

CRISTINA BEATRIZ AROCA RIBEIRO

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E APLICAÇÃO DE CULTIVOS  
INICIADORES PARA MELHORAMENTO DA QUALIDADE DA  
LINGÜIÇA “TIPO TOSCANA” NÃO DEFUMADA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Co-orientador: Prof. Dr. Nelcindo Nascimento Terra

**CURITIBA**

**2006**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Dr. Carlos Ricardo Soccol pela orientação imprescindível e conselhos valorosos.

Ao Professor Dr. Nelcindo Nascimento Terra pela acolhida e co-orientação preciosa.

Ao Professor Dr. José Parada pelas sugestões oportunas.

Ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade do aperfeiçoamento técnico-científico.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

A todos os colegas, amigos, colaboradores e familiares que me auxiliaram na concretização deste trabalho, que não deixa de ser o resultado de nosso esforço coletivo.

A Deus por mais essa benção concedida.

**Os grandes pensamentos não  
necessitam apenas de asas, mas também de um veículo para aterrizar.**

**Neil Armstrong**



## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE SIGLAS.....	VII
LISTA DE SÍMBOLOS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
INTRODUÇÃO.....	1
<b>1 OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
2.1 INDUSTRIALIZAÇÃO DA CARNE.....	4
2.1.1 Classificação dos produtos de salsicharia.....	4
2.1.2 Matéria-prima.....	5
2.1.3 Aditivos e ingredientes.....	5
2.1.4 Diagrama geral de fabricação dos embutidos.....	5
2.2 FATORES PARA SEGURANÇA DOS ALIMENTOS.....	7
2.2.1 Processo de cura.....	7
2.2.2 Resfriamento.....	8
2.2.3 pH e Acidez.....	9
2.2.4 Fermentação cárnea.....	9
2.3 CARACTERÍSTICAS DAS BACTÉRIAS EMPREGADAS COMO “STARTERS”.....	12
2.3.1 <i>Lactobacillus sake</i> .....	12
2.3.2 <i>Pediococcus pentosaceus</i> .....	13
2.3.3 <i>Staphylococcus carnosus subsp. carnosus</i> .....	13
2.3.4 <i>Staphylococcus xylosus</i> .....	13
2.3.5 <i>Lactobacillus sp.</i> .....	14
2.4 MICRORGANISMOS PATOGENICOS.....	14
2.4.1 Patógenos presentes em embutidos.....	14
2.5 ANÁLISE SENSORIAL.....	19
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 AMOSTRAS.....	20
3.2 MEIOS DE CULTIVO.....	20
3.3 ISOLAMENTO E ANÁLISE DAS BACTÉRIAS DE INTERESSE.....	20
3.4 MANUTENÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS.....	22
3.5 SELEÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS.....	22
3.6 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA PARA ELABORAÇÃO DE LINGÜIÇA FRESCA “TIPO TOSCANA” NÃO DEFUMADA.....	23
3.7 CULTURAS INICIADORAS.....	23
3.8 ELABORAÇÃO DA LINGÜIÇA “TIPO TOSCANA” NÃO DEFUMADA.....	24
3.8.1 <i>Lingüiça controle</i> .....	26
3.9 PLANO DE AMOSTRAGEM.....	27
3.10 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	27
3.11 DETERMINAÇÃO DO pH.....	28
3.12 ANÁLISE SENSORIAL.....	28
3.13 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS CULTURAS “STARTER” UTILIZADAS A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	29
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
4.1 DO ISOLAMENTO E SELEÇÃO DAS CEPAS.....	30
4.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	33

	iv
4.2.1 <i>Bactérias lácticas</i> .....	33
4.2.2 <i>Coliformes totais</i> .....	36
4.3 ANÁLISE DO pH.....	41
4.4 ANÁLISE SENSORIAL.....	44
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>49</b>
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>52</b>
<b>ANEXO A – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MEIOS MICROBIOLÓGICOS UTILIZADOS</b> .....	<b>57</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1 – TEMPERATURAS IMPORTANTES PARA OS MICRORGANISMOS PROCARIÓTICOS.....</b>	<b>9</b>
<b>TABELA 2 - FORMULAÇÃO BASE DE LINGÜIÇA FRESCAL “TIPO TOSCANA”.....</b>	<b>24</b>
<b>TABELA 3 – ESQUEMA SEGUIDO NA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS.....</b>	<b>26</b>
<b>TABELA 4 – CARACTERÍSTICAS DAS 10 CEPAS MODERADAMENTE ACIDIFICANTES.....</b>	<b>31</b>
<b>TABELA 5 – DOSE INFECTANTE MÍNIMA PARA ALGUMAS LINHAGENS DE E. COLI.....</b>	<b>37</b>
<b>TABELA 6 – MÉDIAS DAS NOTAS ATRIBUÍDAS NAS AVALIAÇÕES SENSORIAIS DAS LINGÜIÇAS DO ENSAIO1. ....</b>	<b>46</b>
<b>TABELA 7 – MÉDIAS DAS NOTAS ATRIBUÍDAS NAS AVALIAÇÕES SENSORIAIS DAS LINGÜIÇAS DO ENSAIO 2.....</b>	<b>47</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA DE UMA EMULSÃO DE CARNE.....	6
FIGURA 2 – ESQUEMA DO PROCEDIMENTO PARA ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DE EMBUTIDOS ARTESANAIS.....	21
FIGURA 3 – DIAGRAMA DE FLUXO DO PROCESSAMENTO GERAL DE LINGÜIÇA.....	25
FIGURA 4 – MODELO DE FICHA PARA ANÁLISE SENSORIAL.....	29
FIGURA 5 – CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS INICIADORAS A 35 °C.....	31
FIGURA 6 - CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS INICIADORAS A 15 °C.....	32
FIGURA 7 - CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS INICIADORAS A 5 °C.....	32
FIGURA 8 - CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM LINGÜIÇA DURANTE O ENSAIO 1.....	34
FIGURA 9 - CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM LINGÜIÇA DURANTE O ENSAIO 2.....	35
FIGURA 10 - CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM LINGÜIÇA DURANTE O ENSAIO 3A. .....	35
FIGURA 11 - CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM LINGÜIÇA DURANTE O ENSAIO 3B. .....	36
FIGURA 12 – CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS EM LINGÜIÇA, ENSAIO 1.....	39
FIGURA 13 - CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS EM LINGÜIÇA, ENSAIO 2.....	39
FIGURA 14 – CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS EM LINGÜIÇA, ENSAIO 3A.....	40
FIGURA 15 - CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS EM LINGÜIÇA, ENSAIO 3B. ....	40
FIGURA 16 – VALORES DE PH DURANTE O ENSAIO 1.....	42
FIGURA 17 – VALORES DE PH DURANTE O ENSAIO 2.....	43
FIGURA 18 – VALORES DE PH DURANTE O ENSAIO 3A.....	43
FIGURA 19 – VALORES DE PH DURANTE O ENSAIO 3B.....	44
FIGURA 20 – PERFIL DE CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS NO ENSAIO 1.....	46
FIGURA 21 – PERFIL DE CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS NO ENSAIO 2.....	47
FIGURA 22 - PERFIL DE CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS NO ENSAIO 3B.....	48

**LISTA DE SIGLAS**

Abs. – absorbância

DNA – ácido desoxirribonucléico

VRBA – ágar violeta vermelho bile

ATCC – American Type Culture Collection

Abras - Associação Brasileira de Supermercados

BAL – bactérias ácido lácticas

EIEC - *Escherichia coli* ENTEROINVASORA

EPEC – *Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA

ETEC - *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA

MRS – meio de Man, Rogosa e Sharpe

RIISPOA – Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

UFC – unidade formadora de colônia

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

**LISTA DE SÍMBOLOS**

NaCl – cloreto de sódio

CO<sub>2</sub> – gás carbônico

O<sub>2</sub> – gás oxigênio

g – grama

°C – graus Celsius

h – hora

kg – quilograma

L - litro

µg - micrograma

mL – mililitro

µL - microlitro

nm – nanômetro

NO – óxido nítrico

% - porcentagem

rpm – rotações por minuto

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo desenvolver um starter misto com potencial para aplicação em conservação de lingüiça fresca, a diferentes temperaturas. Para tanto buscou-se isolar novas cepas de bactérias lácticas a partir de embutidos artesanais da região sul do Brasil e combiná-las com outros “starters” usuais, visando uma melhora na cor e aroma/sabor do produto final. Foram testadas 4 formulações “starter”, ao todo. Essas combinações foram avaliadas, durante o armazenamento a 5 °C, quanto à variação do pH, das contagens em placa de bactérias lácticas e coliformes totais e através de teste de perfil de características sensoriais. Os “starters” utilizados, nas concentrações e quantidades empregadas, não mostraram atividade inibitória relevante frente os coliformes totais, quando a temperatura de armazenamento foi de 5 °C. Já em condições de abuso de temperatura (15 °C) foi possível verificar uma inibição maior dos coliformes totais com redução próxima a 2 ciclos Log.. Frente à situação de congelamento/descongelamento o tratamento 4, que continha uma cepa de *Lactobacillus* produtora de bacteriocina, mostrou ação inibitória mais eficaz sobre os coliformes após esse tratamento. Os atributos sensoriais e a preferência foram influenciados pela qualidade inicial da matéria-prima utilizada na elaboração das lingüiças. As análises sensoriais realizadas mostraram uma boa aceitação das lingüiças adicionadas de cultivo iniciador, sendo estas algumas vezes preferidas ao controle não inoculado.

**Palavras-chave:** lingüiça “toscana”; coliformes; bactérias lácticas; cultivos iniciadores; condições de armazenamento

## ABSTRACT

The objective of this work was the development of a starter for application to improve sausage quality. To achieve this objective, strains of lactic acid bacteria were isolated from non inoculated dry sausages of the south of Brazil. They were mixed with other starters to obtain a better color and flavor in the final product. Four formulations were tested. Microbial and sensory analyses were carried out during the storage period. The pH evaluation was observed. The lactic acid bacteria used, at the concentrations and quantities employed didn't show a relevant inhibition of the total coliforms during the storage at 5 °C. In temperature abuse (15 °C) the inhibition of the coliforms was ~2 log cycles. When the freezing/defreezing of the sausages was made the treatment 4, with bacteriocinogenic strain, showed a greater inhibitory action. The microbial quality of the employed meat was diverse and it was reflected in the sensory evaluation. The sensory analyses of the inoculated fresh sausages had a good acceptance for the panel. Sometimes they were preferred to non inoculated sausages.

**Key-words:** sausage; coliforms; lactic acid bacteria; starters; storage conditions.

## INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne bovina, terceiro maior produtor de carne de frango e oitavo maior produtor de carne suína. No entanto, o consumo nacional, anual, *per capita* dessas carnes, estimado em 36 kg de carne bovina, 30 kg de aves e 12 kg de suínos, ainda é muito pequeno quando comparado aos níveis de consumo dos países mais desenvolvidos (GAGLEAZZI et al., 2002).

Nas gôndolas e refrigeradores dos supermercados, os perecíveis, incluindo as carnes, são os que dão margem de lucro ao setor varejista. Segundo balanço da Abras apresentado por José Milton Dallari, atual consultor da Associação Brasileira de Supermercados (Abras), em 2003, estes produtos responderam por 34,8% das vendas dos estabelecimentos varejistas. Os derivados de carne também lideram hoje o ranking dos principais setores em faturamento. O consumidor ainda prefere a carne bovina. Isso se reflete na dimensão de cada segmento cárneo nos açougues das lojas: 60% das carnes têm origem bovina; 34% de aves; e 5% de suínos. Dallari destacou ainda que o consumidor escolhe os produtos com base em cinco conceitos, respectivamente: cor, frescor, procedência, teor de gordura e consistência. Já o varejo compra atentando para a cor, procedência, frescor, tipo de criação e teor de gordura (TORRES, 2005).

Segundo estudo realizado por Gagleazzi, et al.(2002), as carnes preferidas pelos consumidores em geral não são aquelas adquiridas com maior frequência no momento da compra. O preço, apesar de ser importante na determinação do tipo de carne a ser consumido, está sempre associado a outro fator principal, geralmente o fator cultural, o qual se mostrou determinante no consumo de carnes. Os consumidores mostraram dar maior importância aos atributos de saúde, qualidade e segurança alimentar (saúde da carne, limpeza dos funcionários e estabelecimentos, bem como as condições de armazenamento e transporte) do que ao fator preço (GAGLEAZZI et al., 2002).

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 (ODA et al., 2004).

Entre os objetivos principais da industrialização da carne encontram-se: o aumento da vida útil, o desenvolvimento de diferentes sabores e a utilização das partes do animal de difícil comercialização quando no estado fresco (TERRA, 2003).

Devido ao elevado consumo mundial de carne suína e sendo o Brasil o maior produtor da América Latina, estudar alternativas para agregar valor a esta matéria-prima é de extrema importância para o desenvolvimento deste setor. Atualmente, o Brasil ainda possui uma tecnologia insipiente para a produção de embutidos de alto valor agregado. A alternativa proposta nesse projeto é possibilitar o acesso dos frigoríficos brasileiros a uma tecnologia nacional, melhor adaptada à matéria-prima e as condições ambientais de nosso país e que favoreça a segurança microbiológica em concordância com as novas exigências de qualidade do consumidor.

## 1 OBJETIVOS

O presente projeto teve por objetivo global o desenvolvimento de um cultivo iniciador misto para emprego em lingüiças “tipo toscana”, visando à obtenção de um produto final de alta qualidade microbiológica e organoléptica.

### 1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento de bactérias lácticas de embutidos fabricados na região sul do Brasil.
- Seleção das bactérias isoladas para serem utilizadas na produção de embutidos.
- Caracterização bioquímica e fisiológica das bactérias selecionadas.
- Testes dos “starters” desenvolvidos na formulação dos embutidos.
- Avaliar o efeito de alterações na temperatura de armazenamento da lingüiça “tipo toscana”, sobre o comportamento dos “starters” e o controle dos coliformes.
- Verificar a importância da carga inicial dos coliformes.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 INDUSTRIALIZAÇÃO DA CARNE

A industrialização consiste na transformação das carnes em produtos cárneos; tendo este processo início na produção de carnes com qualidade (TERRA, 2003).

A designação produtos de salsicharia vale como termo genérico para produtos cárneos picados, cominuídos ou migados em variados graus. São constituídos por carnes de diversas espécies e/ou sangue, vísceras e outros tecidos animais apropriados para o consumo. Podem ser curados ou não, embutidos ou não, quando embutidos devem utilizar-se de envoltórios naturais ou artificiais aprovados pelas autoridades competentes (GUAHYBA, 2005).

#### 2.1.1 Classificação dos produtos de salsicharia

Os produtos embutidos podem ser classificados em:

- Embutidos de massa cozida a seco – ex.: mortadelas, salsichas.
- Embutidos de massa escaldada – ex.: morcelas, pastas ou patês.
- Embutidos de massa crua ou semi-crua – dessecados (ex.: salames, paio) e frescais (ex.: lingüiças diversas).

Exemplos de produtos de salsicharia não embutidos são: bolos de carne, hambúrgueres, quibes, almôndegas e etc. (GUAHYBA, 2005).

Segundo artigo 412 do RIISPOA: entende-se por “embutido” todo produto elaborado com carne ou órgãos comestíveis curados ou não, condimentado, cozido ou não, defumado e dessecado ou não, tendo como envoltório tripa, bexiga ou outra membrana animal.

### 2.1.2 Matéria-prima

O RIISPOA, independentemente da disciplinação do emprego de aditivos, ligadores, condimentos e especiarias, água e gelo e da caracterização de determinados produtos de salsicharia, proíbe, para o preparo de produtos alimentícios, o emprego de amídalas, glândulas salivares, ovários, baço, nodos linfáticos e hemolinfáticos e testículos.

