

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DETERMINAÇÃO DA MICROBIOTA DA CARNE OVINA TRATADA COM
ÁCIDO ACÉTICO, EMBALADA À VÁCUO E MATURADA.**

ELAYNE CARDOSO DE VASCONCELOS

ORIENTADOR: Jorge Fernando Fuentes Zapata

Fortaleza, 2000

Esta dissertação foi submetida a exame como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Tecnologia de Alimentos, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Elayne Cardoso de Vasconcelos

Dissertação aprovada em 30/11/2000

Prof. Jorge Fernando Fuentes Zapata - PhD

Prof. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo

Pesq. Ms. Maria de Fátima Borges

*Tento lutar, tento sobreviver, tento amar
Luto, luto, luto e luto
Olho e não acho
Choro e não me consolo
Falo e não me ouço
Olho e não me vejo
Grito e me abafa
Desfruto de que?
De uma vida em vão!
De um desafio desastroso!
De um fracasso como homem!
De ser lúcido e corajoso; E de poder lutar.
Porque, quem luta, vive
E quem vive é Deus.*

Roberto Dias.

Aos meus pais,
Tiago Camelo de Vasconcelos e Luiza Cardoso Ribeiro de Vasconcelos
pelo amor e incentivo,
que tornam possível a realização de todos meus sonhos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela constância de sua presença, em todos os momentos de minha vida, e pela força concedida para vencer os obstáculos.

Ao professor **Jorge Fernando Fuentes Zapata**, pela dedicada orientação, profissionalismo e sobretudo por sua amizade.

À professora **Evânia Altina Texeira Figueredo**, co-orientadora, pela valiosa orientação e amizade.

À pesquisadora **Maria de Fátima Borges**, pelas sugestões e participação na banca examinadora.

Ao **Departamento de Tecnologia de Alimentos**, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de cursar o mestrado.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao **CNPQ** (Projeto “Avaliação do aproveitamento das carnes caprina e ovina para a obtenção de produtos e subprodutos de qualidade”) pelo apoio financeiro.

Ao **laboratório de Estatística**, em especial a professora Ana Maria Souza, pela orientação na análise estatística.

A bibliotecaria **Rosane Maria Costa** e a assistente administrativa **Luzia de Lima**, pela dedicação e empenho com que sempre nos atenderam, bem como pela conferência da referência bibliográfica.

Às bolsistas **Aurineide Castelo Branco e Angela Borges**, pela amizade, pelo companheirismo, compreensão e dedicação na realização do experimento.

Aos funcionários **Maria Valzenelha Moura, José Maria Pereira e Neuma Maria Pinheiro** do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, pela grandiosa colaboração.

Ao funcionário **Paulo Mendes de Alencar**, pela sua incondicional amizade.

Aos **funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos**, em especial a João Gilalberto Cajazeira e Luis Bitú, pela atenção durante a realização do mestrado e pela amizade.

As amigas do grupo de pesquisa de carne, pescado e ovos, em especial, **Silvia Mafra, Lorraine Gonçalves, Larissa Seabra, Eroteíde Pinho, Cintia Monteiro e Luciana Fujiwara**, pela convivência harmoniosa e agradável.

As amigas **Silvia Menezes e Gleucia Carvalho**, que me acompanharam durante parte desta caminhada, dividindo todos os momentos e dando força naqueles momentos mais árduos.

As amigas **Simone Pereira Barbosa e Waldívia Dias Oliveira**, pelo incentivo e amizade sincera em todos os momentos.

Aos professores **Manoel Henrique e Maria Marlúcia Pereira**, pela amizade, incentivo, apoio na realização do mestrado

Ao colega **Luis Machado**, pela ajuda na realização do experimentos, pela compreensão e amizade.

Aos **colegas das turmas de 1998, 1999 e 2000**, pelo convívio alegre e união durante este período.

À **todos os meus familiares**, em especial aos meus tios, Raimundo Camelo de Vasconcelos e Odubia Farias Vasconcelos, pela acolhida familiar com que me receberam no seu lar.

Aos meus irmãos **Elsia Cardoso de Vasconcelos e Elmo Cardoso de Vasconcelos** pelo carinho e apoio.

A **todos** que de alguma forma contribuíram para a realização do presente trabalho, sinceramente agradeço.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS DO ANEXO	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Conversão bioquímica do músculo em carne	19
2.2. Maturação da carne	19
2.3. Microbiologia da carne	23
2.3.1. Origem da contaminação microbilógica	23
2.3.2. Microrganismos contaminantes	23
2.3.3. Fatores que afetam a atividade microbiana na carne	24
2.3.3.1. Fatores intrínsecos	24
2.3.3.2. Fatores extrínsecos	27
2.4. Perigo microbiológico da carne	30
2.5. A utilização de ácidos orgânicos	33
2.6. Temperatura de armazenamento	37
2.7. Embalagem a vácuo	39
3. OBJETIVOS	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1. Descrição do experimento	44
4.2. Amostragem das carcaças	45
4.3. Amostragem da carne de paleta	45
4.4. Análises microbiológicas	46
4.4.1. Contagem de bactérias mesófilas	46
4.4.2. Contagem de bactérias psicrófilas	46
4.4.3. Contagem de bolores e leveduras	46
4.4.4. Pesquisa de coliformes totais	47
4.4.5. Pesquisa de coliformes fecais	47
4.4.6. Pesquisa de <i>Salmonella</i>	47

4.4.7. Contagem de clostrídios sulfito- redutores	48
4.5. Medição do pH nas amostras de carne	49
4.6. Análise estatística	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1. Caracterização microbiológica da carcaça ovina	51
5.2. Evolução da microbiota da carne ovina durante o armazenamento	54
6. CONCLUSÕES	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXO	88

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
1	Médias do número de bactérias (logUFC/cm ²), em diferentes locais da superfície da carcaça ovina, com 12 horas de abate.	52
2	Médias da contagem padrão em placa de bactérias mesófilas aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (logUFC/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	55
3	Médias da contagem padrão em placa de bactérias psicrófilas aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (logUFC/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	59
4	Médias da contagem padrão em placas de bolores e leveduras (logUFC/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1%, e armazenada a 1°C, por 48 dias.	62
5	Médias dos valores da pesquisa de coliformes totais (logNMP/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	65
6	Médias Dos valores da pesquisa de coliformes fecais (logNMP/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	68
7	Pesquisa de <i>Salmonella</i> na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento, com ácido acético 1% e armazenada a 1°C por 48 dias.	71

- 8 Médias dos valores de pH, na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias. 73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Amostragem da carcaça ovina com um gabarito de 25 cm ² de área.	45
2	Contagem padrão em placa de bactérias mesófilas aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (logUFC/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não a tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	56
3	Contagem padrão em placa de bactérias psicrófilas aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (logUFC/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não a tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	60
4	Contagem de bolores e leveduras (logUFC/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não a tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	63
5	Pesquisa de coliformes totais (logNMP/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não a tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	66
6	Pesquisa de coliformes fecais (logNMP/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não a tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	69
7	Pesquisa de <i>Salmonella</i> , na carne de paleta ovina, submetida ou não a tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	72
8	Médias dos valores de pH, na carne de paleta ovina, submetida ou não a tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	74

LISTA DE TABELAS DO ANEXO

FIGURA	PÁGINA
A1 Análise de variância da contagem de bactérias mesófilas aeróbicas ou anaeróbicas facultativa ($\log\text{UFC}/\text{cm}^2$) na superfície da carcaça ovina, 12 horas após o abate.	88
A2 Análise de variância dos valores da pesquisa de coliformes totais ($\log\text{NMP}/\text{cm}^2$) na superfície da carcaça ovina, 12 horas após o abate.	88
A3 Análise de variância dos valores da pesquisa de coliformes fecais ($\log\text{NMP}/\text{cm}^2$) na superfície da carcaça ovina, 12 horas após o abate.	89
A4 Análise de variância da contagem de bactérias mesófilas aeróbicas ou anaeróbicas facultativas ($\log\text{UFC}/\text{g}$), na carne de paleta ovina e armazenada a 1°C , por 48 dias.	89
A5 Análise de variância da contagem de bactérias psicrófilas aeróbicas ou anaeróbicas facultativas ($\log\text{UFC}/\text{g}$), na carne de paleta ovina e armazenada a 1°C , por 48 dias	90
A6 Análise de variância da contagem de bolores e leveduras ($\log\text{UFC}/\text{g}$), na carne de paleta ovina e armazenada a 1°C , por 48 dias	90
A7 Análise de variância dos valores da pesquisa de coliformes totais ($\log\text{NMP}/\text{g}$), na carne de paleta ovina e armazenada a 1°C , por 48 dias	91
A8 Análise de variância dos valores da pesquisa de coliformes fecais ($\log\text{NMP}/\text{g}$), na carne de paleta ovina e armazenada a 1°C , por 48 dias.	91
A9 Análise de variância dos valores de pH, na carne de paleta ovina e armazenada a 1°C , por 48 dias.	92
A10 Valores da contagem de bactérias mesófilas aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (UFC/cm^2), na superfície da carcaça ovina.	92

A11	Valores da pesquisa de coliformes totais (NMP/cm ²), na superfície da carcaça ovina.	93
A12	Valores da pesquisa de coliformes fecais (NMP/cm ²), na superfície da carcaça ovina.	93
A13	Valores da contagem de bactérias mesófilas aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (UFC/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	94
A14	Valores da contagem de bactérias psicrófilas aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (UFC/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	95
A15	Valores da contagem de bolores e leveduras (UFC/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	96
A16	Valores da pesquisa de coliformes totais (NMP/g),na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	97
A17	Valores da pesquisa de coliformes fecais (NMP/g),na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	98
A18	Valores da análise de pH na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.	99

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito do ácido acético 1% sobre a microbiota da carne ovina maturada. Foram utilizados 5 animais ovinos machos castrados do tipo Sem Raça Definida (SRD), com idade aproximada de 1 ano, provenientes do interior do estado do Ceará. Após o abate as carcaças dos animais foram refrigeradas por 12 horas a 0°C e em seguida foram coletadas amostras da superfície dos seguintes locais: paleta, pescoço, peito, lombo, coxão e cavidade abdominal. Nessas amostras foram realizadas análises microbiológicas de contagem padrão em placas de bactérias mesófilas, pesquisa de coliformes totais e fecais. As paletas foram então retiradas das carcaças e cortadas em fatias de peso similar, da porção proximal para a porção distal desse corte. As fatias das paletas direitas foram submetidas a tratamento de imersão em solução de ácido acético a 1% por 1 minuto e as fatias esquerdas foram imersas em água potável (controle). Todas as fatias foram em seguida embaladas individualmente à vácuo em filme flexível, impermeável ao oxigênio e armazenadas para maturação a 1°C. Para as análises microbiológicas da carne de paleta, foram coletadas fatias nos dias 3, 13, 23, 33 e 48 de armazenamento. Em cada dia foram coletadas fatias, sendo 5 de cada tratamento de imersão. As análises realizadas foram contagem padrão em placa (mesófilos e psicrófilos), contagem de bolores e leveduras, contagem de clostrídios sulfito-redutores, pesquisa de coliformes totais e fecais e pesquisa de *Salmonella*. Não houve diferenças significativas ($P>0,05$) na contagem de bactérias entre os diferentes locais da carcaça ovina analisada. Em relação ao estudo de armazenamento da carne, foi observada uma redução ($P<0,05$) da contagem de bactérias mesófilas nas carnes tratadas com ácido nos dias 13 e 23 de estocagem. Com 3 e 13 dias de armazenamento houve uma redução significativa ($P<0,05$) na microbiota de psicrófilos na carne da paleta ovina tratada com ácido. Entretanto nos dias 23, 33 e 48 de armazenamento esse comportamento não foi observado. Em relação a bolores e leveduras, houve uma redução ($P<0,05$) da microbiota das amostras tratadas em relação a das não tratadas. Este efeito foi evidente até o dia 13 de armazenamento. Somente no 3º dia de armazenamento, as amostras tratadas apresentaram contagens de coliformes totais significativamente

($P < 0,05$) menores que as não tratadas. Tal comportamento, porém, não foi verificado nos dias 13, 23, 33 e 48 de estocagem. As amostras tratadas com ácido acético 1% apresentaram valores menores ($P < 0,05$) de coliformes fecais do que as não tratadas. Observou-se ausência de clostrídios sulfito-redutores em todas as amostras, independente do tratamento e do tempo de maturação. A pesquisa de *Salmonella*, indicou presença deste microrganismo em 20 e 24%, das amostras tratadas com ácido acético 1% e não tratadas, respectivamente. Os valores de pH foram significativamente menores ($P < 0,05$) nos dias 3, 23 e 33 que nos dias 13 e 48 de armazenamento. Os resultados sugerem que o abate cuidadoso de animais ovinos nas condições ambientais do Nordeste Brasileiro, permite obter carcaças com níveis aceitáveis de microrganismos na superfície. A imersão das carnes em ácido acético 1% seguida de estocagem a vácuo permite manter as carnes refrigeradas (1°C) por 13 dias, com controle eficiente da microbiota deteriorativa, mantendo um padrão higiênico-sanitário adequado, mas não é suficiente para inibir o crescimento de *Salmonella*.

