredientes e aditivos para carnes: segurança e inovação. **Revista Nacional da Carne**, julho 2003, edição n° 317, disponível em www.dipemar.com.br , capturado em 04/04/2005.

- SPIEGEL, M. S. Manual de fórmulas, métodos e tabelas de matemática, Makron, McGraw-Hill, Coleção Schaum, 2^a edição, p. 352, 1992.
- STAINER, R. Y.; INGRAHAM, J. L.; WHEELIS, M. L.; PAINTER, P. R. **General Microbiology**, 5 ed., Hong Kong, Macmillan Press Ltd., p. 495-504, 1995.
- TAOUKIS, P. S.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E.; Use of time-temperature integrators and predictive modeling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.53, p.21-31, 1999.
- TAOUKIS, P. S.; LABUZA, T. P. Applicability of time-temperature indicators as shelf life monitors of food products. **Journal of Food Science**, v. 54, p.783-788, 1989.
- TEIXEIRA, I.; MEINERTI, E. M.; BARBETTA, P. A.. Análise sensorial de alimentos. Editora da UFSC, Série Didática, 180p., 1987.
- TERRA, N. Particularidades na fabricação do salame. Revista Nacional da Carne, edição nº317, 2003, www.dipemar.com.br , capturado em 04/04/2005.
- TERRA, N.. Apontamentos de Tecnologia de Carnes, Editora Unisinos, São Leopoldo, 1998.
- TOLEDO, J. C.; BORRAS, A. A. M.; SCALCO, A. R.; LIMA, L. S. Coordenação da qualidade em cadeias de produção: Estrutura e Método para Cadeias Agroalimentares. **Gestão & Produção**, v.11, n.3, p.355-372, set-dez., 2004.
- TRUPPER, H. G. ; DE CLARI, L. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantive (nouns) in apposition. **International Journal System Bacteriology**, v.47, p.908-909, 1997.
- VAN IMPE, J. F.; BART, M. N.; SCHELLEKENS, M.; MARTENS, T.; BAERDEMAEKER, J. A. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, p.227-249, 1995.
- VAN IMPE, J. F.; NICOLAI, B. M.; MARTENS, T.; BAERDEMAEKER, J. DE; VANDEWALLE, J. Dynamic Mathematical Model to Predict Microbial Growth and Inactivation during Food Processing. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2901-2909, September 1992.
- VERGES, M.- C. C.; ZUNIGA, M.; DEVILLE, F. M.; MARTINEZ, G. P.; ZAGOREC, M. ; EHRLICH, S. D.; Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. FEMS, **Microbiology Letters**, v.180, p.297-304, 1999.
- WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. A. Classification of Models for Predictive Microbiology. **Food Microbiology**, v.10, p. 175-177, 1993.
- WONG, J. W.; HASHIMOTO, K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model meat system. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 43, nº.10, p. 2707-2712, 1995.

ZHAO, L.; MONTVILLE, T. J.; SCHAFFNER, D. W. Time to detection, percent growth positive and maximum growth rate models for *Clostridium botulinum* 56A at multiple temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n° 3-25, p. 187-197, 2002.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN'TRIET, K. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p. 1875-1881, 1990.

ANEXO**1-FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL – TESTE DA ESCALA HEDÔNICA****2- FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL – TESTE DUO TRIO**

1-FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL**Escala Hedônica de sete pontos**

Nome: _____ Data: ____/____/____

Você está recebendo três amostras codificadas de mortadela . Por favor, avalie cada uma das amostras utilizando a escala de valores abaixo:

- (7) gostei muitíssimo
- (6) gostei muito
- (5) gostei regularmente
- (4) nem gostei e nem desgostei
- (3) desgostei regularmente
- (2) desgostei muito
- (1) desgostei muitíssimo

Descreva o quanto você gostou e/ou desgostou, com relação aos atributos:

AMOSTRA	COR	TEXTURA	SABOR	AROMA
296				
543				
972				

Comentários: _____

Obrigado pela colaboração!

2-FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

TESTE DUO TRIO

Ficha de Avaliação

Nome: _____ Data ___/___/___

Você está recebendo três amostras em cada grupo, sendo um padrão e duas codificadas. Deguste cuidadosamente primeiro a amostra padrão e em seguida as amostras codificadas. Compare o sabor das amostras codificadas com o padrão, Em cada grupo anote o código da amostra que possui o mesmo sabor do padrão.

Grupo	Código da Amostra	Amostra=Padrão
1	P	
	532	
	973	
2	P	
	426	
	738	
3	P	
	295	
	382	

Comentários: _____

Obrigado

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.