### 2.1.3 Aditivos e ingredientes

O emprego dos aditivos, do calor e do frio, bem como do uso de boas práticas de fabricação possibilitam a obtenção de produtos cárneos saudáveis e seguros (TERRA, 2003). Os aditivos mais empregados em produtos de salsicharia nos estabelecimentos sob inspeção federal, a par dos respectivos códigos, são (GUAHYBA, 2005):

- **Conservadores** – nitratos (P.VII) e nitritos (P.VIII);
- **Estabilizantes** – polifosfatos (ET.IV);
- **Antioxidantes** – ácido ascórbico (A.I);
- **Corantes** – corantes naturais (urucum) (C.I);
- **Acidulantes** – glucono-delta-lactona (H.X);
- **Umectantes** – propilenoglicol (U.IV);
- **Antiumectantes** – fosfato tricálcico (A.U.III);
- **Aromatizantes-flavorizantes** – essências naturais (F.I).

### 2.1.4 Diagrama geral de fabricação dos embutidos

#### 1- Trituração

O grau de trituração difere muito dos distintos produtos elaborados e freqüentemente constitui uma característica particular de cada produto; alguns são compostos de carne picada grosseiramente e outros de massa fina.

Os equipamentos normalmente utilizados são picadoras ou trituradoras, “cutters” e moinhos (ROÇA, 2004).

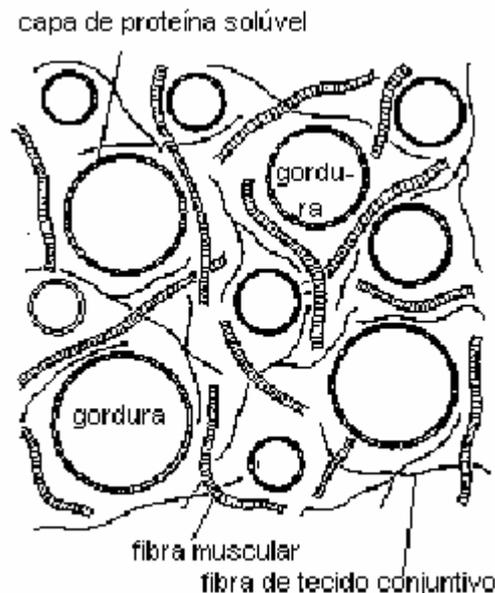
## 2- Mistura

Uma fase prévia da emulsão consiste na mistura da carne, especiarias e outros condimentos. Nesta fase, os ingredientes, especialmente os sais de cura e os condimentos devem ser distribuídos o mais uniformemente possível (ROÇA, 2004).

## 3- Emulsão

A emulsão da carne constitui um sistema de duas fases, a fase dispersa formada por partículas de gordura sólida ou líquida e a fase contínua por água que contém dissolvidas e suspensas proteínas solúveis. Na emulsão da carne, as proteínas solúveis dissolvidas na fase aquosa atuam como agentes emulsionantes, recobrando todas as partículas de gordura dispersas (Figura 1).

**FIGURA 1** - ESQUEMA DE UMA EMULSÃO DE CARNE.



**FONTE:** FORREST et al., 1979.

Para que a emulsão cárnea seja estável, é absolutamente necessário as proteínas se encontrarem dissolvidas ou solubilizadas. As proteínas miofibrilares (actina e miosina) são insolúveis em água e soluções salinas diluídas, mas são solúveis em solução salina mais concentrada. Uma das funções mais importantes do

sal nas emulsões de embutidos é solubilizar estas proteínas na fase aquosa para que se encontrem em condições de recobrir as partículas de gordura (2% de sal na massa de carne é adequado, 3% é um pouco mais efetivo e acima de 3% poderá haver restrições quanto à palatabilidade). O sal e a trituração causam ruptura das paredes celulares em consequência, as proteínas solúveis em sal são extraídas (ROÇA, 2004).

## 2.2 FATORES PARA SEGURANÇA DOS ALIMENTOS

### 2.2.1 Processo de cura

Os produtos cárneos curados são aqueles em cuja elaboração são utilizados os sais de cura. Estes sais são constituídos de uma mistura de cloreto de sódio, nitrato e nitrito ou de apenas cloreto de sódio e nitrito. A cor final do produto curado depende da mistura de quantidades convenientes dos sais de cura com a mioglobina, existente na carne (TERRA, 2003).

Adicionados os sais de cura à massa cárnea, ocorrem uma série de reações, resultando na formação de NO. A passagem de nitrito a ácido nitroso é facilitada em pH ácido (pH = 5,7); por isso, nas curas rápidas para lingüiças, é prática corrente a adição de ácido cítrico (TERRA, 2003).

Tanto durante a geração de NO como do hemocromo, há necessidade de um ambiente redutor, o que justifica o uso do ácido ascórbico ou de seus sais, bem como de certos açúcares (TERRA, 2003).

É importante ter cuidado na quantidade de sais de cura utilizados na mistura com a carne, pois os extremos podem ser nocivos ao consumidor. Em certas situações, o nitrito residual pode, junto às aminas secundárias existentes na carne, originar as nitrosaminas. Estas são potencialmente cancerígenas, visto gerarem o cátion nitrênio que, ao reagir com o DNA, provoca mutações. Tanto o fixador de cor (ácido ascórbico e seus sais) como os “starter” impedem a formação das nitrosaminas (TERRA, 2003).

Muitos problemas de coloração dos produtos cárneos são devidos à alta porcentagem de metamioglobina entre os pigmentos resultantes da cura.

A cura além de colaborar para o desenvolvimento da cor e do aroma, protege contra vários microrganismos e contra a oxidação da gordura (TERRA, 2003). A atividade antimicrobiana dos nitritos depende do pH e aumenta à medida que este último diminui de 7,0 a 5,0 (ICMSF, 1980).

O cloreto de sódio é um ingrediente de grande importância na industrialização de carnes. O sal em altas concentrações inibe o crescimento microbiano por aumento da pressão osmótica e redução da atividade água. Já em baixas concentrações, favorece a retenção de água pela carne. As concentrações normalmente empregadas na formulação dos embutidos (2-3%) não exercem ação conservadora, e sim aromatizante (GUAHYBA, 2005).

Os açúcares, quando adicionados sob a forma de monossacarídeos às formulações de embutidos, servem como fonte de energia para o desenvolvimento do cultivo iniciador, que produz ácidos orgânicos baixando o pH e inibindo os microrganismos patogênicos.

### **2.2.2 Resfriamento**

Possivelmente a temperatura seja o fator mais importante, que afeta a viabilidade e o desenvolvimento dos microrganismos. Ela interfere na duração da fase de latência, na velocidade de crescimento, no número final de células, nas necessidades nutritivas e na composição química e enzimática das células. A temperatura envolvida no processamento e armazenagem de um alimento contribui na determinação da microbiota contaminante (TABELA 1).

Os efeitos letais da refrigeração e do congelamento dependem do microrganismo considerado, do microambiente e das condições de armazenamento. Consideram-se temperaturas de refrigeração aquelas que vão de  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Quando os alimentos são refrigerados e mantidos a temperaturas adequadas, a deterioração somente ocorrerá em função dos psicrotróficos (ICMSF, 1980).

**TABELA 1** – Temperaturas importantes para os microrganismos procarióticos.

Grupos	Temperatura (°C)		
	Mínima	Ótima	Máxima
Termófilos	40 – 45	55 – 75	60 – 90
Mesófilos	5 – 15	30 – 45	35 – 47
Psicrófilos	-5 – 5	12 – 15	15 – 20
Psicrotróficos	-5 – 5	25 – 30	30 – 35

FONTE: ICMSF, 1980.

### 2.2.3 pH e Acidez

A acidez pode ser um fator básico na preservação ou ter um papel auxiliar, cujo efeito se combina com outros fatores tais como: conservadores químicos, temperatura, atividade de água e etc. As células de diferentes espécies microbianas apresentam tolerância distinta a acidificação interna, ou a acumulação de ânions, e suas membranas exibem características diversas quanto à permeabilidade por ácidos lipofílicos.

Os ácidos orgânicos são bacteriostáticos mais eficientes, normalmente, a baixas temperaturas (ICMSF, 1980).

### 2.2.4 Fermentação cárnea

A descoberta do processo de conservação de carnes foi ao acaso por meio de tentativas, pela adição de cloreto de sódio e açúcar, seguido por um período de armazenagem. A adição destes ingredientes não pretendia, somente, lançar um novo produto no mercado, mas gerar maior vida-de-prateleira (GRIS et al., 2004). O principal objetivo da fermentação das carnes é a conservação do produto, contribuindo para a estabilidade e qualidade (WARD, 1991). Com o tempo, observou-se que o processo de fermentação melhorava pelo uso de uma porção retirada do produto já fermentado para iniciar o próximo lote. Isso representou o primeiro uso de cultura “starter”, pois, anteriormente, as fermentações ocorriam devido à presença de uma microbiota natural da carne crua (GRIS et al., 2004).

Na fermentação espontânea, que ocorre durante a etapa de maturação dos embutidos fermentados, o antagonismo microbiano é utilizado empiricamente (HUGAS e MONFORT, 1997; LÜCKE, 2000).

Os microrganismos presentes ou adicionados aos alimentos podem atuar como (MEDINA, 2004):

- agentes originadores de sabores e características físicas desejáveis;
- originadores de sabores estranhos e defeitos físicos e,
- contaminantes produtores ou não de toxinas microbianas.

Os microrganismos utilizados industrialmente devem apresentar características tais como: atividade metabólica rápida e específica; constância fisiológica; necessidades operacionais simples e resistência (MEDINA, 2004).

As bactérias lácticas 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 antagonísticas, especialmente ácidos e bacteriocinas. (HUGAS e MONFORT, 1997; LÜCKE, 2000; DE MARTINS et al., 2002).

#### **2.2.4.1 “Starters” para embutidos**

A utilização de cultivos “starters” para a produção de embutidos fermentados vem sendo estudada para que seja possível a elaboração de produtos de alta qualidade, padronizados e que apresentem melhora nas características organolépticas, em um curto período de maturação (PAPAMANOLI et al., 2002).

Cultivos “starters” para carnes são preparações com microrganismos vivos que desenvolvem uma atividade metabólica desejável na carne (TYÖPPÖNEN, 2002).

Os cultivos iniciadores usados em produtos cárneos curados consistem, normalmente, de um microrganismo tipicamente acidificante como *Lactobacillus sp* ou *Pediococcus sp.* para estabilizar o produto biologicamente, e um organismo com características nitrato redutoras. Este microrganismo nitrato redutor, normalmente, é *Micrococcus sp.* ou *Staphylococcus* coagulase negativa (GRIS et al., 2004). Os

“starters” para essa finalidade podem ser isolados apenas de plantas ou de carne (HUGAS e MONFORT, 1997).

Os microrganismos utilizados como “starters” em embutidos fermentados devem apresentar determinadas características (GRIS et al., 2004):

- boa produção de ácido láctico;
- relação adequada de crescimento em diferentes temperaturas;
- resistência durante a fermentação;
- formação de sabor e não formação de peróxido e aminas biogênicas;
- tolerar ou possuir efeito de sinergismo com outros componentes do “starter”;
- efeito antagônico com patógenos e outros microrganismos indesejáveis presentes no processo tecnológico e,
- gerar fatores que acrescentem valores nutricionais e econômicos ao produto final.

Os “starters” bacterianos podem realizar uma ou mais das seguintes atividades: glicólise, proteólise, lipólise e produção de exopolissacarídeo (MEDINA, 2004).

Normalmente se empregam dois tipos de cultivos iniciadores (UBA, 2004):

- **Simples ou definido** – constituído por uma única cepa ou um grupo de cepas identificadas.
- **Mescla ou composto** – mais de uma cepa, cada uma das quais com características especiais.

A preparação de “starters” concentrados é feita por cultivos em batelada; sendo as principais etapas (UBA, 2004):

1. Escolha do meio de crescimento (que normalmente é complexo);
2. Incubação – temperatura, agitação, aeração e pH controlados (pH = 6);
3. Separação das células (centrifugação);
4. Escolha de diluente adequado e,
5. Conservação (congelamento ou liofilização).

Os fatores que afetam a elaboração dos “starters” são (MEDINA, 2004):

- tipo de microrganismo;
- inóculo;
- substrato (tipo, concentração e qualidade) e,
- temperatura.

O uso de cultivos iniciadores tem propiciado às indústrias obter processos de fermentação e produtos mais uniformes e seguros, com redução de tempo de maturação, gerando-se desta maneira, produtos com melhores características organolépticas, nutricionais, químicas e microbiológicas (GRIS et al., 2004).

Os fatores de seguridade introduzidos pelos sais de cura, crescimento seletivo de bactérias lácticas e o emprego da refrigeração minimizam a possibilidade de desenvolvimento de agentes patogênicos (ICMSF, 1980).

## 2.3 CARACTERÍSTICAS DAS BACTÉRIAS EMPREGADAS COMO “STARTERS”

### 2.3.1 *Lactobacillus sake*

Os *Lactobacillus* encontram-se divididos em 3 grupos segundo suas características metabólicas:

- homofermentadores obrigatórios (Grupo A) – as hexoses (<85%) são fermentadas a ácido láctico pela via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), ausência de fosfocetolase e da fermentação de pentoses,
- heterofermentadores facultativos (Grupo B) – as hexoses são fermentadas quase que exclusivamente a ácido láctico pela via EMP, presença de aldolases e fosfocetolases, fermentação de pentoses; na presença de glucose as enzimas da via do fosfogluconato são reprimidas,
- heterofermentadores obrigatórios (Grupo C) – hexoses são fermentadas pela via do fosfogluconato produzindo quantidades equimolares de lactato, etanol (acetato) e CO<sub>2</sub>, pentoses podem ser fermentadas.

*Lactobacillus sake* pertence ao grupo filogenético de *Lb. casei-Pediococcus* e ao Grupo B. Suas células são bastões com terminações rombudas, 0,6-0,8 por 2,0-3,0 µm, ocorrendo individualmente ou em pequenas cadeias. Durante a fase estacionária de crescimento podem mostrar-se ligeiramente curvos e irregulares. Algumas cepas crescem de 2-4 °C. Possuem racemase do ácido láctico e a indução desta, na maioria das cepas, é reprimida pela presença de acetato. A maioria das

cepas produz L(+)-ácido láctico em caldo MRS; entretanto algumas produzem ácido láctico inativo neste meio (WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H., 1995).

### 2.3.2 *Pediococcus pentosaceus*

Pertence ao grupo filogenético de *Lb. casei-Pediococcus*. Suas células apresentam de 0,6-1,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro, ocorrendo individualmente, em pares, tétrades, ou em agrupamentos irregulares. O crescimento ocorre a pH 8,0 e pH 4,5. O intervalo de máxima temperatura para crescimento é 39-45 °C. O intervalo ótimo de temperatura para o crescimento é 28-32 °C. Há crescimento na presença de 9-10% de NaCl. É capaz de fermentar maltose e hidrolizar arginina. É incapaz de hidrolizar amido, produzir gás a partir do gluconato e fermentar sucrose e melitose. Produz DL-ácido láctico a partir da glucose. Algumas cepas produzem pediocinas.

A maioria das cepas de *Pediococcus pentosaceus* subsp. *intermedius* apresenta faixa de crescimento de 8-45 °C (WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H., 1995).

### 2.3.3 *Staphylococcus carnosus* subsp. *carnosus*

Apresentam-se na forma de cocos Gram positivos, imóveis, não esporuláveis. Quando visualizados ao microscópio ótico, suas células podem se encontrar sozinhas, aos pares ou em pequenos “cachos”. São anaeróbios facultativos, catalase positivos, coagulase negativo, reduzem nitratos a nitritos e nitritos. Mostram-se sensíveis a novobiocina e a lisostafina (200  $\mu\text{g/mL}$ ), resistentes a lisozima (1600  $\mu\text{g/mL}$ ). Crescem facilmente a temperatura de 15-42 °C. Suportam concentrações de até 15% de cloreto de sódio (EUZÉBY, 2006).