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the effect of 1% acetic acid on the microbial condition of aged lamb meat. The experiment used five undefined breed (SRD) wethers, with 1 year of age. After slaughter the carcasses were chilled at 0°C and kept for 12 h. Samples for microbiological analysis were collected from the surface of shoulder, neck, breast, loin, leg and the ventral side of the flank. These surfaces were evaluated for mesophiles and total and fecal coliform microorganisms. Shoulders were then separated from the carcass and cut to standard weight slices, from the proximal to the distal region of the cut. The right side shoulder slices were dipped in 1% acetic acid solution for 1 min and the left side shoulder slices were dipped in distilled water (control). The slices were individually vacuum packaged in a film, with low permeability to oxygen and then stored at 1°C. On days 3, 13, 23, 33 and 48 of the aging period samples (5 treated with 1% acetic acid and 5 control) were collected, to be analyzed for total plate count, mould and yeast, sulfite-reducing clostridia, total and fecal coliforms and *Salmonella*. There was no difference ($P>0.05$) in surface microorganism counts among different locations in the lamb carcass. Related to the aging of meat treated with acetic acid it was observed a decrease ($P<0.05$) in mesophiles count on treated samples with 13 and 23 days of aging. At 3 and 13 days of aging occurred a significant ($P<0.05$) decrease of psychrophilic organisms in meats treated with acetic acid. However at 23, 33 and 48 days of storage this effect was not observed. There were a decrease ($P<0.05$) in moulds and yeast counts in samples treated with acid. Mould and yeast counts were smaller ($P<0.05$) at day 13 than those at days 33 and 48 days of aging. Only at day 3 of aging treated samples showed lower ($P<0.05$) total coliform counts than samples with no acid. Meat samples treated with 1% acetic acid showed lower ($P<0.05$) fecal coliform counts than samples with no acid. It was observed absence of sulfite-reducing clostridia in all samples independent of acid treatment or aging time. The presence of *Salmonella* detected in 20% of the treated samples and in 24% of the untreated ones. Meat pH values were lower ($P<0.05$) on days 3, 23 and 33 than on days 13 and 48 of aging. Results suggest that proper slaughter conditions in Northeast Brazil produce lamb carcasses with acceptable counts of microorganisms. Deeping of

meat cuts in 1% acetic acid solution followed by vacuum packazing is appropriate to age meat at 1°C for 13 days. This treatment keeps low levels of psicrofilic counts, allows a sound higienic condition of the meat but it is not enough to inhibit the presence of *Salmonella*.

1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de ovinos é de 14.726.000 animais, sendo que 48,23 % se concentra na região Nordeste, daí se observar o grande potencial da criação deste animal nesta região (SUDENE,1999). A criação de ovinos desempenha uma importante função social, pois além de constituir-se como fonte de renda para um grande contingente de pequenos produtores rurais, contribui para a redução do déficit nutricional destas comunidades (EMBRAPA, 1997).

Atualmente existe uma crescente demanda de carne de pequenos ruminantes sinalizada pelos mercados consumidores internos e externos, justificando o preparo técnico da atividade, para que se possa atender às exigências mercadológicas de vanguarda. Os requisitos a destacar como importantes para o mercado de carne e produtos derivados se referem principalmente ao aspecto higiênico-sanitário (Zapata, 1994).

Apesar da ampla disponibilidade de técnicas eficientes e modernas, com relação aos aspectos qualitativos e de preservação de carnes, nos países desenvolvidos, há necessidade de adequar estes processos às peculiaridades das áreas mais subdesenvolvidas, a fim de aumentar o consumo deste alimento.

A maturação da carne tem como finalidade desenvolver o sabor e diminuir a dureza, melhorando assim sua palatabilidade. Este método consiste em armazenar a carne fresca, antes da comercialização, sob temperaturas em torno de 0° C até que as características sensoriais desejadas sejam obtidas.

O potencial de comercialização da carne maturada, porém, somente poderá ser desenvolvido na medida em que as modernas tecnologias de acondicionamento pós-abate de carcaças e cortes permitam

a obtenção de carnes de alto padrão higiênico-sanitário.

A carne em virtude de ser um alimento rico em elementos nutritivos, necessários ao desenvolvimento microbiano, deteriora-se em breve espaço de tempo (Silva & Beraquet, 1998a).

O emprego de técnicas adequadas de higiene no processamento da carne visa aumentar a vida de prateleira, aprimorando a manipulação ou eliminando microrganismos patógenos e deterioradores, capazes de alterar a sanidade da carne. O objetivo dessas técnicas é evitar a exposição do consumidor aos riscos de infecções quando as carnes são processadas fora de padrões higiênicos-sanitários satisfatórios (Silva & Beraquet, 1998b).

A aplicação de ácidos orgânicos na superfície da carne tem sido empregada na redução de populações de bactérias, e assim estender a vida de prateleira e minimizar o risco de doenças transmitidas por alimentos, sem afetar a qualidade sensorial da carne (Delmore, *et al.*, 1998; Silva, 1999a).

A carne depois de uma permanência relativamente longa em temperaturas de refrigeração, pode permitir o crescimento de microrganismos na sua superfície e isto requer a adoção de medidas preventivas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Conversão bioquímica do músculo em carne.

As funções vitais do sistema muscular não cessam no momento da morte do animal. A série de modificações bioquímicas e estruturais, que ocorrem após o sacrifício, é denominada de “conversão do músculo em carne” (Roça & Serrano, 1994a).

A denominação de carne se refere à musculatura esquelética de algumas espécies animais, incluídos a gordura e o tecido conectivo, naturalmente associado ao tecido muscular, que depois de ter passado por certas transformações bioquímicas torna-se comestível.

A conversão do músculo em carne se inicia com a sangria do animal, o que acarreta uma série de mudanças no músculo tais como: alterações na homeostase, na circulação sanguínea, no aporte de oxigênio e variações na temperatura do músculo. Como consequência dessas alterações, ocorre um declínio do ATP, da fosfocreatina, do pH, devido ao acúmulo de ácido láctico e um aumento da dureza do músculo decorrente do *rigor mortis* (Hedrick *et al.*, 1994)

A conversão do músculo em carne é um processo degradativo gradual que, se continuasse indefinidamente, levaria a uma quebra completa dos tecidos a seus elementos constituintes. Isto é evitado por algumas maneiras de preservação como refrigeração e congelamento.

2.2 - Maturação da carne.

A temperatura de armazenamento das carcaças de animais recém-abatidos pode determinar alterações significativas na velocidade das reações químicas *post-mortem* (Roça & Serrano, 1994a).

Durante o acondicionamento da carne sob temperaturas de refrigeração, a rigidez causada pelo *rigor mortis* começa a diminuir. O amaciamento progressivo da carne durante longos períodos de armazenamento em refrigeração é denominado maturação. Esta técnica tem como finalidade, tornar a carne macia e melhorar outras qualidades organolépticas, como por exemplo, o sabor (Puga, *et al.*, 1999). O processo mais antigo de acondicionamento, para a maturação da carne, consiste em manter as carcaças penduradas pelo tendão de Aquiles em câmaras refrigeradas a 0°C por períodos de 7 a 21 dias, dependendo da espécie animal (Price & Schweigert, 1971). Atualmente tem sido empregada a maturação das carcaças ou cortes de carne embalados a vácuo por períodos prolongados, para se alcançar uma textura satisfatória (Huff & Parrish, 1993; Huff-Lonergan *et al.*, 1995).

Dentre os mecanismos pelo qual ocorre a diminuição da dureza da carne, durante o processo de maturação, a degradação das proteínas miofibrilares parece ser o mais importante.

As primeiras alterações observadas na integridade estrutural das fibras musculares após a morte são a degradação do disco Z do sarcômero, devido à degradação das proteínas associadas a esta estrutura, principalmente desmina e titina (Hedrick *et al.* 1994; O'halloran *et al.*, 1997). Entretanto, Taylor *et al.*, (1995) observaram que aproximadamente 65 a 80% do amaciamento *post-mortem* ocorria durante os primeiros 3 ou 4 dias sem que nenhuma degradação do disco Z fosse observada. Contudo durante este período, era verificada a degradação das miofibrilas na banda I adjacente ao disco Z. Estudos posteriores confirmaram estes resultados (Boyer- Berri & Greaser, 1998; Huff-Lonergan *et al.*, 1996; Taylor & Koohmaraie, 1998). Dentre as proteínas miofibrilares degradadas durante o amaciamento, pode-se citar, a titina, nebulina, filamina, desmina e troponina-T (Huff-Lonergan *et al.*, 1996).

Tem sido relatado que sistemas enzimáticos presentes no músculo esquelético são responsáveis pela degradação proteolítica das proteínas miofibrilares após a morte. Dentre estes sistemas podem ser citados o complexo proteinase multicatalítico, as catepsinas e as calpaínas. O complexo proteinase multicatalítico parece não causar a degradação de nenhuma proteína miofibrilar importante no amaciamento da carne (Hedrick *et al.*, 1994).

As catepsinas são proteínas intracelulares dos tecidos animais, com atividade em um pH ácido. Estas enzimas se localizam na fração lisossômica da célula. As catepsinas estão implicadas nas mudanças observadas durante a maturação de carnes. Koohmaraie *et al.*, (1988) estudando o efeito de algumas enzimas sobre a tenderização *post-mortem*, concluíram que as catepsinas não tinham efeito sobre a degradação das proteínas miofibrilares. Alguns autores (Hedrick *et al.*, 1994; Uytterhaegen *et al.*, 1994) afirmam que estas enzimas não podem degradar as proteínas miofibrilares por se encontrarem dentro dos lisossomos e não serem liberadas mesmo após estimulação elétrica e longos períodos de estocagem. As proteínas teriam que sofrer processos de endocitose para dentro do lisossoma para que a proteólise pudesse acontecer, como ocorre no caso do músculo *in vivo*. Porém, isto é impossível no músculo *post-mortem*, já que a endocitose é um processo ativo que requer energia. Já outros autores (O'halloran *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1995) admitem a possibilidade da contribuição das catepsinas na proteólise *post-mortem*. Taylor *et al.*, (1995) sugerem que as catepsinas localizadas no retículo sarcoplasmático possuem algum papel na tenderização do músculo após 6 ou 7 dias da morte, quando o pH desta estrutura se encontra baixo e pequenas degradações da miosina e α -actinina são observadas.

As calpaínas são enzimas neutras ativadas pelo íon cálcio, que diferem quanto aos requerimentos de cálcio para sua ativação. Enquanto a m-calpaína requer quantidade milimolar de cálcio, a μ -calpaína necessita de

uma concentração micromolar de cálcio para sua ativação (Hedrick *et al.*, 1994).

Dos três sistemas enzimáticos, as calpaínas são as principais responsáveis pela proteólise que leva ao aumento da tenderização da carne e por 90% ou mais da tenderização proteolítica que ocorre durante os primeiros 7 a 10 dias de estocagem *post-mortem* entre 2 e 4°C (Boehm *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1995).

O sistema de calpaínas consiste além das duas enzimas dependentes de cálcio, anteriormente citadas, do inibidor calpastatina. As atividades altas de calpastatina, igualmente ativada pelos íons de cálcio livres no sarcoplasma, inibem a ação das calpaínas, bloqueando o processo natural de tenderização *post-mortem*. Este efeito inibidor de proteólise das calpastatina tem sido relacionado como o fator que apresenta maior correlação com a maciez da carne conservada sob refrigeração (O'Connor *et al.*, 1997; Rubensam *et al.*, 1998).

O efeito das calpaínas e a calpastatina sobre a tenderização do músculo que ocorre após a morte do animal tem sido relatada em vários estudos (Boehm *et al.*, 1998; Geesink & Koohmaraie, 1999; Taylor & Koohmaraie, 1998).

O processo de melhoramento da qualidade da carne ovina, por meio da maturação, provoca mudanças concomitantes nos atributos de qualidade desta, tais como sua maciez, suculência, aroma, cor e sabor. Isto se mostra extremamente importante num momento em que o consumidor exige cada vez mais um produto de melhor qualidade. Entretanto as alterações microbiológicas ocorridas durante o processo de maturação se revelam de fundamental importância, uma vez que a qualidade microbiológica da carne não é evidenciada pelo seu aspecto visual, no momento da compra.

2.3 - Microbiologia da Carne

2.3.1 - Origem da contaminação microbiana

Os cuidados higiênicos das carnes têm início com o animal vivo, envolvendo inclusive a procedência, cuidados sanitários com os animais, características dos meios de transporte e, particularidades de ordem zootécnica, como a natureza da alimentação e do manejo recebidos (Roça & Serrano, 1994b).

Com exceção da superfície exterior, trato digestivo e respiratório, os tecidos dos animais são contêm poucos microrganismos. Os mecanismos naturais de defesa controlam com eficácia os agentes infectantes nos animais são vivos. Entretanto, esta defesa não ocorre depois da morte. A carne, inicialmente considerada estéril, pode se contaminar pelo contato com pêlos, pele, patas, conteúdo estomacal e entérico, leite do úbere, bem como pelo contato com as instalações do abatedouro, equipamentos do mesmo, mãos e roupas dos operários, água utilizada para lavar a carcaça e equipamentos, inclusive pelo ar nas zonas de processamento e armazenagem. A contaminação pode dar-se em quase todas as operações do sacrifício (retirada do couro, evisceração, etc.), processamento, armazenamento e distribuição da carne (ICMSF, 1998).

2.3.2- Microrganismos contaminantes

É ampla a gama de microrganismos ocorrentes na carne, devido esta ser um meio de cultivo ideal, por possuir um elevado teor de umidade (de 65 a 75%), uma complexa composição, apresentando grande conteúdo de nutrientes nitrogenados de diversos tamanhos moleculares e uma abundante quantidade de sais minerais e fatores de crescimento. Ainda contém hidratos de carbono fermentáveis e o pH apropriado para a multiplicação da maioria dos microrganismos (Frazier & Westhoff, 1993; Pardi *et al.*, 1995).

Como conseqüência da composição da carne e das distintas procedências dos microrganismos, são muitas as espécies microbianas que podem contaminar as carnes. Bolores de muitos gêneros podem chegar a superfície das carnes e se desenvolverem. Tem especial importância as espécies dos gêneros *Cladosporium*, *Sporotrichum*, *Geotrichum*, *Thamnidium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Monilia*. Na carne pode-se encontrar leveduras, principalmente asporógenas. Se tem encontrado bactérias pertencentes a distintos gêneros, sendo os mais importantes *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Campylobacter*, *Salmonella* e *Streptomyces*.

Também, existe a possibilidade de que a carne possa se contaminar com microrganismos patógenos para o homem, sobre tudo os microrganismos de origem intestinal (Frazier & Westhoff, 1993). Os equipamentos usados nas operações de retirada do couro, as mãos dos manipuladores podem contaminar-se com o conteúdo do trato gastrointestinal e fezes e espalhar esta contaminação de animal para animal (ICMSF, 1998).

2.3.3- Fatores que afetam a atividade microbiana na carne

2.3.3.1-Fatores intrínsecos

Água - Os microrganismos tem uma necessidade de água e sem esta é impossível que haja crescimento. A quantidade exata de água necessária para o crescimento dos microrganismos é variável. Esta demanda de água é expressa como atividade de água (a_w). Cada microrganismos tem uma a_w máxima, ótima e mínima de crescimento (Frazier & Westhoff, 1993).

Geralmente a atividade de água da carne fresca é de 0,99 ou mais, encontrando-se, assim, em nível favorável ao crescimento de grande variedade de bactérias.

Bactérias, em geral, têm níveis mínimos de a_w para crescimento muito mais altos que os encontrados para leveduras e fungos. No alto do espectro de a_w , estão as bactérias deteriorantes e as causadoras de doenças transmitidas por alimentos. Raramente, esses microrganismos causam deterioração no alimento em níveis de a_w menores que 0,92 ou 0,90.

Microrganismos gram negativos que ocorrem na putrefação superficial das carnes são particularmente sensíveis à diminuição da atividade de água, especialmente *Pseudomonas*. Enquanto que bactérias gram-positiva são, via de regra, requerem atividades de água mais baixa (Pardi *et al.*, 1995)

Concentração de íon hidrogênio (pH) - O crescimento microbiano é possível numa faixa ampla de pH, a maior parte das bactérias tem seu ponto ótimo de crescimento próximo da neutralidade, ou seja pH 7,0. Na carne fresca o pH pode oscilar desde aproximadamente 5,7 até valores superiores a 7,2, este vai depender, tanto da quantidade de glicogênio existente no tecido muscular do animal no momento de ser sacrificado como das modificações que posteriormente ocorrem na carne. Um valor de pH mais elevado favorece o crescimento dos microrganismos enquanto que um valor mais baixo só retarda a multiplicação dos microrganismos e é possível que seja seletivo para determinados microrganismos (Frazier & Westhoff, 1993). Todavia cada microrganismo tem um, pH mínimo, ótimo e máximo de crescimento (Frazier & Westhoff, 1993). Em geral, as leveduras e bolores toleram melhor a acidez que as bactérias. As leveduras têm um bom desenvolvimento entre pH 4,0 e 4,5. (Pardi *et al.*, 1995).

A propriedade inibidora de algumas ácidos orgânicos, entre eles os ácidos acético, benzoico, cítrico, láctico, propiônico e sórbico, tem justificado a sua utilização como acidulantes ou como conservadores de alimentos. O pH não só influencia a velocidade de multiplicação dos microrganismos, como também a sobrevivência dos mesmos no alimento, durante seu armazenamento, tratamento térmico, dessecação ou durante qualquer outro tipo de tratamento. Assim mesmo, é possível que o pH inicial seja apropriado, porém como consequência da existência de uma flora competitiva ou como consequência da multiplicação do próprio microrganismo, o pH pode se tornar desfavorável. Por outro lado, é possível que o pH inicial seja limitante, embora possa ocorrer que a multiplicação de um reduzido número de microrganismos modifique o pH até alcançar um valor mais apropriado para que cresçam outros microrganismos (Frazier & Westhoff, 1993).

Potencial oxidação-redução – Um fator central do potencial de oxido-redução da carne é a respiração tissular que continua consumindo oxigênio e produzindo dióxido de carbono. Nos animais vivos a demanda de oxigênio é suprida pelo transporte de sangue, tensão de oxigênio e potencial redox do músculo vivo, que é grande. Com a morte do animal, cessa o aporte sangüíneo e o conteúdo de oxigênio, com isto o potencial redox do músculo diminui gradualmente, levando a produção e acumulação anaeróbica de ácido láctico. A acidez desenvolvida pode ser suficiente para reduzir muito o metabolismo tissular, que continua ocorrendo, inclusive a baixa temperaturas e que supera a difusão de oxigênio na carne (ICMSF, 1985).

A capacidade oxidante e redutora da carne pode ser medida através do potencial de óxido-redução. Depende primeiramente da composição química e, em segundo lugar, da pressão parcial de oxigênio do alimento e, essencialmente, do grau de aeração. Por estas razões, o valor

Eh de um substrato representa um importante fator de seleção no crescimento de microrganismos (Pardi, *et al.*, 1995).

As condições de aerobiose na superfície da carne são apropriadas para que se multipliquem mofo, leveduras e bactérias aeróbicas. E no interior das peças compactadas de carne, as condições são de anaerobiose e tende a continuar sendo devido ao potencial de oxido-redução esta equilibrado e muito baixo nível. Favorendo ainda mais esta o revestimento a material da embalagem seja é impermeavel ao oxigênio.

Necessidades nutritivas dos microrganismos - Muitos microrganismos necessitam de nitrogênio, energia, minerais e vitaminas B para o seu crescimento (Hedrick *et al.*, 1994).

Como os principais componentes da carne são proteínas, lipídios e hidratos de carbono esta se mostra como excelente fornecedor de substrato para o crescimento microbiano. Todavia a maioria das proteínas e lipídeos são insolúveis e portanto inacessíveis ao ataque microbiano direto. Porém a concentração de aminoácidos e peptídios tendem aumentar com o tempo, devido a proteólise enzimática. Outros substrato como ácido láctico, glicogênio residual e glicose proveniente do glicogênio que são produzidas durante o desenvolvimento do *rigor mortis*, são formas acessíveis aos microrganismos (Brody, 1996; Hedrick *et al.*, 1994).

Bactérias, leveduras e bolores, são os que melhor aproveitam as proteínas, carboidratos complexos e lipídios. Isto porque dispõem de enzimas que hidrolisam as moléculas daqueles e de outros componentes mais simples. Em relação aos minerais todos os microrganismos necessitam, enquanto que os requerimentos de vitaminas e outros fatores de crescimento são variados (Hedrick *et al.*, 1994).

2.3.3.2 - Fatores extrínsecos

Temperatura Ambiente - Cada microrganismo tem uma temperatura ótima, bem como uma temperatura mínima e máxima de crescimento. Consequentemente, a temperatura a qual a carne é estocada influencia marcadamente a espécie e a velocidade do crescimento microbiano. Mudanças de alguns graus na temperatura podem favorecer o crescimento de algumas espécies e resultar diversos tipos de deterioração. Estas características propiciam a base para o uso da temperatura baixa para controlar a atividade microbiana (Hedrick *et al.*, 1994).

Com base nas diferentes faixas de temperaturas ótimas de crescimento, os microrganismos classificam-se em psicrófilos (0 a 10°C), mesófilos (35°C), termófilos (43 a 80°C) (APHA, 1992).

Bactérias, bolores e leveduras apresentam algum gênero psicrófilo, mesófilo e termófilo. Entretanto, bolores, geralmente são psicrófilos seguidos das leveduras e bactérias. (Hedrick *et al.*, 1994).

Umidade Relativa - O nível de umidade relativa requerida como ótimo, para condições de estocagem da carne varia com a temperatura. Em geral, com o aumento da temperatura de estocagem, há um requerimento de uma umidade relativa mais baixa. Desta forma a temperatura de refrigeração da carne é -1°C a 3°C e a umidade relativa mantida aproximadamente entre 88 a 92% (Hedrick *et al.*, 1994).

Uma umidade excessivamente elevada favorece a multiplicação de microrganismos capazes de produzir alterações (Frazier & Westhoff, 1993). Vários microrganismos da carne como bactérias requer uma alta umidade relativa, em torno de 90%. Leveduras são intermediárias (87 a 92%) e bolores tem um requerimento de umidade relativa baixa (84% ou menos). Assim bolores e leveduras são mais susceptível ao crescimento na superfície de produtos cárneos que são parcialmente desidratados, enquanto que o crescimento de bactérias é impedido. (Hedrick *et al.*, 1994)

Composição Gasosa do Ambiente - A composição gasosa do ambiente que envolve um alimento pode determinar os tipos de microrganismos que poderão nele predominar. A presença de oxigênio favorecerá a multiplicação de microrganismos aeróbios, enquanto que sua ausência propiciará o crescimento de anaeróbios.

Modificações na composição gasosa são capazes de causar alterações na microbiota que sobrevive ou que se multiplica em determinado alimento (Franco & Landgraf, 1999).

Na carne, podem crescer bactérias aeróbicas, anaeróbias e anaeróbias facultativas. Todos os bolores que crescem na carne são aeróbios, enquanto leveduras, se desenvolvem melhor quanto em condições de anaerobiose (Pardi, *et al.*, 1995).

A ausência de oxigênio e o aumento de dióxido de carbono nas carnes embaladas a vácuo, inibem a maioria dos microrganismos, especialmente os psicófilos aeróbicos. Em condições de anaerobiose aumenta o desenvolvimento das bactérias lácticas e diminui o das espécies de *Pseudomonas* aeróbicas que predominam inicialmente (Brody, 1996).

Na embalagem a vácuo a redução da concentração de oxigênio em torno dos microrganismos aumenta a vida útil da carne fresca em comparação com a carne embalada com películas permeáveis ao oxigênio. O dióxido de carbono gerado pela atividade enzimática da carne e dos microrganismos aumenta o nível deste, no interior da embalagem, retardando o crescimento de bactérias anaeróbicas facultativas como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. Das bactérias lácticas presentes na superfície e no interior de carnes embaladas a vácuo, que geralmente predominaram são espécies do gênero *Lactobacillus* (Brody, 1996).

Fragmentação da carne - Um fator extrínseco que afeta a

atividade microbiana e a velocidade de deterioração é o tamanho de partícula das carnes trituradas. A moagem da carne resulta em uma carga microbiana maior, devido as grandes áreas de superfície expostas, mais água, nutrientes disponíveis, maior penetração e disponibilidade de oxigênio. Portanto os cortes pequenos e as carnes moídas favorecem o crescimento dos microrganismos e são mais susceptíveis à deterioração (Hedrick *et al.*, 1994).