#### 2.3.4 *Staphylococcus xylosus*

É capaz de crescer numa faixa de temperatura entre 15 – 45 °C, em concentrações de NaCl de até 15%, mas não cresce em pH inferior a 5,4 (GEISEN et al., 1992). Segundo Geisen et al. (1992) e Lücke (1994), as atividades metabólicas desenvolvidas por este microrganismo e de interesse em produtos fermentados são: produção de catalase, nitrato redutase, redução do oxigênio na superfície do produto e liberação de enzimas proteases e lipases, que auxiliam no desenvolvimento do aroma e sabor.

#### 2.3.5 *Lactobacillus sp.*

O lactobacilo LC1 foi isolado de salame artesanal não inoculado e o LS1, produtor de substância inibitória tipo bacteriocina, foi obtido da coleção do Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB) da Universidade Federal do Paraná.

### 2.4 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS

#### 2.4.1 Patógenos presentes em embutidos

O objetivo primordial da higiene dos alimentos é proteger a saúde do consumidor. As alterações alimentares comumente denominadas intoxicações alimentares, podem ter sua causa entre as citadas abaixo:

- alterações biológicas e/ou microbiológicas do alimento;
- presença de substâncias químicas nocivas ou em quantidades nocivas.

No primeiro grupo encontram-se as alterações causadas por vírus e organismos uni/pluricelulares e seus produtos metabólicos. Esses agentes podem

gerar enfermidades infecciosas, quando da ingestão de quantidade suficiente do agente viável; ou intoxicações, quando da ingestão de metabólitos tóxicos pré-formados. Em muitos casos os sintomas da intoxicação aparecem combinados com os da infecção, passando o quadro a ser denominado de toxiinfecção (SINELL, 1981).

Os agentes causais do segundo grupo podem originar ações tóxicas em longo prazo ou mesmo agudas.

Microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre:

- a ocorrência de contaminação de origem fecal,
- a presença de patógenos,
- a deterioração potencial do alimento e
- as condições higiênico-sanitárias do processamento, produção e armazenamento.

A flora da carne fresca é constituída por microrganismos Gram negativos e espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, *Moraxella* e *Acinetobacter*, além de representantes da família *Enterobacteriaceae* (BARBUTI e PAROLARI, 2000).

A carne devido ao seu elevado valor nutricional e à sua grande quantidade de água disponível, torna-se um meio propício ao crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (TERRA, 2003). Tem sido relatada, em embutidos, presença de diferentes tipos de patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e outros (BARBUTI e PAROLARI, 2002). Os microrganismos presentes na superfície do pernil resfriado provêm de operações posteriores ao sacrifício do animal e sua origem pode ser tanto ambiental quanto intestinal (CORNEJO et al., 1988).

#### **2.4.1.1 Salmonelas**

O agente causal da salmonelose é bacilo gram negativo, na grande maioria móvel, com flagelos peritríqueos. É de grande importância epidemiológica a divisão

do gênero *Salmonella* em tipos sorológicos, os quais são distribuídos num esquema de identificação prática denominado esquema de Kauffmann & White. A patogenicidade das salmonelas varia de acordo com o tipo sorológico, idade e condições de saúde do hospedeiro. De modo geral, as salmonelas causam no adulto normal, apenas uma enterocolite que evolui sem complicações e desaparece dentro de uma semana ou menos (excetuando-se a *S. typhi* e as *S. paratyphi A* e *B*). Nas crianças as salmonelas frequentemente invadem a circulação provocando infecção em outros órgãos (TRABULSI, 1998).

Não são inibidas pelas concentrações usuais de NaCl, nitritos, nem pelo pH de muitos alimentos. No entanto são facilmente destruídas por tratamento térmico e a maioria das espécies não cresce a temperaturas inferiores a 6 °C (ICMSF, 1980).

#### **2.4.1.2 *Listeria***

O gênero *Listeria* compreende a *L. monocytogenes*, que é patogênica para o homem e várias outras espécies não patogênicas. A *L. monocytogenes* pode ser subdividida em grupos e tipos sorológicos, com base em seus antígenos somáticos e flagelares. Uma característica importante desse microrganismo é a capacidade de causar beta-hemólise (TRABULSI, 1998). *Listeria* spp. são bacilos anaeróbios facultativos, que não formam esporos, não tem cápsula e são móveis dentro do intervalo de temperatura de 10 a 25 °C (COLLINS et al., 1991).

Os sinais clínicos de infecção por *L. monocytogenes* são muito parecidos em todos os hospedeiros suscetíveis. Duas formas básicas de apresentação podem ser distinguidas: listeriose perinatal e listeriose no paciente adulto. Em ambos os casos, a forma clínica predominante corresponde à infecção generalizada ou a infecção local do sistema central (SCHUCHAT et al., 1991).

A *L. monocytogenes* pode ser um problema em produtos cárneos fermentados com atividade água relativamente alta e produção insuficiente de ácido. Em produtos cárneos, condições de elevada temperatura e lenta produção de ácido podem favorecer a multiplicação desse tipo de microrganismo (SCHILLINGER, 1996).

#### 2.4.1.3 *Campylobacter*

O gênero *Campylobacter* é constituído de bacilos gram negativos curvos, espiralados ou em forma de S. São móveis e podem apresentar flagelo monotríqueo ou politríqueo. São microaerófilos restritos, precisando de 5-6% de O<sub>2</sub> para proliferar (TRABULSI, 1998).

O *C. jejuni* é um germe enteropatogênico que eventualmente invade a circulação, causando infecções em diferentes órgãos. A infecção intestinal localiza-se nos intestinos delgado e grosso, onde a bactéria adere e prolifera. Na maioria dos pacientes a manifestação principal da infecção é diarreia aquosa, semelhante à causada por bactérias enterotoxigênicas. Este microrganismo também é capaz de produzir uma enterotoxina, semelhante à enterotoxina termolábil de *E. coli*, podendo estar envolvida na manifestação da diarreia (TRABULSI, 1998).

#### 2.4.1.4 *Staphylococcus aureus*

A intoxicação alimentar estafilocócica é provocada pela ingestão de toxinas previamente formadas no alimento contaminado por *S. aureus*. Essas toxinas são chamadas enterotoxinas, sendo atualmente cinco (A, B, C, D e E). As enterotoxinas estafilocócicas são termoestáveis. Entre os sintomas de intoxicação por esse agente estão vômito e diarreia (TRABULSI, 1998).

Quando as condições são favoráveis nos alimentos, os estafilococos se multiplicam e ao alcançarem níveis próximos a 10<sup>5</sup> UFC/g, quantidade suficiente de enterotoxina para causar intoxicação já terão sido formada. A causa mais freqüente desse tipo de intoxicação é a manutenção dos alimentos a temperaturas não adequadas (MOSSEL, 1993).

A formação de toxinas é possível dentro da faixa de temperatura que vai de 6,7 a 45,5 °C. A produção de toxinas pode não ocorrer a a<sub>w</sub> = 0,89 e mesmo a baixos valores de pH (4,0) (SINELL, 1981).

A maioria das carnes curadas contém apenas de 3 – 6 % de NaCl na fase aquosa, o que constitui um ambiente apto para a produção de toxina por *S. aureus*;

na presença de oxigênio suficiente. Contudo, em embutidos fermentados, as condições anaeróbias do interior da massa, constituem um sistema inibidor de seu crescimento e toxigênese. Mesmo sendo capaz de crescer a 7 °C, a produção de enterotoxinas é fortemente afetada pelas baixas temperaturas. Além disso, é um microrganismo facilmente destruído pelo calor (ICMSF, 1980).

#### **2.4.1.5 *Clostridium***

São conhecidos sete tipos toxigênicos de *C. botulinum*, sendo que as toxinas têm o mesmo mecanismo de ação diferindo apenas imunologicamente. O homem é sensível às toxinas A, B, E e F (TRABULSI, 1998).

Tem-se conhecimento de 3 formas clínicas de botulismo. A mais comum é o botulismo da intoxicação alimentar que se estabelece em consequência da ingestão da toxina pré-formada no alimento contaminado (TRABULSI, 1998).

Algumas espécies são capazes de se desenvolver a temperaturas inferiores a 15 °C, porém muito lentamente. Contudo, os esporos parecem ser mais afetados pelo pH e composição do meio, que pela temperatura. *Clostridium botulinum*, principalmente o do tipo B, pode ser encontrado em carnes cruas e curadas e pode se desenvolver naquelas submetidas a um curado suave e que se conservam a temperaturas maiores que 15 °C. Muitas cepas e as toxinas de *Clostridium botulinum* se destroem facilmente a temperaturas moderadas (60 – 80 °C) (ICMSF, 1980).

*C. perfringens* pode causar infecções ao nível de vários órgãos e tecidos, as mais conhecidas sendo: intoxicação alimentar, gangrena gasosa e infecções intra-abdominais. O agente da intoxicação alimentar é *C. perfringens* tipo A. Os alimentos geralmente implicados são: carne de mamíferos e aves fria ou requeimada, empanadas, molhos e de modo especial os pratos pré-cozidos. Após a ingestão de um alimento com quantidades iguais ou superiores a 10<sup>6</sup> células vegetativas/g os germes se multiplicam no intestino e esporulam. Durante a esporulação ocorre a formação e a liberação da enterotoxina. Os sintomas se apresentam de 8 a 24 h depois da ingestão do alimento e consistem principalmente em espasmos abdominais e diarreia (MOSEL, 1993).

#### 2.4.1.6 *Escherichia*

Em torno de 60, dos 171 sorogrupos O de *E. coli*, são mais frequentemente encontrados em associação com o homem. Dos 60, aproximadamente 35 sorogrupos são agentes de infecção intestinal, correspondendo a 4 categorias de *E. coli* enteropatogênicas denominadas: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (TRABULSI, 1998).

As EPEC são os agentes mais freqüentes de diarreia infantil, no Brasil. Os mecanismos de patogenicidade destes cocobacilos envolvem aderência à mucosa intestinal e talvez a produção de toxinas (TRABULSI, 1998).

A principal manifestação clínica provocada pela EHEC é a diarreia sanguinolenta. A doença colite hemorrágica, descrita nos EUA e Canadá, foi associada à ingestão de hambúrgueres contaminados com *E. coli* O157:H7. As EHEC produzem duas citotoxinas, conhecidas por verotoxinas I e II. Vários estudos sugerem que estas toxinas são as substâncias responsáveis pela hemorragia intestinal e também pela síndrome hemolítica-urêmica que às vezes, acompanha a colite hemorrágica (TRABULSI, 1998).

## 2.5 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial possibilita um controle dos atributos sensoriais de qualidade, mas não visa à proteção do consumidor. Entretanto é um meio para os fabricantes de alimentos determinarem a preferência e aceitação do mercado, frente a novos produtos (VAZ, 2005).

Os métodos de análise sensorial podem ser classificados como discriminativos, descritivos e afetivos. Segundo Pereira e Amaral (1997), os métodos descritivos definem os atributos importantes de um alimento (cor, sabor, textura) e medem a intensidade de tais atributos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAS

Para o isolamento dos microrganismos foram utilizados 11 embutidos produzidos de maneira artesanal (sem aditivos microbianos) e que apresentaram boas condições de higiene e qualidade. Os produtos foram adquiridos no comércio da região sul do Brasil, em locais onde exista a tradição na produção de embutidos fermentados.

As amostras foram armazenadas sob refrigeração até o momento do isolamento.

#### 3.2 MEIOS DE CULTIVO

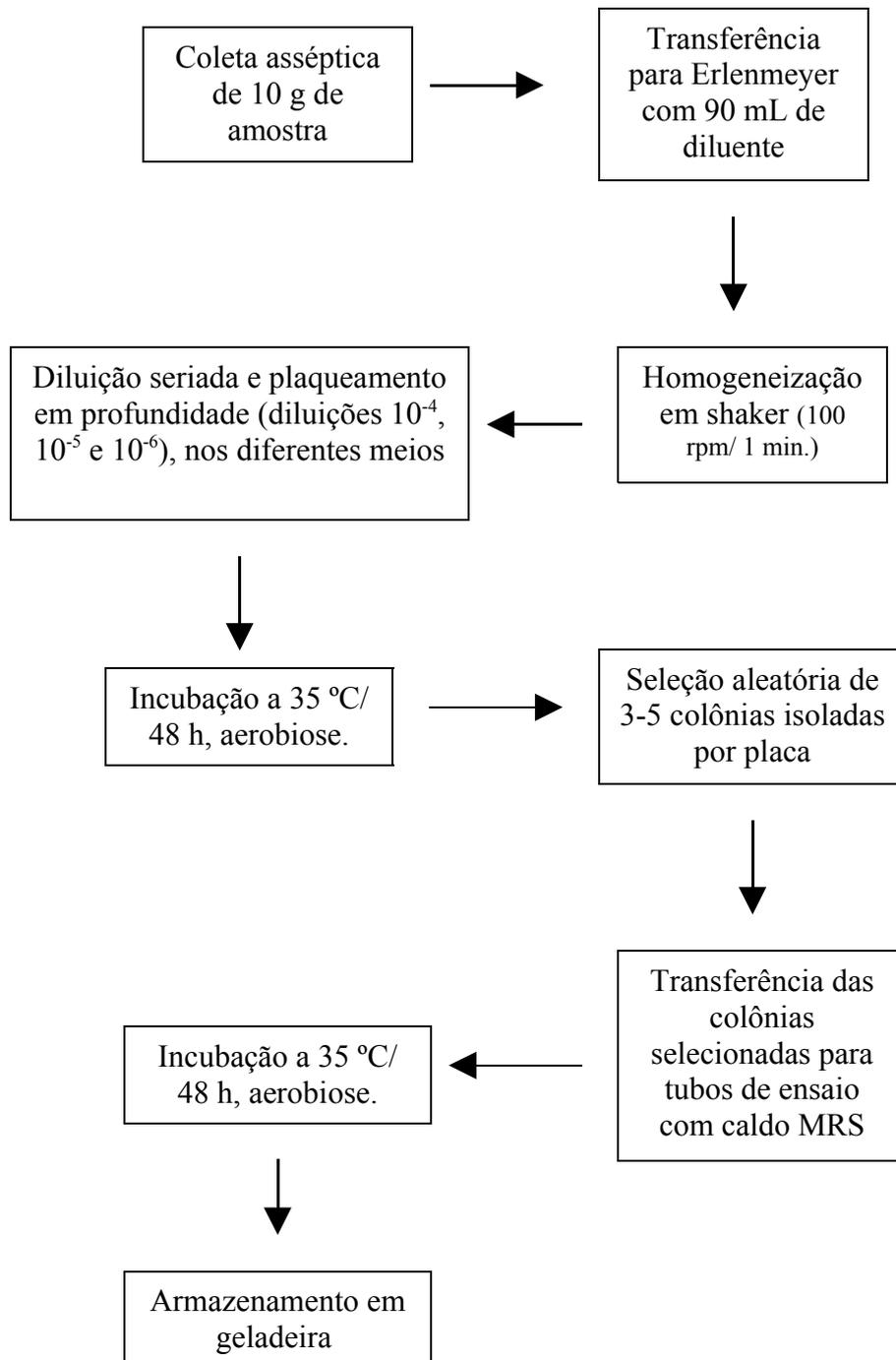
Os meios utilizados para o isolamento, crescimento e manutenção das cepas de bactérias lácticas foram: MRS, APT e Eliker. Para o crescimento e manutenção das cepas de estafilococos foi utilizado meio sal-manitol (MANUAL DIFCO, 1984).