2.4 - Perigo Microbiológico da Carne

Sanitização, refrigeração apropriada e manuseio adequado são parâmetros que, se considerados, levam a uma contaminação mínima e atividade microbiana reduzida (Hedrick *et al.*, 1994).

Os padrões microbiológicos para alimentos tem como finalidade a proteção da saúde do consumidor e a uniformização de limites aceitáveis para as práticas comerciais. Estes foram estabelecidos pelo Ministério da Saúde e se encontram definidos na Portaria n ° 451 da Secretária de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, de 19/09/1997. De forma genérica, o anexo III desta Portaria (BRASIL,1997b), estabelece alguns conceitos atinentes à interpretação e às conclusões das análises microbiológicas dos alimentos destinados ao consumo humano, como, mostrado a seguir;

“Produtos em condições higiênicas insatisfatórias são os que apresentam contagem padrão em placa, coliformes totais, bolores e leveduras acima dos limites estabelecidos e num valor máximo de até dez vezes esses limites, e os produtos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, são os que apresentam coliforme fecais, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e clostrídios sulfito redutores (a 46°C) acima dos limites estabelecidos nos padrões específicos e num valor máximo de até dez vezes esses limites”.

A Secretária de Vigilância do Ministério da Saúde, conceitua os produtos potencialmente capazes de causar enfermidades transmitidas por alimentos da seguinte maneira: “São os que apresentam *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* e seus indicadores (clostrídios sulfito redutores a 46°C), em número superior a dez (10) vezes os limites estabelecidos nos padrões específicos. Incluem-se, ainda, os microrganismos infectantes, tais como: *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Brucella* spp., *Campylobacter jejuni* e outros reconhecidos e caracterizados como agentes de infecções alimentares” (BRASIL, 1997b).

Dois grupos de microrganismos são higienicamente importantes na preservação da qualidade da carne: os causadores de intoxicações e infecções no consumidor e os deterioradores (Silva & Beraquet, 1998a).

Intoxicação alimentar se refere a enfermidade alimentar causada pela presença de uma toxina bacteriana, que se originou no alimento. A expressão infecção alimentar diz respeito às enfermidades bacterianas originadas pela entrada de bactérias no organismo através da ingestão de alimentos contaminados e à reação do organismo provocada por sua presença ou por seus metabolitos (Frazier & Westhoff, 1993).

Os microrganismos que podem ser veiculados pela carne e produzir enfermidades alimentares são: *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus*, dentre outros.

A contaminação microbiológica de carne bovina, moída, *in natura*, usada para consumo humano no comércio varejista das regiões de São José do Rio Preto-SP, Macapá-AP, Campina Grande-PB, Campos dos Goytacazes-RJ tem se mostrado preocupante, pois pesquisas feitas relatam que foram encontradas, além de microrganismos que indicam condições higiênico-sanitário deficientes e afetam a vida útil dos produtos, aqueles capazes de ocasionar toxinfecções. Isto tem exigido um controle mais

rigoroso por parte dos serviços de Vigilância Sanitária desses Estados e/ou Municípios (Floretino *et al.*, 1997; Hoffman *et al.*, 1998; Xavier *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 2000).

Os produtos de origem animal são os maiores responsáveis pela distribuição universal das *Salmonella* e seus problemas subsequentes (Jay, 1992).

O ciclo da *Salmonella* é importante nos países onde predomina a criação intensiva, com o aproveitamento de restos de animais sadios ou doentes com *Salmonella*, que retorna aos animais nas fazendas através das rações (farinha de carne e osso) ou de fertilizantes no solo (Pinto, 2000).

As carnes frescas podem conter bactérias do gênero *Salmonella* proveniente dos animais sacrificados acometidos com esta enfermidade ou podem ser contaminadas por manipuladores que podem ser sintomáticos ou assintomáticos (Pinto, 2000).

Salmonella tem como temperatura ótima para o seu crescimento 37°C, cresce melhor em alimentos não ácidos. A faixa de pH mais apropriada para o seu crescimento está entre 4,5 e 9,0 e da a_a de 0,93 a 0,95. (Hedrick *et al.*, 1994; Frazier & Westhoff, 1993).

O gênero *Clostridium* é um grupo bacteriano integrado por microrganismos que tem em comum característica de reduzir o sulfeto a sulfeto (Anderson, 1989). O *Clostridium perfringens* apresenta variações no que se refere ao pH mais favorável. Todavia segundo Frazier & Westhoff (1993) este microrganismo não cresce a valores de pH menores do que 5,0 ou acima de 9,0. A temperatura máxima de crescimento é de 55°C e a temperatura ótima é de 43 a 47°C. Enquanto a temperaturas de 15 a 20°C seu crescimento é limitado.

Clostridium perfringens é anaeróbico e produz uma variedade de

toxinas e abundantes quantidades de gás durante o crescimento (Hedrick *et al.*, 1994). A carne pode se contaminar com *Clostridium perfringens* proveniente de material fecal, solo, poeira e pele do animal (ICMSF, 1998). O *Clostridium perfringens* bem como seus esporos são encontrados em muitos alimentos. Estes incluem carne bovina, ovina, porco, aves, peixes, tanto fresco como processado (Hedrick *et al.*, 1994). Os tecidos internos, por exemplo fígado pode conter pequeno número de *Clostridium perfringens* (ICMSF, 1998).

Quando a carne fresca é estocada a temperatura (<15°C) baixa permite o crescimento de *Clostridium perfringens*. Células vegetativas viáveis tenderá a multiplicar durante o armazenamento frio e será destruída por meio do cozimento (ICMSF, 1998).

O envenenamento alimentar resulta da sobrevivência de esporos em carnes cozidas e considerável crescimento (>10⁵ UFC/g) durante refrigeração e produtos cozidos inadequados (ICMSF, 1998).

2.5 - A utilização de ácidos orgânicos

Admitindo-se a impossibilidade para evitar totalmente a contaminação inicial da carne, todos os esforços dos higienistas e tecnologistas são dirigidos no sentido de reduzir ao mínimo esta contaminação, com a aplicação de medidas de controle, como a utilização de ácidos orgânicos.

Conservantes químicos com propriedades antimicrobianas têm uma importante função na prevenção da deterioração e garantem a segurança de muitos alimentos (Russel & Gould, 1990). A utilização de agentes químicos na sanitização de carcaça de animais domésticos recém-abatidos, destinados ao consumo humano, tem como principal objetivo a eliminação de microrganismos patogênicos e deterioradores, visando aumentar a sanidade e a vida de prateleira da carne (Silva & Beraquet,

1998b). A sanitização aumenta em mais de 30% a vida de prateleira da carne bovina, durante armazenamento a $7 \pm 2^\circ\text{C}$ (Silva, 1999b). Segundo Goddard, *et al.*, (1996) o tratamento com ácido orgânico imediatamente antes da embalagem pode ampliar a vida de prateleira da carne, por um longo período de estocagem a -1°C .

De acordo com o “Regulamento Técnico sobre Aditivos utilizados segundo as Boas Práticas e suas funções”, o ácido acético é classificado como acidulante (BRASIL, 1999).

Por razões de solubilidade, sabor e baixa toxicidade, os ácidos orgânicos de cadeia curta, tais como os ácidos acético, benzóico, cítrico, propiônico e sórbico são mais comumente usados como preservantes ou acidulantes dos alimentos. A atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos aumenta com o comprimento da cadeia. Entretanto ácidos de cadeia alifática longa, maior do que C_{10} ou C_{11} tem pouco potencial de aplicação, devido a sua baixa solubilidade em água (ICMSF, 1980).

A aplicação de ácidos orgânicos por aspersion ou imersão pode diminuir a carga microbiana superficial das carnes, incluído bactérias deterioradoras e patogênicas (Fu, *et al.*, 1994).

A molécula não dissociada do ácido orgânico ou seus esteres, é responsável pela atividade antimicrobiana. A forma não dissociada de alguns ácidos orgânicos pode difundir livremente através da membrana celular bacteriana, ionizando-se dentro da célula e produzindo prótons que acidificam ou alcalinizam o interior da célula. Os ácidos orgânicos fracos acidificam o interior da célula mais eficientemente do que os ácidos inorgânicos fortes. (ICMSF, 1980)

A diminuição do pH do alimento, aumenta a proporção de moléculas não dissociados do ácido orgânico. Deste modo o ácido orgânico vai ser mais eficaz para os alimentos com pH abaixo de 5,5. Muitos ácidos

orgânicos são largamente ineficazes como inibidores microbianos a pH 5,5 – 5,8, dentro do qual bactérias produtoras de toxinas e muitas bactérias deteriorativas crescem. Estas são usualmente ineficazes quando o nível de microrganismos é alto. Todavia muitos microrganismos utilizam os ácidos orgânicos como fonte de carbono metabolizável, sendo esta utilização dependente da resistência individual de cada microrganismo (ICMSF, 1980).

A aspersão das soluções de ácidos orgânicos no músculo *tensor da fascia latae* bovina apresentou eficiência no controle microbiano, sem afetar a qualidade sensorial da carne (Silva, 1999a).

O ácido acético e o acetato de cálcio são mais efetivos contra leveduras e bactérias, do que contra bolores. A atividade antimicrobiana do ácido acético e seus sais aumenta quando o pH do meio diminui. Todavia este varia com o produto e microrganismo, mas geralmente está entre 3,5 e 5,5. Esse é letal contra *Salmonella aertrycke*, *Staphylococcus aureus*, *Phytomonas phasedi*, *Bacillus cereus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspersillus niger* (Considine & Considine, 1982).

Supõem-se três tipos de mecanismo de ação do ácido acético. O primeiro se refere à interação do ácido acético com a membrana da células bacteriana neutralizando o potencial eletroquímico. Neste sentido tem sido demonstrado que o ácido acético inibe a captação não competitiva de aminoácidos da membrana celular do *Bacillus subtilis*. Provavelmente o acetato age como qualquer outro ácido lipofílico fraco, que apresenta como principal efeito a neutralização do gradiente de membrana. Um segundo mecanismo de ação do ácido acético, é a desnaturação das proteínas dentro da célula bacteriana. O terceiro mecanismo de ação se refere ao abaixamento do pH interno da bactéria pelo acetato (Russell & Gould, 1990). Todavia, a habilidade de alguns ácidos para o controle do crescimento de microrganismos na superfície da carne, dependerá, em grande extensão, da dissociação do ácido, e da influência da capacidade tampão do ambiente circunvizinho (Quattara, *et al.*, 1997).

Segundo Osthold *et al.*, (1984), o ácido acético provoca uma pequena redução no pH da carne, o que é considerado importante na sua atividade antimicrobiana. Hamby, *et al.*, (1987), realizaram tratamentos com solução contendo 1,0% de ácido láctico e 1,0% de ácido acético. Os resultados obtidos demonstraram eficiência na redução da carga microbiana inicial em carcaças e cortes primários de bovinos. O ácido acético apresentou maior eficiência do que o ácido láctico. A aplicação de 1,0% de ácido acético em superfícies de carnes reduziu em até 1,5 ciclos logarítmicos a contagem microbiológica inicial, sem afetar negativamente a aparência geral do produto (Lambert, *et al.*, 1991).

Frederick, *et al.*, (1994), trabalhando com carne suína tratada com ácido acético, observaram um decréscimo na incidência de bactérias nos cortes tratados. Dickson (1992), concluiu que a sanitização com ácido acético, em amostras de carne bovina, independente da contaminação inicial da mesma, provoca uma redução consistente na população bacteriana. Entretanto, Delmore, *et al.*, (1998), observaram que o tratamento de descontaminação é mais eficiente na redução da contagem bacteriana quando o nível inicial de contaminação é alto.

Kotula & Thelappurate (1994), demonstraram que a inibição microbiana é diretamente proporcional à concentração do ácido e tempo do tratamento e que o efeito inibitório do ácido diminui com o tempo de armazenagem da carne bovina. Dickson & Siragusa, (1994), avaliando a carne bovina magra e gordurosa, inoculadas com uma cepa de *Salmonella typhimurium*, observaram que, após imergir estas em soluções 1% de ácido láctico e 1% de ácido acético, houve uma redução deste microrganismo. Entretanto depois de 21 dias esta diferença não era significativa. Relataram também que a redução dos microrganismos acima referidos se baseia num efeito combinado dos inibidores ácidos e das condições de armazenagem.

Anderson & Marshall (1990) concluíram que a concentração e temperatura de aplicação são os maiores fatores de inibição de

microrganismos e que os ácidos acético, láctico, cítrico e ascórbico podem ser usados com resultados similares.

Segundo Anderson (1992), o ácido acético e o ácido láctico reduzem a contagem microbiana, e o efeito é melhor quando usados a 70°C do que a outras temperaturas abaixo de 20°C.

Dickens & Whittemore (1994), trabalhando com injeção de ácido acético glacial e ar, em carcaças de aves, constataram que a contagem total de microrganismos aerobios não foi afetada em nenhum tratamento, mas a contagem de *Enterobacteriaceae* nas carcaças tratadas era significativamente menor do que a contagem nas carcaças não tratadas (controle); observaram ainda que o uso de 0,6% de ácido acético com injeção de ar no tanque de resfriamento, resulta numa grande redução na incidência de *Salmonella*.

2.6 - Temperaturas de armazenamento

As temperaturas baixas são empregadas para retardar as reações químicas, a atividade das enzimas dos alimentos e para retardar ou deter a multiplicação dos microrganismos presentes nos mesmos (Frazier & Westhoff, 1993).

Os parâmetros necessários a se levar em conta com relação a armazenagem refrigerada da carne são: carga microbiana inicial, condições de temperatura e umidade durante a estocagem, presença ou ausência de cobertura protetora, espécie animal da carne e tipo de produto armazenado. Contudo, a armazenagem refrigerada da carne é, geralmente, limitada a períodos relativamente curtos, porque mudanças deteriorativas continuam a ocorrer e, a proporção, de muitas dessas mudanças acelera com o tempo (Hedrick *et al.*, 1994).

Tanto a multiplicação como as reações metabólicas dos

microrganismos, dependem de enzimas, e a velocidade das reações enzimáticas e diretamente influenciada pela temperatura (Frazier & Westhoff, 1993).

Quanto mais rápido se realize o resfriamento da carne, tanto menor será a possibilidade de multiplicação dos microrganismos mesófilos. O tempo máximo de manutenção da carcaça bovina sob refrigeração é de aproximadamente 30 dias, dependendo da quantidade de microrganismos que contém, temperatura e umidade relativa da câmara onde se conserva. Para a carcaça de suíno, cordeiro e carneiro este tempo é de 1 a 2 semanas (Frazier & Westhoff, 1993). Segundo Pardi *et al.*, (1993), existe muita dificuldade no controle do crescimento microbiano na superfície da carne resfriada estocada por um período de tempo mais longo, particularmente por causa da umidade mais elevada.

Os microrganismos que ocasionam problemas na estocagem a frio das carnes são bactérias psicrófilas, principalmente pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Em algumas carnes conservadas a baixa temperatura pode ocorrer crescimento de bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Flavobacterium*, *Proteus* além de leveduras e bolores (Frazier & Westhoff, 1993).

Segundo a Circular do DIPOA, nº 053/88 de maio de 1988, que disciplina a produção de cortes de carne resfriada ou congelada; no tocante ao processo de refrigeração estabelece que a temperatura no centro das peças seja de 0°C e a maturação dos cortes embalados a vácuo, deve efetivar-se a temperaturas entre 1°C a 0°C, no lapso de tempo de 15 a 20 dias. Com relação à distribuição esta deverá ser realizada com temperatura controlada de 0°C e a exposição da carne nos postos de venda, deverá ser em ambiente cuja temperatura não ultrapasse 5°C. Também recomenda-se, pelas particularidades que o produto apresenta, que o mesmo seja consumido em até 72 horas, a contar da hora de expedição do

estabelecimento produtor.

O prazo de vida comercial das carnes resfriadas varia em função das condições técnicas de sua obtenção e das temperaturas em que são mantidas. Basicamente o sucesso na conservação das carnes pelo frio industrial depende da redução ao mínimo da contaminação inicial. Assim este prazo será máximo se a carne tiver sido obtida em condições adequadas de higiene, e mantida em condições ótimas de refrigeração (Pardi *et al.*, 1995).

As temperaturas de refrigeração que se empregam no comércio, inferiores a 5,0 °C, retardam realmente a multiplicação de muitos patógenos veiculados por alimentos (Frazier & Westhoff, 1993).

De acordo com a Portaria nº 494 de 14 de agosto de 1996 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, os estabelecimentos de abate de bovinos, bubalinos e suínos somente poderão entregar carne e miúdos para comercialização com temperatura de até 7 °C (BRASIL, 1996).

A manutenção da temperatura de refrigeração é de grande interesse para a distribuição da carne fresca. A carne se altera por bactérias quando há acumulação de produtos resultantes do metabolismo microbiano que a tornam desagradável para o consumidor. A alteração da carne é um fenômeno variável cujo curso vem determinado tanto pela sua composição nutricional como pelo tipo e variação das espécies bacterianas presentes (Brody, 1996).

Sheridan *et al.*, (1997) trabalhando com carne de cordeiro, embalada a vácuo e armazenada a 0°C, durante 42 dias, observaram que a deterioração podia ser atribuída a um alto crescimento de bactérias lácticas, das espécies de *Brochotrix thermosphacta*, espécies de Enterobacterias, quando armazenada a 5°C, além de *Pseudomonas*.

2.7 - Embalagem a vácuo

A principal função de preservação da carne embalada é fornecer proteção contra danos mecânicos, mudanças físicas, químicas e contaminação microbiana (Hedrick, *et al.*, 1994)

A embalagem a vácuo em películas plásticas é uma tecnologia de conservação de alimentos muito importante no momento atual, uma vez que vem crescendo a preferência dos consumidores para produtos com aparência mais “natural” e “fresca”, unido a uma maior comodidade para o seu uso. Isto oferece uma série de vantagens como a facilidade de manejo, limpeza, conservação da cor e uma maior vida de prateleira com relação a qualidade microbiológica. Assim, possibilita a maturação total da carne sem alteração microbiana significativa (ICMSF, 1998). O princípio do método da embalagem a vácuo consiste na eliminação total do ar do interior desta sem que seja empregado outro gás. Nos alimentos metabolicamente ativos embalados a vácuo, como a carne, sua atividade respiratória, provocarão o rápido consumo de O₂ presente nos tecidos, e um aumento do dióxido de carbono e vapor de água. A embalagem a vácuo de um produto metabolicamente ativo produz uma atmosfera modificada (Brody, 1996).

Os cortes de carne maturada, deverão ser obrigatoriamente, embalados sob vácuo, em películas de alta resistência mecânica, impermeáveis a gases e ao vapor d'água, de acordo com a Circular DIPOA nº 053/88, de maio de 1988, que disciplina a produção de cortes maturadas.

A embalagem a vácuo termo-encolhível de PVC (cloreto polivinilideno) tem se mostrado uma grande evolução, além dos aspectos anteriormente citados, ocorre também o fenômeno de autólise enzimática, conhecida como maturação, que contribui para o amaciamento da carne (Bell & Garout, 1994; Lawrie, 1985).

As películas que se empregam para envolver as carnes, evitam

que as mesmas sejam contaminadas por bactérias e afetam o crescimento da microbiota presente na carne antes da embalagem. Estas películas diferem consideravelmente quanto a sua permeabilidade a água, ao oxigênio e ao dióxido de carbono (Frazier & Westhoff, 1993).

Quando a carne é envolvida por uma película, total ou parcialmente permeável à atmosfera, modifica a microbiota da superfície da carne fresca refrigerada, onde normalmente crescem bactérias aeróbias dos gêneros *Achromobacter* e *Pseudomonas*. Dependendo da permeabilidade desta película, tanto a pressão como a composição da atmosfera inicial do interior da embalagem é modificada. Quando o envoltório é impermeável ao oxigênio, o crescimento de bactérias do gênero *Pseudomonas* é superior ao de outras espécies que toleram menores tensões de oxigênio. Entretanto, quando o material é permeável, não há diferenças significativas entre a microbiota da carne embalada e não embalada. Em qualquer circunstância, a pressão parcial de oxigênio necessária ao crescimento de bactérias aeróbias é muito mais baixa do que aquela existente na carne embalada com película impermeável ao oxigênio. Observa-se que a inibição do crescimento de microrganismos aeróbios em tais envoltórios, sejam bactérias, bolores ou leveduras, deve-se ao acúmulo de dióxido de carbono. Ainda que o dióxido de carbono influa na inibição do crescimento de microrganismos psicrófilos, os envoltórios somente contribuem para o retardamento da multiplicação microbiana, quando refrigerados (Pardi. *et al.*, 1995).

A tensão de oxigênio no interior da embalagem, é fator determinante do crescimento microbiano, que serve para caracterizar os que terão condições de crescimento.

Nas condições anaeróbias do vácuo a população microbiana predominante da carne fresca são lactobacilos, que a baixas temperaturas podem superar os seus competidores. A população microbiana ao final da maturação é constituída quase em sua totalidade por estas bactérias. Se

houver oxigênio disponível na embalagem, *Pseudomonas* podem crescer, mas em baixa velocidade, devido a limitada disponibilidade deste gás (Brody, 1996).

A embalagem a vácuo e a armazenagem da carne a baixa temperatura, prolonga a vida de prateleira consideravelmente (Nissen *et al.*, 1996).

Christopher *et al.*, (1980), estudando o efeito da microbiota da carne armazenada sob o vácuo e atmosfera modificada, concluíram que a contagem de bactéria psicrófilas sob atmosfera de CO₂-N₂ era menor quando comparado com o vácuo.

Segundo Sheridan *et al.*, (1997), a combinação da alta concentração de CO₂ e baixa temperatura de armazenagem (0°C) possibilitou redução significativa na contagem total de bactérias. Venugopal, *et al.*, (1993), observaram que a contagem em placa em anaerobiose, da carne embalada a vácuo, pode ser mais precisa do que a contagem em placa aeróbica para estimativa da carga microbiana.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Tomando por base o levantamento bibliográfico realizado, o presente trabalho visa avaliar a microbiota presente na carcaça de animais ovinos, bem como verificar o comportamento da microbiota da carne frente ao tratamento dos cortes com ácidos acético durante um período de acondicionamento de 48 dias, em embalagem a vácuo a temperatura de 1°C.

3.2 – Objetivos específicos

- Verificar a ocorrência de microrganismos deteriorantes e patogênicos na carcaça ovina após resfriamento de 12 horas em câmara de refrigeração a 1°C.
- Verificar o período de vida útil das carnes ovinas submetidas à tratamento de descontaminação com ácido acético 1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 1°C durante 48 dias.
- Determinar a predominância dos microrganismos acima referidos durante o período de armazenagem das carnes a 1°C.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Descrição do experimento

Foram utilizados 5 animais ovinos machos castrados do tipo Sem Raça Definida (SRD), com idade aproximada de 1 ano, peso vivo médio de 35 Kg, criados em regime semi-intensivo, provenientes do interior do estado do Ceará. As operações de abate foram procedidas segundo os métodos recomendados pelo RISPOA (BRASIL,1997a).

As carcaças dos animais foram mantidas em câmaras de refrigeração a 0°C por 12 horas, em seguida foram coletadas amostras da superfície dos seguintes locais: paleta, pescoço, peito, lombo, coxão e parede da cavidade abdominal para as seguintes análises microbiológicas: contagem de bactérias mesófilas, pesquisa de coliformes totais e fecais.

Posteriormente as carcaças foram divididas em cortes comerciais coletando-se as 10 paletas, que foram cortadas em 5 fatias de peso similar, da porção proximal para a porção distal desse corte, perfazendo total de 50 fatias de carne com osso. As 25 fatias das paletas direitas foram submetidas a tratamento de imersão em solução de ácido acético 1% por 1 min. As 25 fatias das paletas esquerdas foram imersas em água potável e constituíram o tratamento controle. Em seguida todas as fatias foram embaladas individualmente a vácuo em filme flexível, impermeável ao oxigênio, identificadas e armazenadas a 1°C, durante 48 dias.

A intervalos de 3, 13, 23, 33 e 48 dias, 5 fatias de cada tratamento, foram avaliados quanto a contagem a bactérias mesófilas, contagem a bactérias psicrófilas, contagem de bolores e leveduras, contagem de clostrídios sulfito-redutores, pesquisa de coliformes totais e fecais e pesquisa de *Salmonella*, conforme metodologia preconizada pelo APHA (1992) e Silva & Junqueira (1995).

Na carne de paleta foi verificado também o pH muscular por ocasião de cada amostragem microbiológica.

4.2- Amostragem das carcaças

A amostragem de cada local da carcaça foi obtida, através de 5 “swabs”, em 5 pontos diferentes com o auxílio de um gabarito de 25 cm² de área, perfazendo um local de 125 cm² por ponto amostrado (Figura 1). Os 5 “swabs” coletados desta forma foram transferidos para um tubo contendo 10 mL de água peptonada. A partir desta suspensão foram efetuadas as diluições para os ensaios. As contagens de bactérias foram expressas como UFC/cm² e para pesquisa de coliformes totais e fecais como NMP/cm².