#### 3.3 ISOLAMENTO E ANÁLISE DAS BACTÉRIAS DE INTERESSE

Asceticamente, foram coletados 10 g de amostra de cada embutido e transferidos para Erlenmeyers com 90 mL de diluente estéril contendo peptona ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ), NaCl ( $0,85 \text{ g.L}^{-1}$ ) e Tween 80 ( $1 \text{ mL.L}^{-1}$ ). Homogeneizou-se por 60 segundos a 100 rpm utilizando "shaker". Diluições apropriadas para cada amostra foram preparadas em água peptonada ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) e inoculadas em duplicata em meio de cultivo para proceder ao isolamento. As cepas de bactérias lácticas foram cultivadas em ágar MRS, APT e Eliker. As condições de incubação foram: aerobiose, 35 °C por

48 horas. O esquema do procedimento utilizado para o isolamento se encontra na Figura 2.

**FIGURA 2 – ESQUEMA DO PROCEDIMENTO PARA ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DE EMBUTIDOS ARTESANAIS.**



Foram selecionadas e purificadas colônias crescidas na superfície dos diversos meios de cultivo, que apresentaram aspecto macroscópico distinto. As culturas puras foram primeiramente caracterizadas segundo a coloração pelo método de Gram, morfologia celular e prova da catalase. Cocos, cocobacilos e bacilos Gram positivos que apresentaram catalase negativa foram submetidos a provas fisiológicas.

As provas fisiológicas foram: produção de CO<sub>2</sub> e crescimento a diferentes temperaturas. Para a prova de produção de gás as cepas isoladas foram cultivadas em caldo MRS com tubos de Duhran, sem citrato de amônio, com inóculo de 10% (v/v) e incubadas a 35 °C por 24 horas (SCHILLINGER e LÜCKE, 1987). Para a prova de crescimento a diferentes temperaturas, as cepas foram inoculadas a 10% em MRS e incubados a 5 °C, 10 °C e 15 °C, por período de 3-7 dias. Num primeiro momento o crescimento foi avaliado como positivo (com turvação a olho nu) ou negativo (sem turvação a olho nu).

Avaliou-se a variação do pH das bactérias lácticas isoladas cultivando-as em caldo MRS inoculado a 10% e incubado a 35 °C por 48h. Sendo que o pH foi verificado após 24 e 48 horas de incubação.

### 3.4 MANUTENÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS

As cepas de bactérias lácticas foram mantidas em ágar MRS a 4 °C (MURO e LUCHI, 1989).

### 3.5 SELEÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS

Em resumo, os critérios determinantes na seleção das cepas isoladas para aplicação na produção de lingüiça toscana foram:

- ser Gram positiva;
- catalase negativa;

- negativa para produção de CO<sub>2</sub>;
- crescimento positivo a 5 °C e
- após 48 horas de incubação pH entre 5,5 e 5,0.

As bactérias selecionadas para inoculação das lingüiças tiveram seu crescimento (a 5 °C e a 15 °C) acompanhado até estabelecimento da fase estacionária, por leitura da absorbância a 660 nm em espectrofotômetro UV/visível.

### 3.6 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA PARA ELABORAÇÃO DE LINGÜIÇA FRESCA “TIPO TOSCANA” NÃO DEFUMADA

A carne suína (pernil desossado) foi adquirida em açougue, gozando de boa reputação, no comércio local da cidade de Santa Maria (ensaios 1 e 2) e de Curitiba (ensaio 3). A carne foi comprada no mesmo dia em que seria processada e até aquele momento foi mantida sob refrigeração. Os demais ingredientes foram adquiridos em estabelecimento destinado à comercialização de insumos para estabelecimentos comerciais de pequeno porte; também do comércio local das cidades citadas acima.

### 3.7 CULTURAS INICIADORAS

Foram utilizadas as seguintes combinações de microrganismo para a inoculação das lingüiças:

**Tratamento 1** - *Lactobacillus sake* (*Lact. sake*) e *Staphylococcus carnosus*  
(*St. carnosus*)

**Tratamento 2** – *Lactobacillus LC1* e *Staphylococcus xylosus* (*St. xylosus*)

**Tratamento 3** – *Pediococcus pentosaceus* (*Ped. pentosaceus*) e *Staphylococcus xylosus* (*St. xylosus*)

**Tratamento 4** – *Lactobacillus LS1* e *Staphylococcus xylosus* (*St. xylosus*)

A cepa de *Lactobacillus* LC1 foi isolada neste trabalho e as demais cepas citadas anteriormente foram obtidas do banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR (LPB). Cada microrganismo foi cultivado individualmente em meio comercial específico a 35° C por 48 h. A biomassa produzida foi separada por centrifugação a 4500 rpm, com temperatura controlada de 10° C. Em seqüência procedeu-se a liofilização destas, utilizando como crioprotetor o leite desnatado. A concentração da biomassa liofilizada foi determinada através da contagem de células viáveis em ágar MRS (para as BAL) e ágar sal-manitol (para os estafilococos).

### 3.8 ELABORAÇÃO DA LINGÜIÇA “TIPO TOSCANA” Não defumada

Para a elaboração das lingüiças foi utilizada a seguinte formulação base:

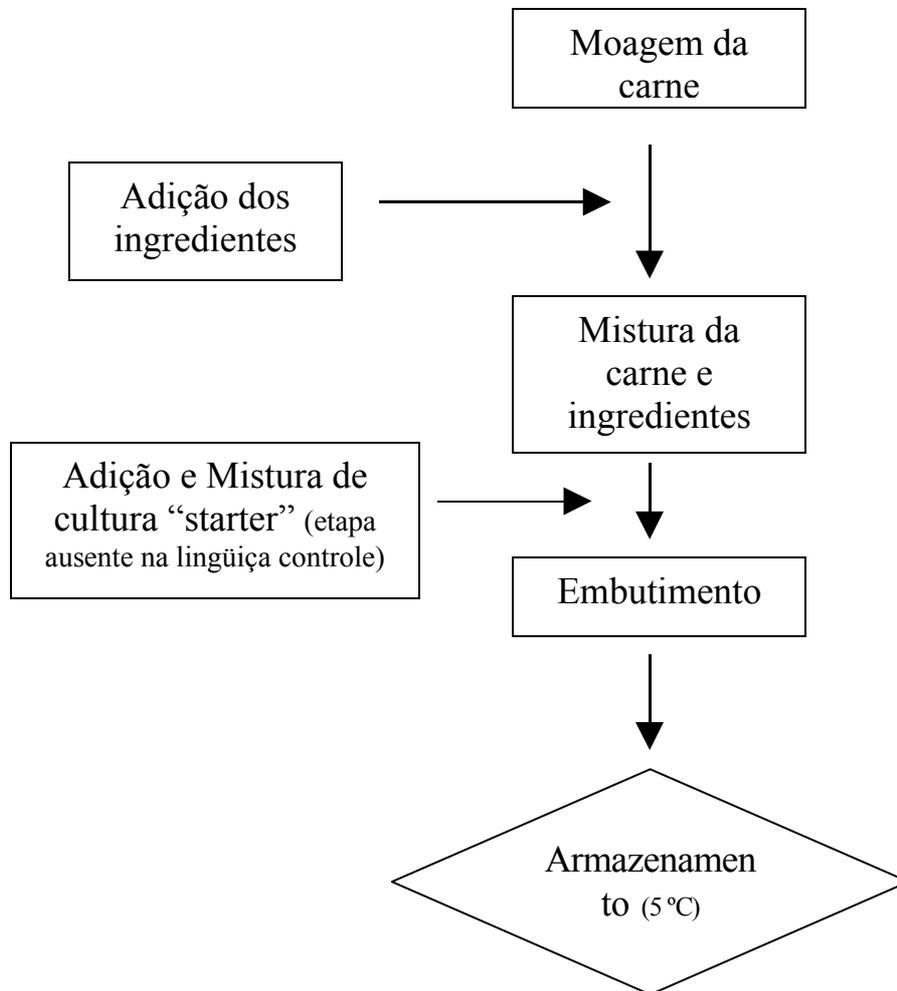
**TABELA 2** - Formulação base de lingüiça fresca “tipo toscana”.

<b>Matéria-prima</b>	<b>Quantidades (Kg)</b>
Pernil suíno desossado (30% G)	100.0
<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidades (Kg)</b>
Água destilada gelada	10.0
Sal (Synth)	0.60
Condimento completo para lingüiça toscana (Dicarne)	1.0
Cura R15 (Dicarne)	0.54
Fixador de cor R40 (Dicarne)	0.90
Alho	0.05
Pimenta branca	0.05
Glicose anidra (Synth)	0.20

FONTE: A autora.

A carne foi moída em moedor com disco nº 5 e homogeneizada manualmente com os demais ingredientes e o embutimento foi feito com embutideira manual. O embutimento foi feito em tripa suína (calibre 40), previamente mantida em solução aquosa de vinagre.

Diagrama de fluxo do Processamento Geral de Lingüiças é apresentado na Figura 3:

**FIGURA 3 – DIAGRAMA DE FLUXO DO PROCESSAMENTO GERAL DE LINGÜIÇA**

A partir dessa massa obteve-se um lote de lingüiça controle e outros quatro com diferentes culturas iniciadoras. Foram realizados 3 ensaios seqüenciais conforme consta na Tabela 3.

O ensaio 1 foi realizado no Laboratório de Microbiologia de alimentos na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob orientação do professor Dr. Nelcindo Nascimento Terra. As análises deste ensaio foram iniciadas no dia 13/10/2005 e encerradas no dia 31/10/2005. O ensaio 2 foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos na UFSM, sob orientação do professor Dr. Nelcindo

Nascimento Terra. As análises deste ensaio foram iniciadas no dia 04/11/2005 e encerradas no dia 27/11/2005. E o ensaio 3 foi realizado no frigorífico de propriedade do Sr. Antonio Juglair Pereira, localizado num município da região metropolitana da cidade de Curitiba. As análises deste ensaio tiveram início no dia 13/12/2005 e término no dia 27/12/2005.

**TABELA 3 – Esquema seguido na realização dos ensaios.**

<b>Ensaio</b>	<b>Tratamentos</b>	<b>Quantidade dos “starters” (UFC/100 g de carne)</b>	<b>Duração e condições das análises</b>
1	1.1	<i>Lact. sake</i> – $5,0 \times 10^6$ <i>St. carnosus</i> – $4,5 \times 10^6$	16 dias a 5 °C
	1.2	<i>Lactobacillus</i> LC1 – $4,9 \times 10^7$ <i>St. xylosus</i> – $8,7 \times 10^6$	
	1.3	<i>Ped. pentosaceus</i> – $5,0 \times 10^6$ <i>St. xylosus</i> – $1,16 \times 10^7$	
2	2.1	<i>Lact. sake</i> – $1,5 \times 10^7$ <i>St. carnosus</i> – $9,0 \times 10^6$	25 dias a 5 °C
	2.2	<i>Lactobacillus</i> LS1 – $1,47 \times 10^8$ <i>St. xylosus</i> – $1,74 \times 10^7$	
	2.3	<i>Ped. pentosaceus</i> – $1,0 \times 10^7$ <i>St. xylosus</i> – $2,32 \times 10^7$	
3a	3a.1	<i>Lact. sake</i> – $3,0 \times 10^8$ <i>St. carnosus</i> – $1,5 \times 10^9$	8 dias a 5 °C e 4 dias a 15 °C
	3a.2	<i>Lactobacillus</i> LC1. – $2,94 \times 10^{10}$ <i>St. xylosus</i> – $1,0 \times 10^9$	
	3a.3	<i>Ped. pentosaceus</i> – $5,0 \times 10^9$ <i>St. xylosus</i> – $1,0 \times 10^9$	
	3a.4	<i>Lactobacillus</i> LS1 – $6,0 \times 10^7$ <i>St. xylosus</i> – $1,0 \times 10^9$	
3b	3b.1	<i>Lact. sake</i> – $3,0 \times 10^8$ <i>St. carnosus</i> – $1,5 \times 10^9$	8 dias a 5 °C, 34 dias a -20 °C e mais 4 dias a 5 °C
	3b.2	<i>Lactobacillus</i> LC1. – $2,94 \times 10^{10}$ <i>St. xylosus</i> – $1,0 \times 10^9$	
	3b.4	<i>Lactobacillus</i> LS1 – $6,0 \times 10^7$ <i>St. xylosus</i> – $1,0 \times 10^9$	

### 3.8.1 Lingüiça controle

A massa obtida anteriormente foi embutida em tripa natural de suíno, posteriormente acondicionadas em embalagens de polietileno com aproximadamente 100 g por embalagem e armazenadas sob refrigeração.

### 3.8.2 Lingüiças adicionadas de culturas iniciadoras

Estas foram preparadas conforme as especificações mencionadas na tabela 2. Após homogeneização manual foram embutidas, embaladas e armazenadas da mesma forma que as do lote controle.

### 3.9 PLANO DE AMOSTRAGEM

No **ensaio 1** as análises microbiológicas, de determinação do pH foram realizadas no tempo zero e a cada 2 dias. No **ensaio 2** as análises microbiológicas, de determinação do pH foram realizadas no tempo zero e a cada 3 dias. No **ensaio 3** as análises microbiológicas, de determinação do pH foram realizadas no tempo zero e a cada 4 dias até o 8º dia (temperatura de 5 °C) e depois a cada 2 dias até o 12º dia (temperatura de 15 °C). O aumento da temperatura de armazenamento, no ensaio 3, busca ressaltar a influência das culturas bioprotetoras frente a uma “temperatura de abuso”. Esse tipo de estudo é particularmente importante em alimentos refrigerados, visto que frequentemente a temperatura de armazenamento é a barreira primária, não sendo raro a ocorrência de abuso de temperatura (SCOTT, V., 1989).

### 3.10 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas realizadas foram a contagem de bactérias lácticas, utilizando ágar MRS (SIQUEIRA, R. S., 1995) e contagem de coliformes totais utilizando ágar VRB segundo Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (BRASIL, 2003). Estas análises foram feitas em duplicata.

### 3.11 DETERMINAÇÃO DO pH

O pH foi determinado com medidor de pH DIGIMED® em um homogeneizado de 10 g da amostra com 100 mL de água deionizada (TERRA, e BRUM, 1988). Esta análise foi realizada em triplicata.

### 3.12 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial foi realizada por 10 avaliadores não treinados através de uma ficha de avaliação, utilizando uma escala hedônica de 1,0 a 5,0 para avaliar o produto cárneo assado (forno médio – alto por 1,0 hora) quanto a cor, aroma, sabor, textura e aceitabilidade. O valor 5,0 representava um produto de total aceitabilidade onde o provador gostou muitíssimo e 1,0 um produto inaceitável onde o provador desgostou muitíssimo (MORAES 1993). Na Figura 4 encontra-se o modelo da ficha utilizada na avaliação sensorial.

**FIGURA 4 – MODELO DE FICHA PARA ANÁLISE SENSORIAL****ANÁLISE SENSORIAL DE LINGÜIÇA FRESCAL (assada)**

Data:

Analista:

Atribuir nota de 1 a 5, para cada um dos atributos conforme a escala:

- (1) = Péssima
- (2) = Regular
- (3) = Indiferente
- (4) = Boa
- (5) = Muito boa

Amostras → Características ↓	197	293	526	864
COR				
ODOR				
SABOR				
TEXTURA				
ACEITABILIDADE				

**3.13 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS CULTURAS “STARTER” UTILIZADAS A DIFERENTES TEMPERATURAS**

Os cultivos iniciadores utilizados na elaboração das lingüiças toscana foram avaliados quanto a capacidade de crescimento a 5 °C, 15 °C e 35 °C. Para tanto, tubos de ensaio com 20 mL de caldo MRS foram inoculados com 0,02 mL dos cultivos de 48 horas (35 °C) das bactérias lácticas e com 0,01 mL dos cultivos de 24 horas (35 °C) dos estafilococos. Procedeu-se a incubação nas temperaturas já citadas acima e o crescimento foi acompanhado por meio da variação do valor de absorbância a 660 nm, em função do tempo. As medidas foram realizadas em duplicata.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 DO ISOLAMENTO E SELEÇÃO DAS CEPAS

Foram isoladas 85 cepas de bactérias lácticas sendo compostas por 37 cocos, 14 cocobacilos e 34 bacilos. Destas, 47 foram isoladas em meio APT, 31 em meio MRS e 8 em meio Elikor. Todas apresentaram reação positiva frente à coloração de Gram. Das 85, 76 resultaram catalase negativa. Destas, apenas 34 cepas foram capazes de crescer a 10 °C ou 15 °C (incubação por até 7 dias).