Figura 1 – Amostragem da carcaça ovina com um gabarito de 25 cm² de área

4.3 – Amostragem da carne de paleta

Nos períodos anteriormente descritos foram retiradas do armazenamento a 1°C, 5 amostras de paleta tratadas com ácido e 5 amostras não tratadas. Após desinfecção das embalagens de nylon/polietileno com etanol 70%, foi retirada assepticamente, uma amostra de 25g de carne, transferida para saco plástico estéril, contendo 225 mL de água peptonada 0,1% estéril, e homogeneizada por 1 a 2 minutos. Para a preparação da segunda diluição (10⁻²), foi transferido assepticamente 1,0 mL da diluição 10⁻¹ para 9,0 mL de solução peptonada 0,1%. As diluições subsequentes, até 10⁻⁶ foram obtidas de maneira similar.

4.4 - Análises microbiológicas.

4.4.1 - Contagem de bactérias mesófilas.

A partir das diluições previamente preparadas, foram inoculadas em duplicada, assepticamente, 1,0 mL de cada diluição em placa de Petri . Nas placas inoculadas foram vertidos 15 a 20 mL de Ágar Padrão para Contagem, previamente fundido e resfriado a 45 °C. Após homogeneização e solidificação, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Após este período, as placas foram selecionadas e contadas. Sendo calculado o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de carne (APHA, 1992).

4.4.2 - Contagem de bactérias psicrófilas.

Seguindo-se a metodologia descrita no item anterior as placas para esta determinação foram invertidas e incubadas a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 dias Após este período, as placas foram selecionadas e contadas. Sendo calculado o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de carne (APHA, 1992).

4.3 - Contagem de bolores e leveduras

Das diluições previamente preparadas foi transferido, assepticamente, 1,0mL de cada diluição para placa de Petri. Sobre as placas inoculadas foram vertidos, 15 a 20mL de Ágar Batata Dextrose acidificado com ácido tartárico 10%, pH 3.5. Após homogeneização e solidificação as placas foram incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 3 a 5 dias. O resultado foi expresso em UFC/g carne (APHA, 1992).

4.4.4 - Pesquisa de coliformes totais

Foi inoculado 1 mL numa série de três tubos, contendo 10 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose. Os tubos de foram incubados a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24/48 horas e observados quanto a produção de gás. Após leitura do NMP presuntivo foi transferida uma alçada de cada cultura para tubos de Caldo Bile Verde Brilhante. Os tubos foram incubados a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 2

horas e observado se houve crescimento com produção de gás. Foi anotado o número de tubos de Bile Verde Brilhante com gás, confirmativo da presença de coliformes totais e foi determinado o Número Mais Provável (NMP)/g (APHA, 1992).

4.4.5 - Pesquisa de coliformes fecais

Dos tubos de Caldo Lauril Sulfato Tryptose com produção de gás foi transferida uma alçada de cada cultura, para tubos de caldo *E. coli*. Os tubos foram incubados em banho-maria a $45,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas e observado se houve crescimento com produção de gás. Foi procedida anotação do número de tubos de caldo *E. coli* com produção de gás, confirmativo da presença de coliformes fecais e, posteriormente, foi determinado o NMP/g (APHA, 1992).

4.4.6- Pesquisa de *Salmonella*

Foram transferidas, assepticamente, 25 g de carne para um frasco de homogeneização, previamente esterilizado e tarado. Foram adicionados 225 mL de caldo Lactosado e procedida homogeneização da amostra. Os frascos foram incubados a 37°C por 18 a 24 horas. Posteriormente, o frasco foi agitado. Em seguida foi transferido 1,0 mL para 10 mL de Caldo Tetrionato e 1,0 mL para 10 mL de Caldo Selenito Cistina. Ambos os caldos foram incubados a 37°C por 18 - 24 horas. Após incubação os tubos de enriquecimento seletivo foram agitados e destes foram feitas estrias, com uma alçada contendo o caldo Tetrionato em placas de Ágar *Salmonella Shigella*, Ágar Bismuto Sulfito, Ágar Manitol Lisina Cristal Violeta Verde Brilhante e Ágar Verde Brilhante. Esse procedimento foi repetido com o caldo Selenito Cistina. As placas invertidas foram incubadas a 37°C por 18 - 24 horas e em seguida foi verificado se houve desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella*. Estas colônias foram transferidas com o auxílio de uma agulha de inoculação, para tubos inclinados de Ágar Triptona de Soja, e incubadas a 37°C por 24 horas. Ao

término desse tempo foram inoculadas em Ágar Lisina Ferro e Ágar Tríplice Açúcar Ferro. A inoculação foi feita por picada e estrias na rampa, utilizando-se a mesma alçada para inocular ambos os tubos. Todas as culturas típicas em Ágar Lisina Ferro e Ágar Tríplice Açúcar Ferro, foram confirmadas através de testes bioquímicos e sorológicos, realizados a partir da cultura em Ágar Triptona de Soja. Na série de testes bioquímicos foi feito urease, fermentação do dulcitol, indol, malonato, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato de Simmons (APHA, 1992).

O teste sorológico foi utilizado com soro Polivalentes anti-*Salmonella* (PROBAC DO BRASIL). Através da técnica de aglutinação em lâmina, a partir de uma cultura crescida por 24 horas, segundo Edwards & Ewing, 1972

4.4.7 - Contagem de clostrídios sulfito-redutores.

A partir das diluições previamente preparadas foi inoculadas 1mL, em placas de Ágar Triptona Sulfito Cicloserina, plaqueando em profundidade. Posteriormente foi aguardado que as placas secassem e então foram cobertas com uma sobrecamada de Ágar Triptona Sulfito Cicloserina. Foi aguardada a completa solidificação da sobrecamada e as placas foram incubadas, sem inverter, a 46 °C por 18 - 24 horas, em atmosfera anaeróbica. Para obtenção da atmosfera anaeróbica, foi utilizado o sistema gerador de anaerobiose. Foi procedida seleção das placas com 20 a 200 colônias e foram contadas as colônias pretas, típicas de clostrídios sulfito-redutores em Ágar Triptona Sulfito Cicloserina. Para o teste de confirmação foram selecionadas várias colônias típicas e transferidas para tubos de Caldo Infusão Cérebro Coração, previamente desaerados. Para a desaeração do meio, os tubos foram submetidos à fervura em banho, por 15 minutos, com as tampas afrouxadas, e em seguida resfriados imediatamente em banho de gelo. Os tubos inoculados foram incubados a 35 °C por 24 horas. Em seguida foi preparado um esfregaço da cultura para coloração de Gram e o caldo remanescente foi utilizado para o teste de

catalase. Foram consideradas como confirmadas todas as culturas de bastonetes Gram positivos, catalase negativos. Procedeu-se o cálculo do número de UFC/g em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas (Silva & Junqueira, 1995).

4.5 – Medição do pH nas amostras de carne

O pH das fatias de carne foi medido na porção muscular do corte pela inserção do eletrodo na incisão feita com o bisturi, segundo O'halloran *et al.*, (1997) utilizando um medidor digital de pH (HANNA INSTRUMENTS, modelo 8417, Singapore).

4.6 – Análise Estatística

Na análise da superfície da carcaça foi utilizado o modelo estatístico em blocos aleatorizados (Montgomery, 1991).

Os dados referentes à análise microbiológica (Tabelas A10 a A17 do anexo) foram transformados em logarítmicos da base 10 para realização da análise estatística.

Para verificar o efeito do ácido acético 1% sobre as carnes ao longo do tempo de maturação utilizou-se a técnica de dados longitudinais, descrita em Singer & Andrade (1986), onde as possíveis correlações entre as observações de uma mesma unidade amostral são consideradas.

Para as comparações múltiplas entre as médias da contagem de bactérias aeróbicas mesófilas, contagem padrão de bolores e leveduras, pesquisa de coliformes totais, pesquisa de coliformes fecais e pH, foi utilizado o teste de Tukey ao nível de 5% de significância (Gomes, 1982). Para a contagem padrão em placa de bactérias psicrófilas aeróbicas ou

anaeróbica facultativa foram utilizadas contrastes ortogonais, devido a ausência de parcelas dos tratamentos (Montgomery, 1991).

Para análise dos dados relativos à pesquisa de coliformes totais e fecais, nos cortes tratados e não tratados os valores indicados como <3 (Tabelas A16 e A17), adotou-se o valor 3.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização Microbiológica da Carcaça Ovina.

As médias das determinações de bactérias mesófilas (log UFC/cm²), coliformes totais e fecais (log NMP/cm²) são apresentados na Tabela 1.

De acordo com a análise de variância da contagem total de bactérias mesófilas (Tabela A1), coliformes totais (Tabela A2) e coliformes fecais (Tabela A3), não houve diferença significativa ($P > 0,05$), entre os diferentes locais analisados na superfície da carcaça ovina (coxão, parede abdominal interna, lombo, peito, paleta e pescoço).

Com relação à contagem de bactérias mesófilas, que comumente é empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos e estimar a vida útil da carne, os valores encontrados variaram de 1,69 na parede abdominal interna a 2,12 na paleta, com média de 1,92 logUFC/cm² (Tabela 1).

Segundo Franco & Landgraf (1999) a deterioração dos alimentos causada pelo crescimento de microrganismos só é detectável pelas alterações organolépticas, quando as contagens deste tipo de bactérias são superiores a 10⁶ UFC/g do alimento.

De acordo com Silva, (1999a) o valor médio para a contagem de bactérias mesófilas em carcaças de bovinos é de 1,96 logUFC/cm², valor similar a média encontrada neste trabalho, que foi de 1,92 logUFC/cm², confirmando que o abate realizado de acordo com o RIISPOA (BRASIL, 1997a) produz carcaças com boas condições higiênicas.

De acordo com Roça & Serrano, (1995), após o término das operações de abate, as carcaças bovinas podem apresentar o seguinte padrão de contagem: 3,0 a 5,0 logUFC/cm² de aeróbios mesófilos, 2,0 logUFC/cm² de psicrotróficos e menos que 1,0 logUFC/cm² de *Enterobacteriaceae*, valores maiores quando comparados com os encontrados neste estudo na análise de mesófilos da superfície da carcaça de ovinos (Tabela 1).

No que se refere a pesquisa de coliformes totais, os valores encontrados variaram de zero na paleta a 1,14 no coxão, com média de 0,47 logUFC/cm² (Tabela 1). O grupo coliforme total, é indicador higiênico, sendo sua presença indicadora de contaminação ambiental excessiva e de microrganismo não relacionados diretamente com a saúde do homem (Silva, 1999c).

Com relação aos coliformes fecais os valores encontrados variam de zero na paleta a 1,01 no coxão, com uma média de 0,30 logUFC/cm² (Tabela 1).

No presente estudo foi observado um maior nível de contaminação no coxão, sugerindo que a proximidade deste corte a região anal, pode ter sido a causa da contaminação. Observação esta, de acordo com ICMSF (1998) em que as fezes do animal podem contaminar a carcaça, durante as operações de abate.

Como a análise de variância não mostrou diferenças significativas na contagem de bactérias da parede abdominal interna em relação à superfície externa dos outros locais da carcaça analisados, pode-se inferir que não houve perfurações no trato gastrointestinal no momento do abate. Assim, a evisceração conduzida segundo as técnicas padronizadas, neste estudo contribuiu para minimizar a contaminação da carcaça.

De acordo com Roça & Serrano (1995), as fontes de contaminação da carne são microrganismos da pele, microrganismos do trato gastrointestinal e o ar atmosférico. As baixas contagens de bactérias obtidas na superfície das carcaças neste estudo após 12 horas de armazenamento frigorífico (Tabela 1) sugere que a contaminação através do ar não foi significativa.

5.2– Evolução da microbiota da carne ovina durante o armazenamento.

Os resultados de contagem padrão em placa de bactérias mesófilas (logUFC/g) na carne de paleta ovina tratada com ácido acético 1% e não tratada (controle), estocada a 1°C por 48 dias, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Médias da contagem padrão em placas de bactérias mesófilas aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (logUFC/g), na carne paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenada 1°C, por 48 dias.

A avaliação estatística (Tabela A4) evidenciou uma interação significativa ($P>0,05$) entre tratamento e tempo de maturação para contagem padrão em placas de bactéria mesófilas (logUFC/g).

Com 3 dias de armazenagem a contagem de bactérias mesófilas não apresentou diferença significativa ($P>0,05$), entre as carnes tratadas e não tratadas (Tabela 2). Comportamento similar foi encontrado por outros pesquisadores (Kotula & Thelappurate, 1994; Goddard, *et al.*, 1996) ao estudarem a microbiota da carne bovina tratada com ácidos orgânicos, no primeiro dia de estocagem.