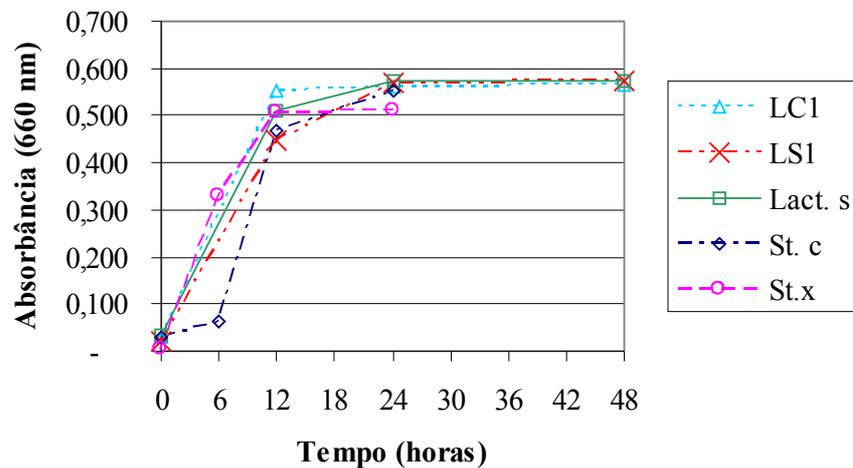
Quando avaliadas em relação ao pH após 24h de incubação a 35 °C, em meio MRS; 17 cepas das 34 citadas acima apresentaram pH entre 5,0 - 4,0; 10 apresentaram pH entre 6,0 - 5,0 e 7 apresentaram pH superior a 6,0. Devido ao ponto isoelétrico das proteínas da carne ser próximo ao pH 5,1 e tendo em vista que o produto ao qual as culturas “starters” seriam adicionadas pertence a categoria frescal, onde não deve ocorrer a coagulação das proteínas cárneas; não interessava a utilização de uma cultura fortemente acidificante. Das 10 cepas moderadamente acidificantes citadas acima, apenas LC1 manteve o pH dentro do intervalo escolhido; maior que 5,0 e menor que 5,5 após 48h de incubação a 35 °C, em caldo MRS (Tabela 4). Esta cepa apresentou morfologia bacilar, reação gram-positiva, não produziu gás em caldo MRS após 24 h de incubação e foi positiva para crescimento a 5 °C. Sendo assim, essa foi uma das cepas escolhidas para teste na formulação da lingüiça toscana. Outra cepa escolhida foi LS1, por saber-se previamente produtora de BLIS.

Os resultados do crescimento a várias temperaturas, das bactérias utilizadas na elaboração dos “starters”, encontram-se nas Figuras 5, 6 e 7.

**TABELA 4 – Características das 10 cepas moderadamente acidificantes.**

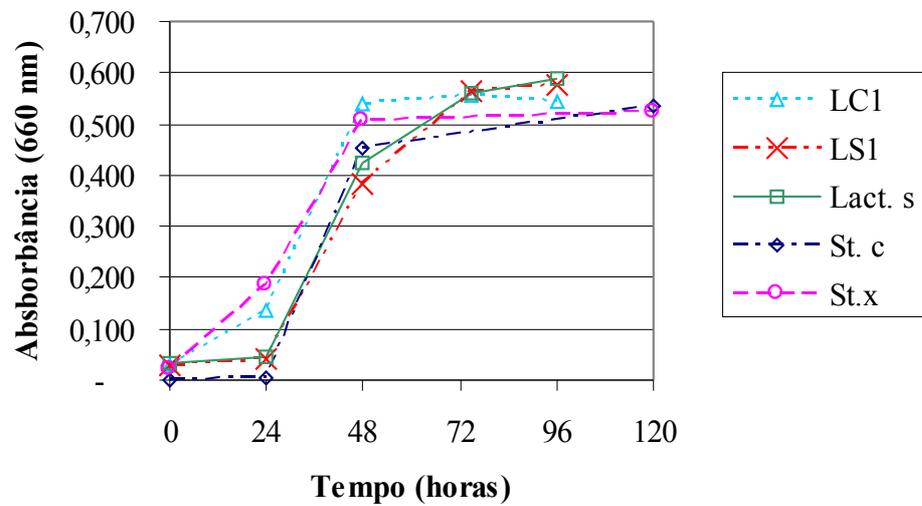
Cepa	pH (35 °C/24 h)	pH (35 °C/48 h)	CO <sub>2</sub>	Morfologia	Catalase	Crescimento a 45 °C	Crescimento a 15 °C	Crescimento a 10 °C
<b>LC1</b>	<b>5,53</b>	<b>5,11</b>	<b>Neg</b>	<b>Bacilo</b>	<b>Neg</b>	<b>-</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
LC2	5,16	4,86	Neg	cocobacilos	Neg	Positivo	Positivo	Positivo
LC3	5,22	4,96	Neg	cocobacilos	Neg	Positivo	Positivo	Positivo
LC4	5,02	4,9	Neg	cocobacilos	Neg	Negativo	-	Positivo
LC5	5,09	4,86	Neg	Cocos	Neg	Positivo	-	Positivo
LC6	5,13	4,85	Neg	Cocos	Neg	Positivo	-	Positivo
LC7	5,06	4,84	Neg	Cocos	Neg	Negativo	-	Positivo
LC8	5,05	4,81	Neg	Cocos	Neg	Positivo	-	Positivo
LC9	5,98	5,07	Neg	Bacilo	Neg	-	Positivo	Positivo
LC10	5,23	4,86	Neg	Bacilo	Neg	-	Positivo	Positivo

Negativo (Neg); não testada (-).

**FIGURA 5 – CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS INICIADORAS A 35 °C.**

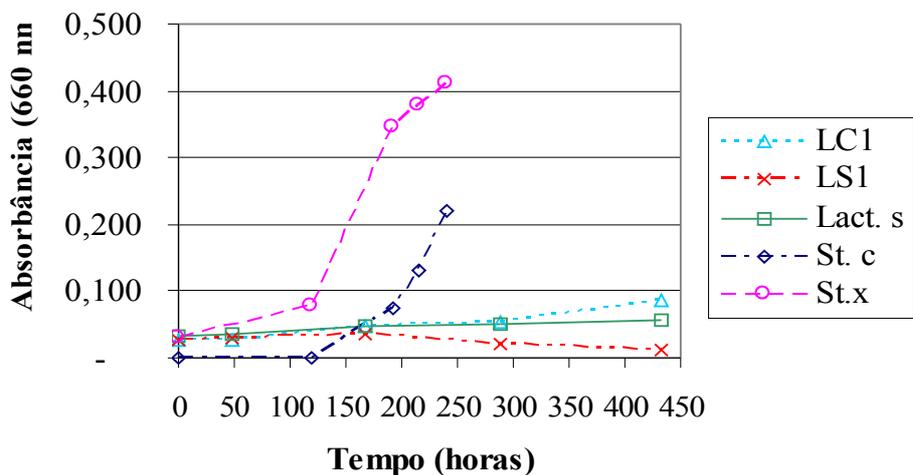
Leitura do crescimento bacteriano no comprimento de onda de 660 nm. *Lactobacillus sp.* (LC1); *Lactobacillus sp.* (LS1); *Lactobacillus sake* (Lact. s); *Staphylococcus carnosus* (St. c); *Staphylococcus xylosus* (St. x). Inóculo de 20 µL de um pré-cultivo de 24 h/35 °C.

**FIGURA 6 - CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS INICIADORAS A 15 °C.**



Leitura do crescimento bacteriano no comprimento de onda de 660 nm. *Lactobacillus sp.* (LC1); *Lactobacillus sp.* (LS1); *Lactobacillus sake* (Lact. s); *Staphylococcus carnosus* (St. c); *Staphylococcus xylosus* (St. x). Inóculo de 20 µL de um pré-cultivo de 24 h/35 °C.

**FIGURA 7 - CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS INICIADORAS A 5 °C.**



Leitura do crescimento bacteriano no comprimento de onda de 660 nm. *Lactobacillus sp.* (LC1); *Lactobacillus sp.* (LS1); *Lactobacillus sake* (Lact. s); *Staphylococcus carnosus* (St. c); *Staphylococcus xylosus* (St. x). Inóculo de 20 µL de um pré-cultivo de 24 h/35 °C.

## 4.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

### 4.2.1 Bactérias lácticas

Determinados microrganismos, ao se multiplicarem num alimento, produzem metabólitos que podem afetar a capacidade de sobrevivência e de multiplicação de outros presentes nesse alimento. Assim, por exemplo, as bactérias produtoras de ácido láctico podem alterar o pH do alimento de tal forma que o tornam ácido demais para o crescimento de muitos outros microrganismos. Os estreptococos e os lactobacilos produzem água oxigenada, que é inibidor para muitas bactérias. Muitos microrganismos são capazes de produzir determinadas substâncias com atividade bactericida, denominadas genericamente de bacteriocinas. O maior interesse na área de alimentos é pelas bactérias lácticas, capazes de produzir uma ou mais bacteriocinas (SCHILLINGER, 1997; DE MARTINS et al., 2002; ROSA et al., 2002; FRANCO e LANDGRAF, 2003).

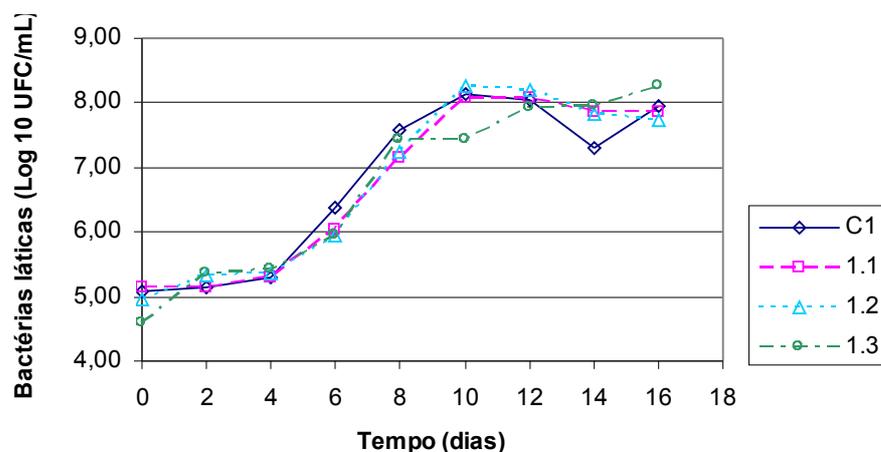
Conforme os dados obtidos, no ensaio 1, para a contagem de bactérias lácticas e apresentados na Figura 8, pôde-se perceber que o comportamento destas foi o mesmo tanto na lingüiça controle como nas adicionadas de cultivo iniciador. Constatou-se que as contagens iniciais dos tratamentos foram iguais a do controle. Estes dois fatos indicam que a quantidade de starter adicionada foi insuficiente, provavelmente devido a uma má homogeneização e que a fermentação foi conduzida pela microbiota natural da carne utilizada.

No ensaio 2 a quantidade de bactérias lácticas adicionadas como “starter” foi de  $10^5 - 10^6$  UFC/g, o que possibilitou uma diferenciação, embora sutil, no comportamento destas bactérias nas lingüiças controle e tratamentos. As lingüiças adicionadas de cultivo iniciador apresentaram um comportamento mais uniforme e alcançaram contagens maiores em menor tempo; sugerindo uma melhor adaptação das bactérias adicionadas. O tratamento 2.1 (*Lact. sake* e *St. carnosus*) apresentou, após o 12º dia de armazenamento, contagens superiores a todos os demais. Entretanto, os valores de contagem inicial permaneceram abaixo do esperado e acabaram se refletindo em baixos valores de contagem final (Figura 9).

No ensaio 3 foram utilizadas quantidades ainda maiores de inoculantes de  $10^6$  –  $10^8$  UFC/g, os quais foram adicionados sob a forma de liofilizados puros (sem diluente). Estes procedimentos possibilitaram contagens de bactérias lácticas mais elevadas. Neste ensaio, após os oito primeiros dias de armazenamento a 5 °C, parte das lingüiças foi submetida a “temperatura de abuso” (15 °C) e outra parte foi submetida ao processo de congelamento (-20 °C) /descongelamento (5 °C). Com o aumento da temperatura, as contagens de bactérias lácticas aumentaram; já após o descongelamento o valor das contagens diminuiu, ficando inferior ao valor inicial (Figuras 10 e 11).

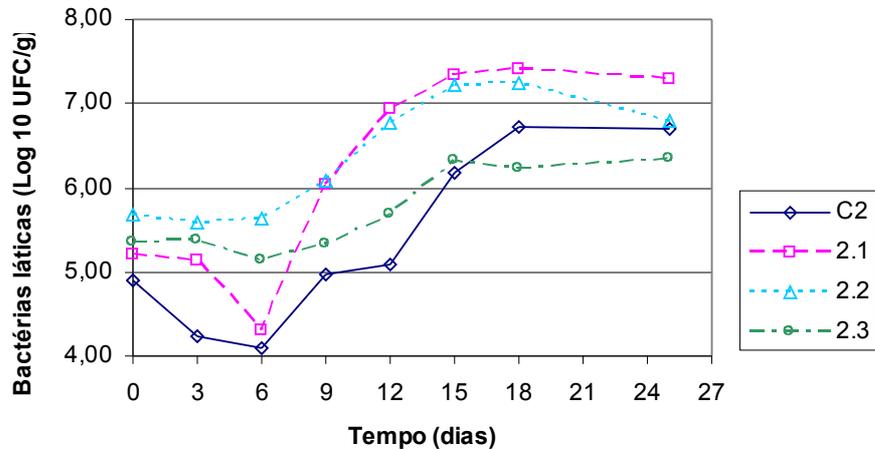
Milani et al. (2003) quando analisando lingüiças frescas de frango adicionadas de cultivos iniciadores e armazenadas a 8 °C, encontrou para lingüiça controle valores superiores a  $10^7$  UFC/g de bactérias lácticas após 6 dias de armazenamento, o que correspondeu a um aumento de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos. Para as lingüiças com starter, após 12 dias de armazenagem, as contagens foram próximas a  $10^9$  UFC/g. No presente trabalho, de uma forma geral o aumento das bactérias lácticas nas lingüiças controles se deu mais lentamente e contagens próximas a  $10^9$  UFC/g só foram obtidas no ensaio 3 quando a temperatura de armazenamento foi de 15 °C.

**FIGURA 8 -** CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM LINGÜIÇA DURANTE O ENSAIO 1.



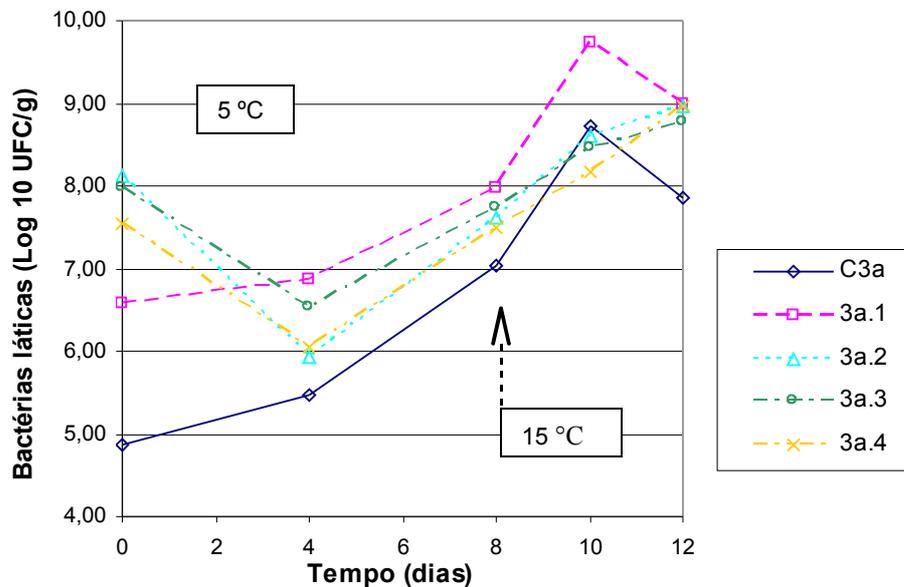
Evolução da contagem de bactérias lácticas em MRS. Lingüiça controle (C1); lingüiça adicionada de *Lact. sake* e *St. carnosus* (1.1); lingüiça adicionada de LC1 e *St. xylosus* (1.2); lingüiça adicionada de *Ped. pentosaceus* e *St. xylosus* (1.3). Armazenamento a 5 °C ± 1 °C por 16 dias.

**FIGURA 9 - CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM LINGÜIÇA DURANTE O ENSAIO 2.**



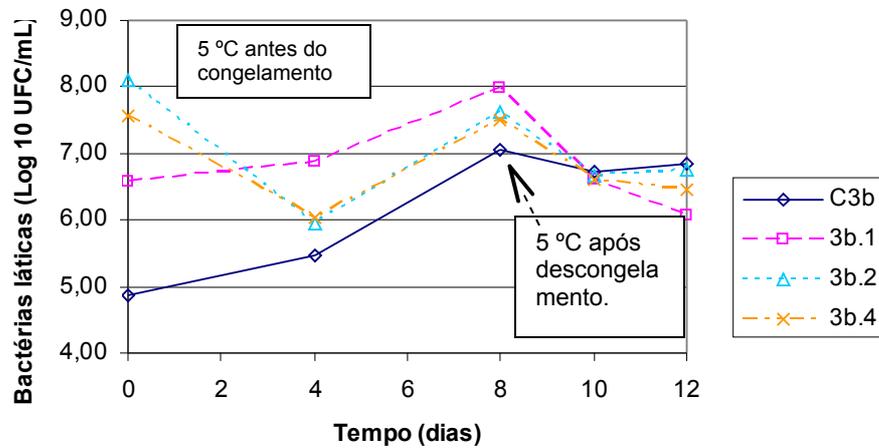
Evolução da contagem de bactérias lácticas em MRS. Lingüiça controle (**C2**); lingüiça adicionada de *Lact. sake* e *St. carnosus* (**2.1**); lingüiça adicionada de LC1 e *St. xylosus* (**2.2**); lingüiça adicionada de *Ped. pentosaceus* e *St. xylosus* (**2.3**). Armazenamento a  $5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 25 dias.

**FIGURA 10 - CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM LINGÜIÇA DURANTE O ENSAIO 3A.**



Evolução da contagem de bactérias lácticas em MRS. Lingüiça sem "starter" (**C3a**); lingüiça adicionada de *Lact. sake* e *St. carnosus* (**3a.1**); lingüiça adicionada de LC1 e *St. xylosus* (**3a.2**); lingüiça adicionada de *Ped. pentosaceus* e *St. xylosus* (**3a.3**) e lingüiça adicionada de LS1 e *St. xylosus* (**3a.4**). Lingüiça mantida a  $5\text{ °C}$  até o 8º dia e depois a  $15\text{ °C}$  até o 12º dia de análise. --> Ponto de mudança de temperatura.

**FIGURA 11 - CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM LINGÜIÇA DURANTE O ENSAIO 3B.**



Evolução da contagem de bactérias lácticas em MRS. Lingüiça sem "starter" (**C3b**); lingüiça adicionada de *Lact. sake* e *St. carnosus* (**3b.1**); lingüiça adicionada de LC1 e *St. xylosus* (**3b.2**) e lingüiça adicionada de LS1 e *St. xylosus* (**3b.4**). Lingüiça mantida a 5 °C até o 8º dia, depois congelada a -20 °C por 34 dias e, então, descongelada e mantida a temperatura de 5 °C por mais 4 dias. --> Retomada das análises microbiológicas, após descongelamento das lingüiças.

#### 4.2.2 Coliformes totais

O grupo dos coliformes totais é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a 35 – 37 °C, por 48 horas. São bacilos gram – negativos e não formadores de esporos. Fazem parte desse grupo predominantemente bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

Em alimentos frescos de origem animal, a ocorrência de números elevados de *Enterobacteriaceae* pode indicar manipulação sem cuidados de higiene e/ou armazenamento inadequado. A presença de quantidades consideráveis de células viáveis de *Enterobacteriaceae* em um alimento pode levar a uma infecção alimentar (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

Dentro do grupo das enterobactérias a espécie *Escherichia coli* é uma das mais relevantes; visto que diversas de suas linhagens são comprovadamente patogênicas para o homem.

**TABELA 5** – Dose infectante mínima para algumas linhagens de *E. coli*.

<b>Linhagem</b>	<b>Quantidade mínima infectante</b>
EPEC	106
ETEC	106
EIEC	10-100
EHEC	100

FONTE: ICD, 2006.

A linhagem EHEC vem se destacando, em âmbito mundial, como agente causal de infecção alimentar (diarréia hemorrágica) que pode evoluir para uma doença grave (síndrome urêmica hemolítica). Tendo uma dose infectante baixa, e sendo o gado reservatório natural, torna-se um patógeno importante em alimentos de origem animal.

Desta forma, a ação inibitória das BAL sobre os coliformes totais, pode-se refletir na diminuição do número de células viáveis das linhagens patogênicas de *E. coli* e outras enterobactérias que possam estar presentes no alimento. O que acabaria por colaborar com a inocuidade deste de uma forma mais “natural”, com reduzido uso de conservantes químicos.

Conforme a Figura 12, as contagens iniciais de coliformes totais se mostraram altas. Houve uma pequena redução nas contagens, ao longo do período de armazenamento. Porém, como se observou com as contagens de bactérias lácticas, não houve diferença nos valores de contagem final entre a lingüiça controle e as inoculadas. Esse fato veio reforçar a idéia de que esta fermentação foi conduzida pela microbiota natural da carne empregada no ensaio 1.

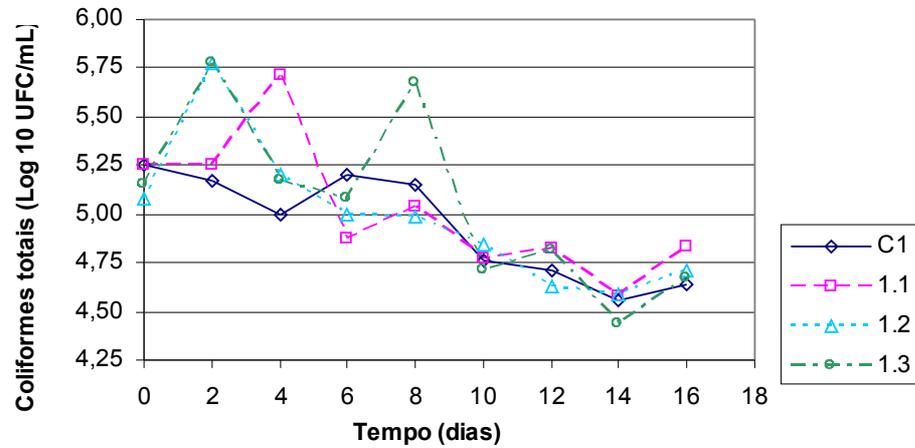
No ensaio 2 a contagem inicial dos coliformes totais foi muito próxima a das bactérias lácticas; contudo, ocorreu uma redução de 2 ciclos Log. durante o período de armazenamento. Embora os valores das contagens finais das lingüiças tratadas não tenham mostrado uma redução real em relação ao controle, pode-se dizer que neste ensaio começou-se a vislumbrar a ação inibitória das bactérias lácticas empregadas (Figura 13).

O ensaio 3 foi o que apresentou as menores contagens iniciais de coliformes totais, indicando uma melhor qualidade da carne utilizada. Ao longo dos oito dias de armazenamento a 5 °C diminui o número de células viáveis em todas as lingüiças igualmente. Mas após a mudança da temperatura de armazenamento para 15 °C

(Figura 14), simulando uma condição de abuso de temperatura que poderia ocorrer tanto nos estabelecimentos de revenda do produto como no domicílio dos consumidores, as contagens de coliformes totais aumentaram significativamente (2 – 3 ciclos Log. em 4 dias). Todavia, esse aumento foi menor, cerca de 1 ciclo Log., nas lingüiças inoculadas (2.2 e 2.3). Já, quando as lingüiças foram deixadas a 5 °C por oito dias e em seguida congeladas por um período de 34 dias e então descongeladas, mantendo-se a temperatura de 5 °C; houve uma redução nos dois primeiros dias que se reverteu nos dois seguintes, exceto para o tratamento 4. Frente ao congelamento/descongelamento, o tratamento 4 apresentou uma redução de mais de 1 ciclo logarítmico dos coliformes totais, em relação ao controle (Figura 15). Com base nestas informações poderíamos considerar que o efeito da BLIS produzida por LS1 foi determinante para a morte de um maior número de células após o processo de congelamento/descongelamento.

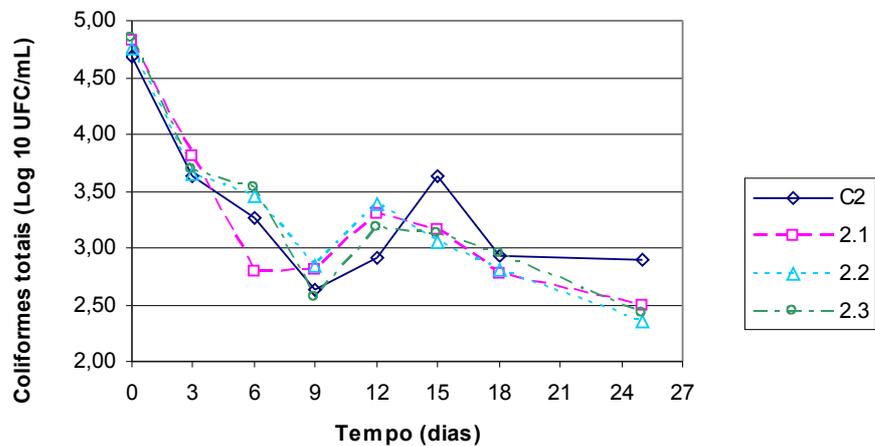
Terra et al. (1995) analisando semanalmente lingüiças suínas adicionadas de starter (armazenamento a 2 °C) conseguiu uma redução de 3 ciclos logarítmicos em relação ao controle, de  $1,4 \times 10^4$  UFC/g para  $< 1,0 \times 10^2$  UFC/g, após 4 semanas de armazenagem. Balduino et al. (1999) estudando a aplicabilidade de um cultivo misto de bactérias lácticas, aplicou nas lingüiças frescas de frango um inóculo de  $2,3 \times 10^{15}$  UFC/g de carne (armazenamento a 5 °C) e conseguiu uma redução de aproximadamente 1 ciclo Log no número inicial de coliformes totais após 2 dias e que se manteve até o 7º dia de análise.

**FIGURA 12 – CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS EM LINGÜIÇA, ENSAIO 1.**



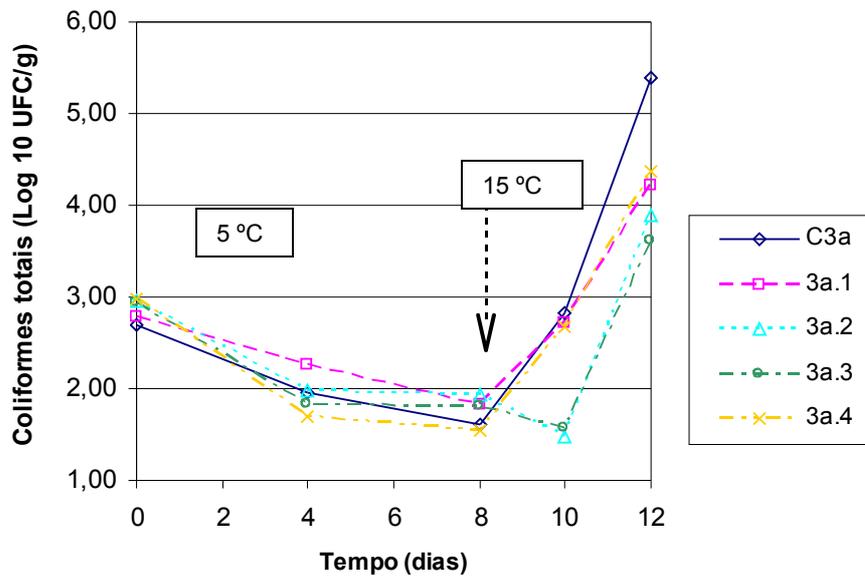
Evolução da contagem de coliformes totais em VRBA. Lingüiça sem “starter” (**C1**); lingüiça adicionada de *Lact. sake* e *St. carnosus* (**1.1**); lingüiça adicionada de LC1 e *St. xylosus* (**1.2**); lingüiça adicionada de *Ped. pentosaceus* e *St. xylosus* (**1.3**). Lingüiça mantida a 5 °C durante os 16 dias de análise.

**FIGURA 13 - CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS EM LINGÜIÇA, ENSAIO 2.**



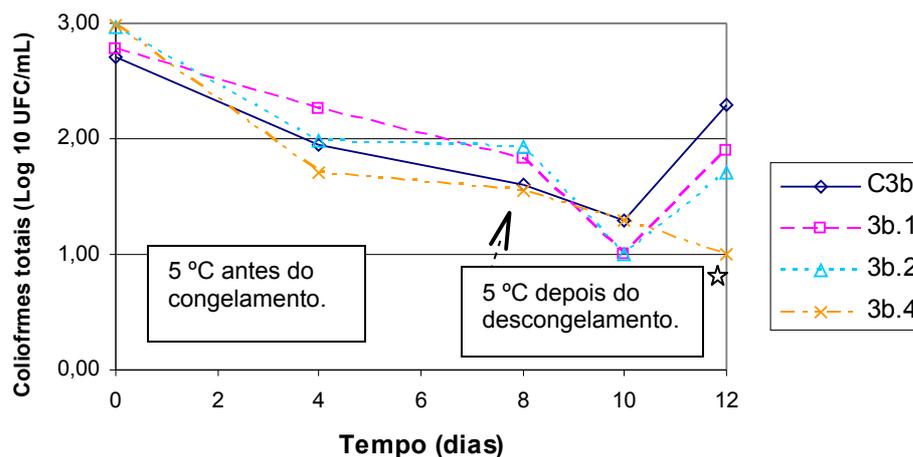
Evolução da contagem de coliformes totais em VRBA. Lingüiça sem “starter” (**C2**); lingüiça adicionada de *Lact. sake* e *St. carnosus* (**2.1**); lingüiça adicionada de LC1 e *St. xylosus* (**2.2**); lingüiça adicionada de *Ped. pentosaceus* e *St. xylosus* (**2.3**). Lingüiça mantida a 5 °C durante os 25 dias de análise.

**FIGURA 14 – CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS EM LINGÜIÇA, ENSAIO 3A.**



Evolução da contagem de coliformes totais em VRBA. Lingüiça sem “starter” (**C3a**); lingüiça adicionada de *Lact. sake* e *St. carnosus* (**3a.1**); lingüiça adicionada de LC1 e *St. xylosus* (**3a.2**); lingüiça adicionada de *Ped. pentosaceus* e *St. xylosus* (**3a.3**) e lingüiça adicionada de LS1 e *St. xylosus* (**3a.4**). Lingüiça mantida a 5 °C até 8º dia, quando a temperatura de armazenamento foi elevada para 15 °C. --> Ponto de mudança de temperatura.