Com 13 e 23 dias de armazenamento, observou-se uma redução significativa na contagem de bactérias mesófilas, nas amostras tratadas em relação às não tratadas. Esta redução foi de 2 ciclos logarítmicos aos 13 dias (Figura 2), e de 3 ciclos logarítmicos com 23 dias (Figura 2).

Figura 2 - Contagem padrão em placa de bactérias mesófilas aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (logUFC/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não a tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.

No tempo de armazenamento de 33 e 48 dias, foi verificado um aumento da microbiota mesófila tanto para amostra tratada quanto para o controle, não tendo sido observado diferença significativa entre as mesmas (Tabela 2).

Os dados obtidos mostram que o efeito do ácido acético 1% foi eficiente na redução da microbiota mesófila, somente até os 23 dias de armazenamento e que este efeito diminui a partir deste período.

Vários pesquisadores (Kotula & Thelappurate 1994; Kim *et al.*, 1999; Goddard *et al.*, 1996; Fu *et al.*, 1994), verificaram uma redução da microbiota presente em carne, por um certo período de tempo, quando as mesmas foram tratadas com ácidos orgânicos, sendo evidenciado que o efeito inibitório do ácido decresce com o tempo de estocagem.

Goddard *et al.*, (1996) atomizando uma solução ácido acético 2% e ácido láctico 2%, em lombo bovino, embalado a vácuo e armazenado a – 1°C por 112 dias, observaram que aos 14 dias a população bactérias mesófilas foi reduzido em 1 ciclo logarítmicos, como observado neste estudo do dia 13 ao dia 23 de armazenamento (Figura 2).

Segundo Bourgeois *et al.*, (1994), o poder conservante do ácido acético, é mais efetivo quando associado a outros métodos de preservação,

tais como a pasteurização, refrigeração e a utilização de outros aditivos.

Xavier & Beraquet, (2000), constataram que amostras de carne de frango, armazenadas sob refrigeração, tratadas com ácido e embaladas a vácuo, apresentaram um aumento de 6 a 10 dias na sua vida de prateleira, quando comparadas com as amostras na mesma condição e não submetidas ao tratamento com ácido.

Fu *et al.*, (1994), estudando a qualidade microbiológica do lombo de porco, pulverizado com 1,5% de ácido acético, cítrico e ácido láctico, embalado à vácuo e armazenado a 0 – 2 °C por 42 dias, verificaram que o ácido acético e cítrico mostraram inicialmente um decréscimo na contagem padrão em placa. Este efeito, porém não continuou depois de 14 dias de estocagem da amostra embalada a vácuo. Segundo os mesmos autores depois de 42 dias, a contagem padrão em placas no lombo suíno foi superior a 6 ciclos logarítmicos, condição considerada inaceitável na carne. Neste estudo contagens acima de 6 ciclos logarítmicos somente foram encontrado com 48 dias de armazenamento (Figura 2).

Sheridan, *et al.*, (1997), estudando a vida de prateleira da carne de cordeiro, experimentalmente contaminada com bactérias, embalada a vácuo e armazenada por 42 dias a 0°C, verificaram que a deterioração podia ser atribuída ao elevado crescimento das bactérias lácticas, *Brochothrix thermosphacta* e *Enterobacteriaceae*.

Os ânions de alguns ácidos fracos, como o ácido acético são metabolizados dentro das células bacterianas. Quando o H⁺ é liberado acidifica o interior da célula para níveis inibitórios do crescimento bacteriano. Entretanto algumas células microbianas podem possuir eficientes métodos para estabilizar o seu pH interno (ICMSF, 1980). Neste estudo, com 33 e 48 dias de armazenamento, bactérias que tenham mecanismos para estabilizar o seu pH interno, podem ter sido predominantes, através de um processo de

seleção natural, sob as condições em que foram submetidas.

Os valores médios para a contagem padrão das bactérias psicrófilas (logUFC/g) na carne da paleta ovina, tratada com ácido acético 1% e não tratada (controle), estocada a 1°C por 48 dias, estão apresentados na Tabela 3.

A avaliação estatística (Tabela A5) evidenciam uma interação significativa ($P < 0,05$) entre tratamento e tempo de maturação para contagem padrão de bactérias psicrófilas.

Tabela 3 - Médias da contagem padrão em placas de bactérias psicrófilas aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (logUFC/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.

Nos dias 3 e 13 de armazenamento observou-se uma redução de 2 e 2,6 ciclos logarítmicos, respectivamente, na microbiota de bactérias psicrófilas (Figura 3). Entretanto nos dias 23, 33 e 48 de estocagem, não foi verificado diferença significava ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 3).

Vários procedimentos para reduzir o crescimento microbiano da carne são freqüentemente combinados. A estocagem da carne fresca a temperatura de refrigeração possibilita a garantia da não deterioração da mesma, somente por um limitado período de tempo. Entretanto a estocagem da carne refrigerada, embalada a vácuo com filme de baixa permeabilidade a gases, pode estender o prazo da vida de prateleira (ICMSF, 1998)

Figura 3 - Contagem padrão em placa de bactérias psicrófilas aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (logUFC/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.

Neste estudo, as amostras tratadas e não tratadas, mostraram diferença significativa com 3 e 13 dias de estocagem (Tabela 3). Vários pesquisadores (Silva & Beraquet, 1997; Silva, 1999b, Goddard *et al.*, 1996) trabalhando com sanitização de ácidos orgânicos, em carne bovina, observaram que em média nos primeiros dois dias de estocagem a

contagem de bactérias psicrófilas foi similar às amostras não tratadas.

Contudo os resultados deste estudo (Figura 3), estão de acordo com outros pesquisadores (Silva & Beraquet, 1997; Dickson & Siragusa, 1994), que em média de 15 dias de estocagem, não observaram mais o efeito do tratamento do ácido.

Neste estudo, com 23 dias de armazenamento ocorreu um aumento da carga microbiana psicrófila da amostra tratada. Este comportamento pode ser visualizado na Figura 3. Pode-se sugerir que o aumento no número de microrganismos viáveis na amostra submetida ao tratamento, possa ser atribuída a processos tais como, competição ou depleção de nutrientes entre microrganismos (ICMSF, 1980). Segundo Silva & Beraquet (1997), este aumento no número de microrganismo psicrófilos viáveis na carne submetida aos tratamentos pode ser atribuída a perda da eficiência dos ácidos utilizados na sanitização.

A deterioração da carne mantida sob refrigeração e causada pelo crescimento de bactérias capazes de crescer nesta temperatura, incluindo aqueles capazes de produzir limosidade superficial e alterações na cor (Franco & Landgraf, 1999). Na microbiota deteriorante de carnes refrigeradas predomina os psicrófilos, tais como os *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* e *Psychrobacter immobilis*. Dentre estas as *Pseudomonas* normalmente, compreende mais do que 50% da microbiota deteriorante com as seguintes espécies mais importantes *Pseudomonas fragi*, *Ps. lundensis* e *Ps. fluorescens*. *Brochothrix thermosphacta* e *Enterobacteriaceae* psicrófilos usualmente são formas de deterioração em menor proporção (ICMSF, 1998).

Segundo Silva (1999) estudando o efeito da sanitização da carne

bovina com ácidos orgânicos, relatou que a contagem de bactérias psicrófilas que indicam deterioração microbiana da carne bovina, é estipulada entre 10^6 e 10^8 UFC/cm².

No presente estudo a ação na carne ovina do ácido acético 1%, para redução de bactérias mesófilas foi verificado até os 23 dias de estocagem desta. Enquanto que com relação a bactérias psicrófilas esta redução foi observada somente até os 13 dias de armazenamento. Daí observar-se que sob condições de refrigeração as bactérias mesófilas não crescerá e sim as psicrotróficas que tem capacidade de crescer a esta temperatura e causara a deterioração nas carnes (ICMSF, 1998).

Na Tabela 4 encontram-se os resultados da contagem padrão em placas de bolores e leveduras (logUFC/g) das amostras tratadas e não (controle) com ácido acético 1% e estocadas a 1°C por 48 dias.

A análise de variância desta contagem se encontram no Anexo (Tabela A6) e indicam que não houve interação significativa ($P>0,05$) entre tempo de maturação e tratamento

Tabela 4 - Médias da contagem padrão em placas de bolores e leveduras (\log_{10} UFC/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.

As amostras tratadas com ácidos apresentaram uma redução em bolores e leveduras ($P> 0,05$) de 0,5 ciclos logarítmico da microbiota em relação as amostras não tratadas, independente do tempo de estocagem (Tabela 1). O valor médio da contagem de bolores e leveduras das amostras

tratadas foi sempre menor do que a não tratada (Figura 4).

Figura 4 - Contagem padrão em placa de bolores e leveduras (logUFC/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não a tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.

Embora os bolores e leveduras sejam usualmente tolerantes aos ácidos existem alguns, que são resistentes. A habilidade de crescimento dos microrganismos a pH baixo depende da eficiência da célula para transportar os ácidos para fora da mesma, evitando deste modo a acidificação no interior da célula. Para que este transporte se realize é necessário energia, como por exemplo no caso do *Saccharomyces bocillii*, requer uma concentração suficiente de glicose. Desta forma as células com baixa reserva de energia são mais sensíveis aos ácidos orgânicos do que as células com energia suficiente (ICMSF, 1980).

No presente estudo pode-se sugerir que o crescimento observado para bolores e leveduras, se refere ao crescimento de leveduras, devido ao fato dos bolores ser aeróbicos estritos e as carnes serem acondicionadas em embalagem a vácuo (Frazier & Westhoff, 1993).

Com relação ao tempo de maturação, a contagem de bolores e leveduras apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre os diferentes dias de estocagem independente do tratamento aplicado (Tabela 4).

No dia 13, o valor médio da contagem de bolores e leveduras na carne ovina foi menor ($P < 0,05$) do que nos dias 33 e 48 (Tabela 4).

Silva & Beraquet (1997) trabalhando com ácidos orgânicos na sanitização da carne bovina, observaram uma sensível redução nos dias 7 e 9 na contagem de bolores e leveduras (logUFC/cm²) nas amostras tratadas, comportamento similar ao encontrado neste estudo no dia 13 (Figura 4) .

Os resultados da pesquisa de coliformes totais (logNMP/g), na carne da paleta ovina tratada e não tratada (controle) com ácido acético 1%, armazenada a 1°C por 48 dias, encontram-se na Tabela 5. A análise de variância destes dados encontra-se no Anexo (Tabela A 7).

Tabela 5 - Médias dos valores da pesquisa de coliformes totais (logNMP/g), na carne da paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenagem a 1°C, por 48 dias.

Para a análise da pesquisa de coliforme total, observou-se interação significativa ($P < 0,05$) entre o tratamento com ácido acético 1% e o tempo de maturação (Tabela A7).

As amostras tratadas com ácido acético 1% apresentaram contagens significativamente ($P < 0,05$) menores que as não tratadas no dia 3. Nos tempos 23,33 e 48 dias apesar do valor médio ser sempre inferior na amostra tratada, não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) (Tabela 5).

A redução observada no dia 3 foi de 1 ciclo logarítmico, (Figura 5). Almeida, *et al.*, (1993), reportaram que a vida de prateleira da carcaça de cordeiro pode ser estendida de uma para quatro semanas, quando tratada com solução diluída de ácido acético antes da embalagem a vácuo e que a redução do número de bactérias aeróbicas e coliformes poderia ser de 1,3 e 2,0 ciclos logarítmicos, respectivamente.

Figura 5 - Pesquisa de coliformes totais (logNMP/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.

A ação do ácido acético, da temperatura de armazenagem e da embalagem a vácuo, tem efeito sobre a microbiota da carne, assim Frederick, *et al.*, (1994), observaram o efeito do ácido acético e da temperatura sobre a microbiota da superfície da carne suína e verificaram que os coliformes totais na amostra tratada com ácido acético era menor que no controle, independente da temperatura.

Nissen *et al.*, (1996), estudando o efeito do vácuo, da atmosfera modificada e da temperatura de estocagem, sobre a microbiota da carne embalada, concluíram que o número de coliformes totais era menor nas amostras tratadas sem observar aumento destes microrganismos em nenhuma condição de armazenamento.

Na amostra controle (não tratada com ácido acético) observou-se uma redução na estimativa de coliformes totais no período de 13 a 48 dias de estocagem, em relação ao 3º dia, embora tenham ocorrido variações entre esses períodos.