**FIGURA 15 - CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS EM LINGÜIÇA, ENSAIO 3B.**



Evolução da contagem de coliformes totais em VRBA. Lingüiça sem “starter” (**C3b**); lingüiça adicionada de *Lact. sake* e *St. carnosus* (**3b.1**); lingüiça adicionada de LC1 e *St. xylosus* (**3b.2**) e lingüiça adicionada de LS1 e *St. xylosus* (**3b.4**). Lingüiça mantida a 5 °C até o 8º dia, congelada a -20 °C por 34 dias, descongelada e mantida a temperatura de 5 °C por mais 4 dias. --> Ponto de início do congelamento. ☆ Valor menor 10¹ UFC/mL

### 4.3 ANÁLISE DO pH

O pH exerce papel importante tanto na inibição de microrganismos indesejáveis como nas características finais do produto (cor, sabor, firmeza). O desenvolvimento de cor vermelha ocorre mais rapidamente e com maior intensidade quando o pH é baixo. Contudo, valores muito baixos de pH podem levar a liberação de água da carne e também influenciar negativamente as características organolépticas (FREY, 1983).

O ensaio 1 apresentou valor inicial de pH elevado, que não sofreu redução substancial durante o período de análise. Também não foi encontrada diferença entre as lingüiças com starter e a controle (sem starter). Creditaram-se os valores de pH observados, ao metabolismo de bactérias da microbiota contaminante da carne e que não apresentavam caráter predominantemente acidificante (Figura 16). Essa ínfima variação nos valores de pH se refletiu na contagem de coliformes totais e nas análises sensoriais (cor pálida), das lingüiças em geral.

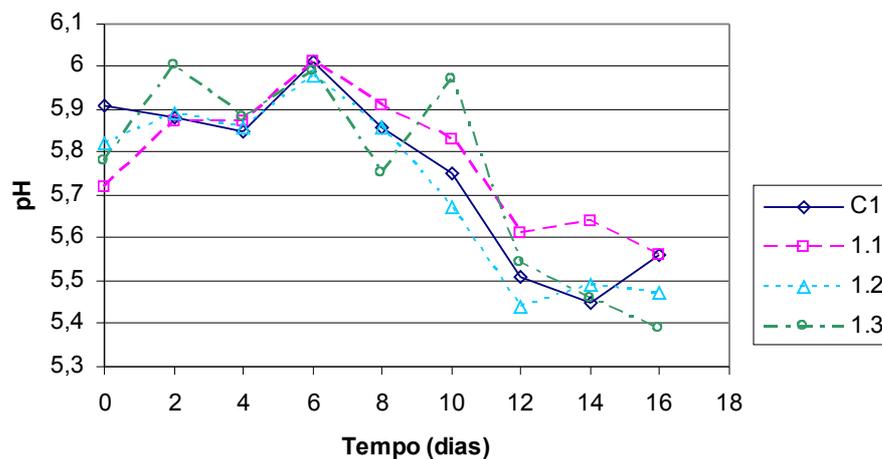
No ensaio 2 os valores iniciais de pH foram praticamente os mesmos dos encontrados no ensaio 1. Como foram adicionadas quantidades maiores de starter, o pH sofreu redução ligeiramente maior no ensaio 2, que no 1. As lingüiças com os tratamentos 2.1 e 2.2 apresentaram os menores valores de pH (Figura 17), o que contribuiu para as menores contagens de coliformes totais.

No ensaio 3, durante os primeiros 4 dias (a 5 °C) houve um aumento do pH, o que poderia ser resultado da ação de microrganismos proteolíticos. Nas lingüiças tratadas essa atividade poderia ser atribuída aos estafilococos adicionados como starter. Do 4º para o 8º dia de armazenamento a 5 °C ocorreu o decréscimo do pH; fato que coincidiu com o aumento das contagens de bactérias ácido lácticas. Quando a temperatura de armazenamento foi elevada para 15 °C pôde-se observar que o pH ainda sofreu uma redução, mas que no 12º dia (4º dia à temperatura de 15 °C) mostrou um aumento discreto. Os valores atingidos após 2 dias de armazenagem a 15 °C superaram o ponto isoelétrico das proteínas da carne; o que resultou no enrijecimento das lingüiças tratadas (Figura 18). Os valores de pH das amostras analisadas no ensaio 3b, após descongelamento a temperatura de 5 °C,

apresentaram um aumento considerável chegando a reverter completamente a acidificação anterior ao congelamento (Figura 19).

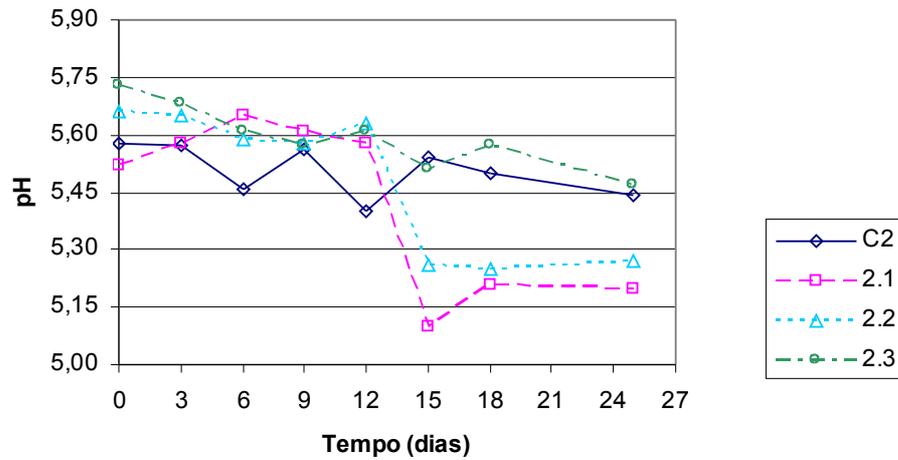
Milani et al. (2003) analisando a evolução do pH em lingüiças de frango inoculadas com cultura Elce BR100 (Texel<sup>®</sup>) e armazenadas a 8 °C, obteve pH inicial próximo de 6,0, o qual mostrou redução de 0,5 unidade de pH a partir do 9º dia de armazenamento e se manteve até o 21º dia. Valores semelhantes a esses foram obtidos neste trabalho com o ensaio 3. Terra et al. (1995) analisando semanalmente lingüiça fresca suína adicionada de cultura Elce (Texel<sup>®</sup>) e mantidas a 2 °C, observou pH inicial próximo de 6,0 e uma redução de aproximadamente 0,2 unidades de pH para a lingüiça com starter e de 0,3 para lingüiça controle; após 4 semanas de armazenamento. Estes valores foram menores do que a maioria daqueles encontrados nos ensaios realizados neste trabalho.

**FIGURA 16** – VALORES DE pH DURANTE O ENSAIO 1.



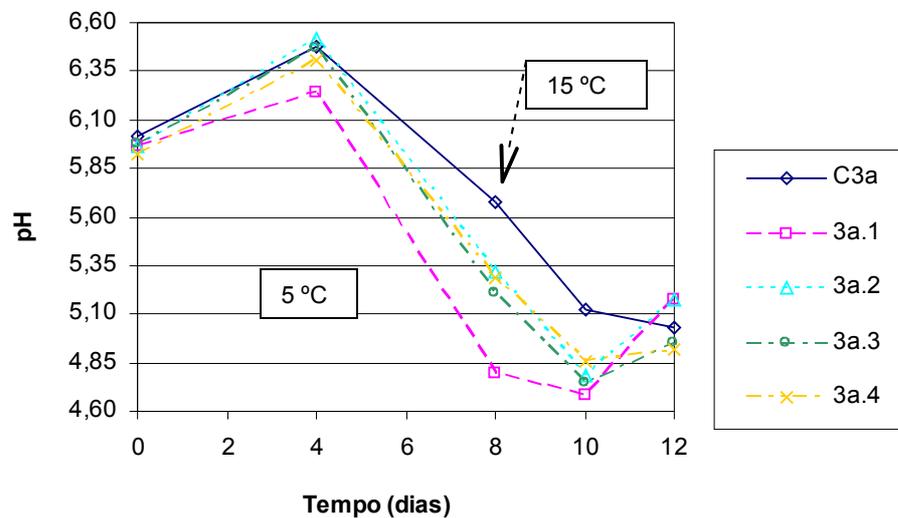
Lingüiça controle (**C1**); lingüiça adicionada de *Lact. sake* e *St. carnosus* (**1.1**); lingüiça adicionada de LC1 e *St. xylosus* (**1.2**); lingüiça adicionada de *Ped. pentosaceus* e *St. xylosus* (**1.3**). Armazenamento a 5 °C ± 1 °C, por 16 dias.

**FIGURA 17 – VALORES DE pH DURANTEO ENSAIO 2.**



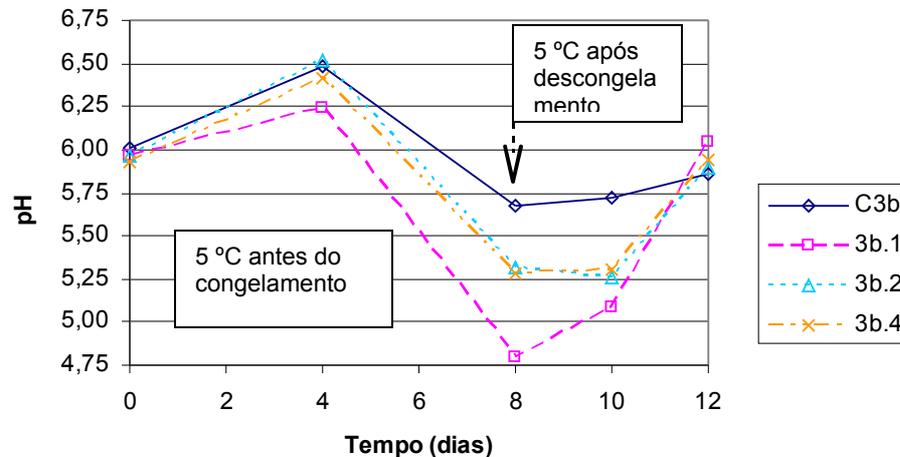
Lingüiça controle (**C2**); lingüiça adicionada de *Lact. sake* e *St. carnosus* (**2.1**); lingüiça adicionada de LC1 e *St. xylosus* (**2.2**); lingüiça adicionada de *Ped. pentosaceus* e *St. xylosus* (**2.3**). Armazenamento a  $5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , por 25 dias.

**FIGURA 18 – VALORES DE pH DURANTE O ENSAIO 3A.**



Lingüiça sem “starter” (**C3a**); lingüiça adicionada de *Lact. sake* e *St. carnosus* (**3a.1**); lingüiça adicionada de LC1 e *St. xylosus* (**3a.2**); lingüiça adicionada de *Ped. pentosaceus* e *St. xylosus* (**3a.3**) e lingüiça adicionada de LS1 e *St. xylosus* (**3a.4**). Lingüiça mantida a  $5\text{ °C}$  até 8º dia, quando a temperatura de armazenamento foi elevada para  $15\text{ °C}$ . --> Ponto de aumento da temperatura.

**FIGURA 19 – VALORES DE pH DURANTE O ENSAIO 3B.**



Lingüiça sem “starter” (**C3b**); lingüiça adicionada de *Lact. sake* e *St. carnosus* (**3b.1**); lingüiça adicionada de LC1 e *St. xylosus* (**3b.2**) e lingüiça adicionada de LS1 e *St. xylosus* (**3b.4**). Lingüiça mantida a 5 °C até o 8º dia, congelada a -20 °C por 34 dias, descongelada e mantida a temperatura de 5 °C por mais 4 dias. --> Retomada das análises após descongelamento das lingüiças.

#### 4.4 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial dos dois primeiros ensaios foi realizada no Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos na UFSM e a do terceiro ensaio foi realizada no Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR. As análises foram realizadas por um total de 10 julgadores não treinados.

No ensaio 1, o tratamento 1.2 foi o que apresentou as maiores médias gerais dentro dos quesitos avaliados. O tratamento 1.1 teve a menor média no quesito cor (Figura 20). Os julgadores deram preferência para as lingüiças adicionadas de cultivo iniciador em detrimento da lingüiça controle (TABELA 6).

No ensaio 2, os avaliadores consideraram os tratamentos 2.2 e 2.3 tão bons quanto o controle (todos com média geral de 3,4). O tratamento 2.1 foi considerado o de pior coloração nesse ensaio (Figura 21). Não houve uma constância na preferência dos julgadores durante as análises sensoriais do ensaio 2 (TABELA 7).

De forma geral as médias das análises sensoriais de terceira semana foram as menores. Esse fato já era esperado tendo em vista o processo natural de deterioração do alimento.

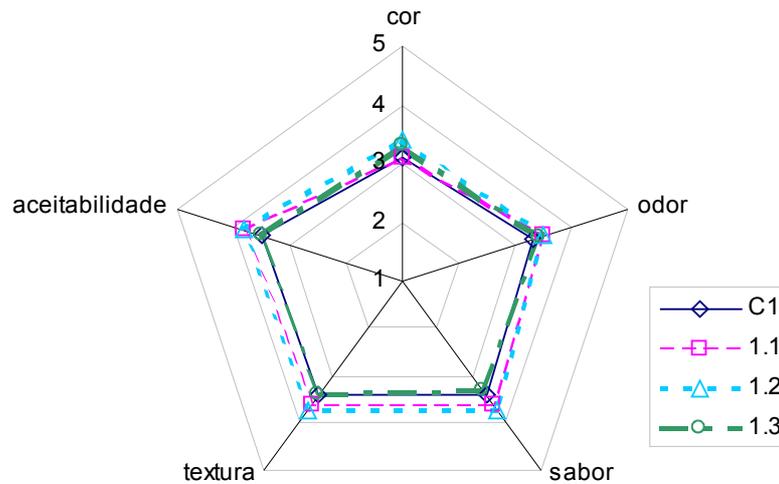
A diminuição na quantidade de microrganismos, tais como aqueles representados pelos coliformes totais, favorece a qualidade sensorial dos alimentos.

No ensaio 3, a melhor qualidade da carne utilizada se refletiu nas notas atribuídas pelos avaliadores; sendo que as lingüiças controle apresentaram a maior média geral (4,0) e dentro de cada quesito analisado. Dentre as lingüiças adicionadas de “starter”, o tratamento 3b.1 foi o preferido nesse ensaio (Figura 22). Nesse tratamento ocorreu uma queda mais rápida nos valores de pH, o que se refletiu no desenvolvimento de uma coloração mais favorável em menos tempo. Para o paladar da maioria dos julgadores, os tratamentos 3b.2 e 3b.3 apresentaram sabor ácido marcante; o que talvez possa ser justificado pelo tipo de BAL envolvida nessas fermentações (mais produtoras de ácidos).

Frente a matérias-primas de baixa ou duvidosa qualidade, a ação dos cultivos iniciadores é mais sentida e valorizada.

Terra et al. (1995), ao utilizarem a cultura Elce (Textel®) em lingüiças de carne suína, obtiveram melhora considerável em seus atributos sensoriais como cor, aroma e sabor.

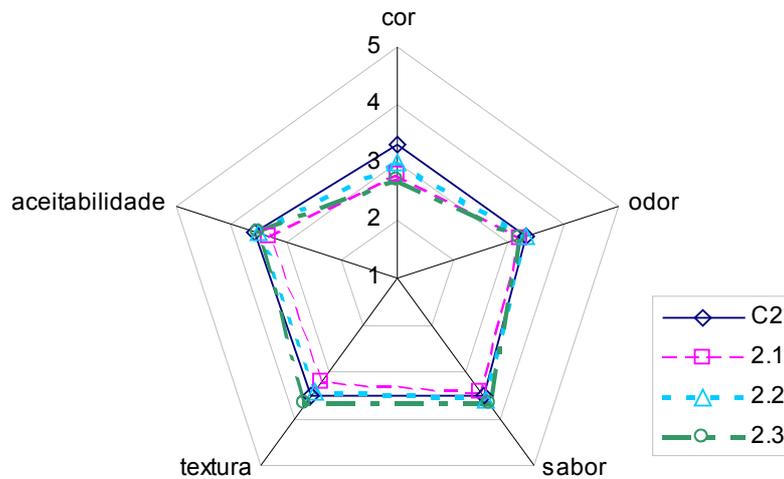
Milani et al. (2003) estudando lingüiças de frango, encontraram que as alterações sensoriais promovidas pela adição de “starter” foram mais visíveis nas amostras cruas e que após assadas diferenças significativas não foram mais observadas.

**FIGURA 20 – PERFIL DE CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS NO ENSAIO 1.**

Média das notas atribuídas às lingüiças nas análises sensoriais realizadas semanalmente, durante 3 semanas, no ensaio 1. Lingüiça controle (C1); lingüiça adicionada de *Lact. sake* e *St. carnosus* (1.1); lingüiça adicionada de LC1 e *St. xylosus* (1.2); lingüiça adicionada de *Ped. pentosaceus* e *St. xylosus* (1.3).

**TABELA 6 – Médias das notas atribuídas nas avaliações sensoriais das lingüiças do ensaio1.**

Análise/Tempo Tratamentos	1 <sup>a</sup> semana	2 <sup>a</sup> semana	3 <sup>a</sup> semana
C1	3,37	3,38	3,12
1.1	3,44	3,67	3,38
1.2	4,03	3,68	3,3
1.3	3,83	3,49	2,86

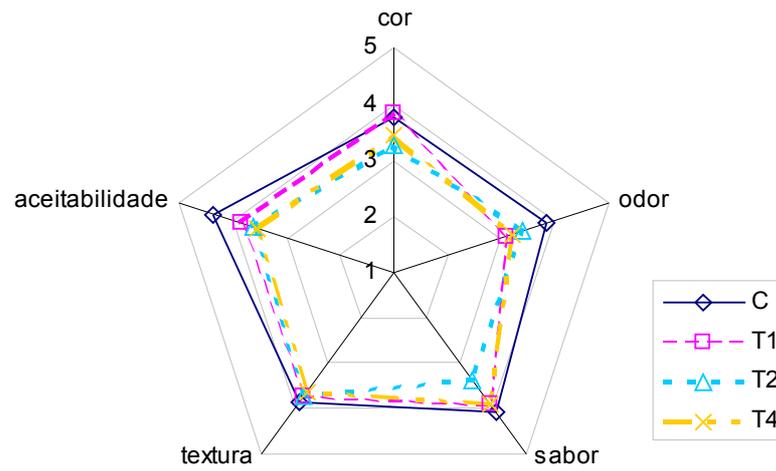
**FIGURA 21 – PERFIL DE CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS NO ENSAIO 2.**

Média das notas atribuídas às lingüiças nas análises sensoriais realizadas semanalmente, durante 3 semanas, no ensaio 2. Lingüiça controle (**C2**); lingüiça adicionada de *Lact. sake* e *St. carnosus* (**2.1**); lingüiça adicionada de LC1 e *St. xylosus* (**2.2**); lingüiça adicionada de *Ped. pentosaceus* e *St. xylosus* (**2.3**).

**TABELA 7 – Médias das notas atribuídas nas avaliações sensoriais das lingüiças do ensaio 2.**

Análise/Tempo	1 <sup>a</sup> semana	2 <sup>a</sup> semana	3 <sup>a</sup> semana
<b>C2</b>	3,32	3,84	3,16
<b>2.1</b>	3,06	3,44	3,1
<b>2.2</b>	3,41	3,34	3,36
<b>2.3</b>	3,44	3,6	3,1

**FIGURA 22 - PERFIL DE CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS NO ENSAIO 3B.**



Média das notas atribuídas às lingüiças na análise sensorial realizada após congelamento/descongelamento, no ensaio 3b. Lingüiça controle (**C3b**); lingüiça adicionada de *Lact. sake* e *St. carnosus* (**3b.1**); lingüiça adicionada de LC1 e *St. xylosus* (**3b.2**); lingüiça adicionada de LS1 e *St. xylosus* (**3b.4**).

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- ✓ Em condição de abuso de temperatura as bactérias ácido lácticas conseguiram frear o crescimento de bactérias indesejáveis.
- ✓ A qualidade da matéria-prima teve influência preponderante sobre a qualidade do produto final adicionado e não adicionado de cultivo iniciador, quando a temperatura de armazenamento foi de 5 °C.
- ✓ O congelamento/descongelamento, em presença de bactéria láctica produtora de BLIS, mostrou um considerável efeito inibitório sobre os coliformes totais.
- ✓ O tratamento 3b.1 e o 3b.4 resultaram muito semelhantes sensorialmente ao controle, mas 3b.4 produziu maior inibição dos coliformes após congelamento/descongelamento.
- ✓ As quantidades de bactérias lácticas adicionadas nos ensaios 3a e 3b mostraram-se excessivamente acidificantes frente a uma contaminação inicial de  $10^3$  UFC/g em coliformes totais.
- ✓ À temperatura de 5 °C foi difícil perceber a ação inibitória dos “starters”, contra os microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes.
- ✓ A atividade dos cultivos iniciadores adicionados permitiu melhorias nas qualidades organolépticas, principalmente quando a carga inicial de coliformes totais foi alta.
- ✓ Os resultados das análises sensoriais mostraram a existência de consumidores em potencial para o produto: lingüiça “toscana” adicionada de “starter”.

Portanto o presente trabalho atingiu seu objetivo geral (específicos) que foi de desenvolver de um cultivo iniciador misto para emprego em lingüiças frescas, visando à obtenção de um produto final de alta qualidade microbiológica e organoléptica.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ❖ Observar o comportamento dos estafilococos coagulase negativa (adicionados como “starters”) e coagulase positiva (contaminantes);
- ❖ Realizar contagem de coliformes termotolerantes (45 °C) de lingüiças inoculadas e não inoculadas;
- ❖ Realizar caracterização molecular da cepa LC1 isolada nesse trabalho, bem como estudar sua sensibilidade aos sais de cura e ao NaCl;
- ❖ Averiguar temperatura de armazenamento e prazo de validade limite para lingüiça “tipo toscana” inoculada;
- ❖ Isolar bactérias lácticas com boa produção de ácido láctico e/ou BLIS à temperatura de armazenamento adequada;
- ❖ Estimar o custo do produto com adição do “starter”;
- ❖ Avaliar a participação das enzimas da carne na fermentação da lingüiça “tipo toscana” não defumada.

## REFERÊNCIAS

BALDUINO, R.; DE OLIVEIRA, A. S.; HAULY, M. C. O. Cultura láctica mista com potencial de aplicação como cultura iniciadora em produtos cárneos. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.19, n.3, p.356-362, 1999.

BARBUTI, S.; PAROLARI, G. Causes and prevention of dry-cured ham defects. **Symposium International del Jamón Curado, II**, 2000, **Anais**, Barcelona, Espanha, p. 19-25.

BARBUTI, S.; PAROLARI, G. Validation of manufacturing process to control pathogenic bacteria in typical dry fermented products. **Meat Science**, v. 62, p. 323-329, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de Agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 131-149, 1999.

COLLINS, M. D., S. WALLBANKS, D. J. LANE, J. SHAH, R. NIETUPSKI, J. SMIDA, M. DORSCH, AND E. STACKEBRANDT. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 41, p. 240-246, 1991.

CORNEJO, I.; CARRASCOSA, A. V.; MARIN, M. E.; AVENDAÑO, M. C. Influencia del salado, el lavado y el reposo sobre la flora superficial del jamón curado. **Carnica 2000**. 2ª etapa. n. 58, p. 34-35, 1988.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, p. 130-135, 1960.

DE MARTINS, 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**, v. 18 (2&3), p. 191-208, 2002.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature**. Disponível em <<http://www.bacterio.cict.fr/staphylococcus>> Acesso em 30/01/2006.

FORREST, J. C. et al. **Fundamentos de ciência de la carne**. Zaragoza: Acriba, 1979. 364 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. 2 ed. 184p.

FREY, W. **Fabricacion fiable de embutidos**. Editorial Acriba, S. A., Zaragoza, España, 1985.194p.

GALEAZZI, U. A.; GARCIA, F. T.; BLISKA, F. M. M.; ARIMA, H. K. Caracterização do consumo de carnes no Brasil. **Revista Nacional da Carne**, n. 310, dez., 2002.

GEISEN, R.; FRIEDRICH, L. K.; KRÖCKEL, L. Starter and protective cultures for meat and meat products. **Fleischwirtschaft**, v. 72, p. 894-898, 1992.

GUAHYBA, A. S. Material Didático para o Curso Técnico em Alimentos do Centro de Educação Profissional Martin Luther. Disponível em <[http://www.guayba.vet.br/luther/tecnologia\\_carnes](http://www.guayba.vet.br/luther/tecnologia_carnes)> Acesso em 19/04/2004.

GRIS, E. F. Disponível em: <[http://www.dipemar.com.br/carne/308/materia\\_arttec\\_carne.htm](http://www.dipemar.com.br/carne/308/materia_arttec_carne.htm)> Acesso em: 01 mar. 2004.

HUGAS, M.; MONFORT, J. .M. Bacterial starter cultures for meat fermentation. **Food Chemistry**, v. 59, p. 547-554, 1997.

ICD **Food Safety – Infectious foodborne pathogens**. Disponível em <[www.icd-online.org](http://www.icd-online.org)> Acesso em 2/02/2006.

ICMSF. **ECOLOGIA MICROBIANA DE LOS ALIMENTOS 1 Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acriba, 1980. v. 1, 332 p.

LARPENT, J. P. Productos cárnicos fermentados. In: BOURGEOIS, C. M.; LARPENT, J. P. **Microbiología alimentaria**. Zaragoza: Acriba, 1995. v. 2, p. 271-279.

LÜCKE, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**. v. 56, p. 105-115. 2000.

LÜCKE, F. K. Fermented meat products. **Food Research International**. v. 27, p. 299-307. 1994.

MANUAL DIFCO. Medios de cultivo deshidratados y reactivos para microbiología. Madrid: Gráficas Letra, 1984. 1166 p.

MEDINA, P. J. G. Disponível em <<http://www.cuci.udg.mx/rector/XXanivBiologia.ppt>> Acesso em: 01 mar. 2004.

MILANI, L. I. G.; FRIES, L. L. M.; PAZ, P. B.; BELLÊ, M.; TERRA, N. N. Bioproteção de lingüiça de frango. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.23, n.2, p.161-166, 2003.

MORAES, M. A C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1993. 93 p.

MOSSEL, D. A. A.; GARCIA, B. M. **Microbiología de los Alimentos – Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acriba, 1993. 375 p.

MURO, M. A.; LUCHI, M. R. **Preservação de microrganismos**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1989. 65 p.

ODA, S. H. I.; BRIDI, A. M.; SOARES, A. L.; GUARNIERE, P. D.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. Carnes PSE (Pale, Soft, Exudative) e DFD (Dark, Firm, Dry) em aves e suínos – diferenças e semelhanças. **Revista Nacional da Carne**, n. 325, Março, 2004.

PAPAMANOLI, E. et al. Characterization of *Micrococcaceae* isolated from dry fermented sausage. **Food Microbiology**, v. 19, p. 441-449, 2002.

PEREIRA, C. F.; AMARAL, A. P. A aplicação da análise sensorial na indústria de alimentos. **Revista Alimentos e Tecnologia**, n. 72, Ed. Isabella Marcondes Piason, 1997.

ROÇA, R. O. **Embutidos**. Disponível em <<http://www.dag.uem.br>> Acesso em 11/01/2006.

ROPPA, L. Disponível em <<http://www.cejota.hypermart.net/suinucul.html>> Acesso em 01/03/2004.

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 isolated *Lactobacillus sake* 2a. **Journal of Food Safety**, n. 22, p. 39-54, 2002.

SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F. K. Identification of lactobacilli from meat and meat products. **Food Microbiology**, n. 4, p. 199-208, 1987.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 158-164, 1996.

SCHUCHAT, A., B. SWAMINATHAN, AND BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical. Microbiology. Review.**, v. 4, p.169-183, 1991.

SCOLARI, D. D.; TALAMINI, D. J. D. 2º Conferência internacional virtual sobre qualidade de carne suína. Disponível em <<http://www.cnpsa.embrapa.br>> Acesso em 01 mar. 2004.

SCOTT, V. Interaction of Factors to Control Microbial Spoilage of Refrigerated Foods. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 6, p. 431-435, 1989.

SILLA, M. H. Bacterias ácido lácticas: Iniciadores fermentativos en productos cárnicos. **Revista Agroquímica de Tecnología de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 1-14, 1989.

SINELL, H. J. **Introducción a la Higiene de los Alimentos**. Zaragoza: Editorial Acriba, 1981. 167p.

SIQUEIRA, S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. 159 p.

TERRA, N. N., **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo, RS: Editora Unisinos, 2003. 53 p.

TERRA, N. N.; ABREU, R.; VALENTE, C. R.; TERRA, L. M. A cultura *starter* na fabricação da lingüiça. **Revista Nacional da Carne**, v.225, p.73-77, 1995.

TERRA, N. N.; BRUM, M. A. R. **Carnes e seus derivados**. São Paulo: Editora Nobel, 1988. 121p.

TORRES, R. A nova ordem do setor cárneo. **Revista Nacional da Carne**, n. 339, maio, 2005.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1998. 2ª. ed. 386p.

TYÖPPÖNEN, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 2598, in press, 2003.

Universidad de Buenos Aires (UBA) - **Facultad de Farmacia y Bioquímica**. Disponível em: <[http://www.ffyb.uba.ar/Micro\\_Ind/biotec\\_alim/PRODUCCION%20DE%20BIOMASA.ppt](http://www.ffyb.uba.ar/Micro_Ind/biotec_alim/PRODUCCION%20DE%20BIOMASA.ppt)> Acesso em: 01 mar. 2004.

VAZ, S. K. **ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINGUIÇA FRESCA “TIPO TOSCANA” DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)**. Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de alimentos) – Setor de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná.

WARD, O. P. **Biotechnologia de la fermentacion**. Zaragoza: Editorial Acriba, 1991. 274p.

WOOD, B. J. B.; and HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**, v. 2. London: Blackie Academic and Professional, 1995. 397p.

## ANEXO A – Composição química dos meios microbiológicos utilizados

### Meio APT

Extrato de levedura.....	7,5 g/L
Triptona.....	12,5 g/L
Dextrose.....	10,0 g/L
Citrato de sódio.....	5,0 g/L
Tiamina.....	0,001 g/L
Cloreto de sódio.....	5,0 g/L
Fosfato dipotássico.....	5,0 g/L
Cloreto de manganês.....	0,14 g/L
Sulfato de magnésio.....	0,8 g/L
Sulfato ferroso.....	0,04 g/L
Tween 80.....	0,2 g/L

### Meio Eliker

Triptona.....	20,0 g/L
Extrato de levedura.....	5,0 g/L
Gelatina.....	2,5 g/L
Dextrose.....	5,0 g/L
Lactose.....	5,0 g/L
Sacarose.....	5,0 g/L
Cloreto de sódio.....	4,0 g/L
Acetato de sódio.....	1,5 g/L
Ácido ascórbico.....	0,5 g/L

### Meio MRS

Peptona bacteriológica.....	10,0 g/L
Extrato de carne.....	10,0 g/L
Extrato de levedura.....	5,0 g/L
Dextrose.....	20,0 g/L
Acetato de sódio.....	5,0 g/L
Citrato de amônio.....	2,0 g/L
Sulfato de magnésio.....	0,1 g/L
Sulfato de manganês.....	0,05 g/L
Fosfato dipotássico.....	2,0 g/L
Tween 80.....	1,0 g/L

**Meio sal-manitol**

Peptona de carne.....	10,0 g/L
Extrato de carne.....	1,0 g/L
D-manitol.....	10,0 g/L
Cloreto de sódio.....	75,0 g/L
Vermelho de fenol.....	0,025 g/L