Embora o grupo coliformes pertençam ao gênero de bactérias que crescem a temperaturas de refrigeração e sejam aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, a embalagem a vácuo e o armazenamento sob refrigeração foram efetivos no seu controle.

Na pesquisa de coliformes fecais, os valores médios da carne de

paleta ovina tratada com ácido acético 1% ou não (controle), submetido a temperatura de 1°C por 48 dias, são apresentados na Tabela 6.

Os resultados da análise de variância destas contagens encontram-se no Anexo (Tabela A8) e indicam que não houve interação significativa ($P>0,05$) entre tempo de armazenamento e tratamento.

Tabela 6 - Médias dos valores da pesquisa de coliformes fecais (logNMP/g), na carne de paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.

Foi verificada uma redução significativa ($P < 0,05$) nas amostras tratadas com ácido acético 1% em relação às amostras não tratadas (Tabela 6) independente do tempo de maturação. O tratamento com ácido também apresentou menor média em relação a amostra não tratada, no tempo 3 e nos demais tempos os valores médios foram próximos chegando a ser iguais com 23 dias (Figura 6).

Figura 6 - Pesquisa de coliformes fecais (logNMP/g), na carne da paleta ovina, submetida ou não tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.

Fu, *et al.*, (1994), encontraram uma contagem menor do que 2 ciclos logarítmicos para coliformes fecais, trabalhando com carne suína, tratada com ácidos acético, cítrico e láctico, embalada a vácuo e armazenada a 0-2°C por 42 dias e verificaram ainda que somente o ácido acético se mostrou eficiente inibindo os coliformes fecais no dia zero de estocagem. Entretanto Podolak, *et al.*, (1995) observaram o efeito da sanitização com ácidos fumáricos, acéticos e láctico da carne bovina inoculada com *E.coli* O157:H7, embalada a vácuo e armazenada a 4°C por 14 dias, observaram que embora todos os ácidos exibissem atividade antimicrobiana, o ácido fumárico era o mais eficiente e teve maior efeito residual.

Kotula & Thelappurate (1994), estudando o efeito do tratamento de 0,6 e 1,2% de ácido acético, em corte de carne bovina, embalada a vácuo, armazenada a 1°C, experimentalmente contaminada com *E.coli*, verificaram que a ação inibitória aumenta com a concentração do ácido acético.

Puga, *et al.*, (1999), avaliando o efeito do amaciamento da carne bovina embalada a vácuo, observaram que o número de coliformes fecais variam de 4,00 UFC/g e <3,0 UFC/g para amostras submetidas a maturação por 9 e 14 dias, respectivamente.

Todavia Dickson & Siragusa (1994), estudando o efeito do ácido

lático e acético na sanitização da carne bovina, inoculada com *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*, verificaram o aumento na redução dos microrganismos e foi atribuído ao efeito combinado do ácido e condições de estocagem.

Na contagem de bactérias sulfito-redutoras não foi evidenciado crescimento em todas as amostras, independente do tratamento com ácido e dos tempos de maturação.

Na pesquisa de *Salmonella*, obteve-se resultados positivos (Tabela 7) nos dias 3, 13 e 23 de armazenamento, tanto para as amostras tratadas ou não com ácido acético 1%.

Tabela 7 – Pesquisa de *Salmonella* na carne de paleta ovina, submetida ou não a tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C por 48 dias.

Pode-se sugerir que a ausência de *Salmonella* (Figura 7) observada aos 33 e 48 dias de estocagem, possa ser devido ao fato desta bactéria não competir bem com *E.coli*, bactérias deteriorativas e ácido-láctico (Pinto, 2000).

Frederick, *et al.*, (1994), observaram que o gênero *Salmonella* não era completamente eliminado da carne suína, quando as amostras eram tratadas com ácido acético. Entretanto Dickson (1992), trabalhando com carne bovina magra e gorda, artificialmente contaminada com *Salmonella typhimurium* e posteriormente sanitizada com ácido acético 2%, observou que a redução da população bacteriana nas amostras tratadas se devia ao efeito deste ácido independente da população inicial de células.

Podalak *et al.*, (1995), estudando o efeito do tratamento com 1% de ácido fumárico e 1% de ácido acético na redução de *Salmonella typhimurium* inoculada experimentalmente, em carne bovina, embalada a vácuo e acondicionada a 4°C por 14 dias, observaram que depois de 14 dias de estocagem, a redução da população de *Salmonella typhimurium* era maior do que 7 dias, para ambos os ácidos.

Figura 7- Pesquisa de *Salmonella* na carne de paleta ovina, submetida ou não a tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.

A faixa do valor médio do pH da carne encontrado neste estudo foi de 6,05 a 6,47 (Tabela 8). Pinto (2000) reporta que *Salmonellas* crescem numa faixa de pH de 4,5 a 9,0, tendo um pH ótimo de 6,5 a 7,5.

Os valores médios da análise do pH, da carne da paleta ovina, submetidas ou não a tratamento com ácido acético 1%, armazenada 1°C por 48 dias, encontram-se Tabela 8.

A análise de variância destes dados são mostrados no Anexo (Tabela A9), não tendo sido observada interação tratamento e tempo de maturação.

Tabela 8 - Médias dos valores de pH na carne da paleta ovina, submetida ou não ao tratamento com ácido acético 1% e armazenagem a 1°C, por 48 dias.

Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) no valor médio de pH das amostras tratadas e não tratadas, independente do tempo de maturação. Segundo Silva & Beraquet (1997) o efeito tamponante da proteína muscular tende a neutralizar os ácidos e ressalta ainda que durante armazenamento prolongado, reações autolíticas ocasionam a formação de compostos básicos que aumentam o pH e também a ação proteolítica das bactérias deterioradoras provocam mesmo efeito.

Os valores de pH encontrados neste trabalho tiveram pouca variação quando comparados às amostras com ou sem tratamento com ácidos (Figura 8). Contudo a análise estatística (Anexo Tabela A9) indicou valores de pH significativamente ($P < 0,05$) maiores nos tempos 13 e 48 e em relação aos tempos 3, 23 e 33 de armazenamento das carnes (Tabela 8).

Figura 8 - Médias dos valores de pH, na carne de paleta ovina, submetida ou não a tratamento com ácido acético 1% e armazenada a 1°C, por 48 dias.

Silva & Beraquet (1998b), reportaram que o ácido acético provoca uma pequena e temporária redução no pH da carne, o que é considerado importante na sua atividade antimicrobiana, relatada por vários autores.

Segundo ICMSF (1998), reporta que a carne ovina e suína, embalada à vácuo pode ter um pH maior quando comparada com a carne bovina embalada à vácuo. Ressalta ainda que o líquido proveniente da carne acumulado em carne de ovina embalada à vácuo tem um pH acima de 6.0.

Silva & Beraquet (1997), estudando o efeito da sanitização com ácido orgânico, na redução da contaminação inicial de carne bovina, observaram que imediatamente após a aspersão das soluções, o pH superficial dos músculos foi reduzido significativamente, situando-se na faixa de 4,0 a 4,2; contudo após um dia de armazenagem, já não se observou diferença significativa ($P > 0,05$) nos valores de pH da superfície dos músculos submetidos aos tratamentos e de controle. Silva (1999a) trabalhando com sanitização de carne bovina com mistura de ácidos orgânicos, verificou que os valores de pH foram baixos logo depois dos tratamentos, e atingiram valores maiores praticamente constantes e iguais aos observados no controle, até o 9º dia de armazenamento. No 10º dia, os valores de pH foram um pouco mais elevados, em todos os músculos, mas sem apresentarem diferenças significativas ($P > 0,05$).

Milani *et al.*, (1996), trabalhando com filme comestível e ácido acético 2% na conservação de carcaça de frango resfriado, verificaram que quando o ácido acético foi usado isoladamente o efeito antimicrobiano não foi pronunciado, e isto pode ser explicado pelo pH da carne, que após o 9º dia de armazenamento estava superior a 5,8.

6. CONCLUSÕES

O abate de animais ovinos realizados de acordo com o Regulamento de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal permite obter carcaças com níveis aceitáveis de microrganismos na superfície.

O tratamento de ácido acético 1%, combinado com o efeito do vácuo e da temperatura de armazenamento tem os seguintes efeitos sobre a microbiota da carne ovina:

- Ocorre um controle do crescimento de bactérias mesófilas e psicrófilas até os 23 e 13 dias de maturação, respectivamente.
- Mantém o controle do crescimento de coliformes totais e fecais durante os 48 dias de maturação.
- Manter baixa a contagem de bolores e leveduras por 23 dias.

As condições de maturação da carne empregadas nesse estudo inibem o crescimento de *Salmonella* após 33 dias de armazenamento.

O tratamento com ácido acético 1% e as condições de armazenamento usadas não afetam o pH da carne.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, P. F., SILVA, E. N., ALMEIDA, R. C. C. Contaminação e disseminação de carcaça de frangos em abatedouros. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.7, n.27, p.12-17, ago. 1993.
- ANDERSON, M. D. R. P. Microbiologia alimentaria: Reteción de bactérias com significado higiênico-sanitário. AGISA: Madrid, 1989. 440p.
- ANDERSON, M. E. Efficacies of acetic, lactic and two mixed acids in reducing numbers of bacteria on surfaces of lean meat. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v.12, p.139-147, 1992.
- ANDERSON, M. E., MARSHALL, R. T. Reducing microbial populations on beef tissues: concentration and temperature, of an acid mixture. **Journal of food Science**, Chicago, v.55, n.4, p.903-905, july./aug. 1990.
- APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 30th. ed. Marvini: Washington, D.C. 1992. 1208p.
- BELL, R.G., GAROUT, A. M. The effective product life of vacuum-packaged beef imported into Saudi Arabia by sea, as assessed by chemical, microbiological and organoleptic criteria. **Meat Science**, Oxfoford, UK, v.36, p.381-396. 1994.
- BOEHM, M. L., KENDALL, T. L., THOMPSON, V. F. et al. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. **Journal Animal Science**, Savoy, IL, v.76, p.2415-2434. 1998.
- BOURGEOIS, C. M., MESCLE, J. F., ZUCCA, J. **Microbiologia alimentaria**. Zaragoza (España): Acribia, S. A., 1994. V.I: Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidada alimentaria. 437p.

BOYER-BERRI, C., GREASER, M. L. Effect of *postmortem* storage on the z-line region of titin bovine muscle. **Journal Animal Science**, Savoy, IL, v.76, n.4, p.1034-1044, apr. 1998.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Portaria nº 494 de 14 de agosto de 1996. Estabelece que os diferentes estágios de evolução do parque industrial de carnes e produtos derivados, conferindo padrões tecnológicos assimétricos, o requerimento da concessão de um prazo maior para as devidas adequações. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Brasília, nº 158, p. 155548, 15 ago. 1996, Seção 1.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Ministério da Agricultura, Brasília, 1997a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA nº 451 de 19 de setembro de 1997. Princípio gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Brasília, n.182, p.21005-21012, 22 de set. 1997b. Seção 1.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 389, de 5 de agosto de 1999. Estabelece o Regulamento técnico sobre aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções. **Diário oficial [da República Federativa do Brasil]**. Brasília, nº 151-E, p. 68, 9 de ago. 1999, Seção 1.

BRODY, A. L. **Envasado de Alimentos em Atmosferas Controladas, modificadas e a vacío**. Zaragoza: Acribia, 1996.

CHRISTOPHER, F. M., CARPENTER, Z. L., DILL, C. W. et al. Microbiology of beef, pork and lamb stored in vacuum or modified gas atmospheres.

Journal of food protection, Des Moines, Iowa, v.43, n.4, p.259-264, 1980.

CONSIDINE, D. M., CONSIDINE, G. D. (Eds.). **Foods and food production encyclopaedia**. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1982. 2305p.

DELMORE, G. L. R., SOFOS, J. N., SCHMITDT, G. R. et al. Decontamination of inoculated beef with sequential spraying treatments. **Journal of Food Science**, Chicago, v.63, n.5, p.890– 893, set./out. 1998.

DICKSON, J. S. Acetic Acid Action on Beef Tissue Surface Contaminated with *Salmonella typhimurium*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, n.2, p.297-301. 1992.

DICKSON, J. S., SIRAGUSA, G. R. Survival of *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* 0157: H7 and *Listeria monocytogenes* during storage on beef sanitized with organic acids. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v.14, p.313-327, 1994.

DICKENS, J. A., WHITTEMORE, A. D. The effect of acetic acid and air infection appearance, moisture pick-up, microbiological quality, and *Salmonella* incidence on processed poultry carcasses. **Poultry Science**, Savoy-IL, v.73, n.4, p.582-586, apr. 1994.

EDWARDS, P. R., EWING, W. H. Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, 1972

EMBRAPA. **Produção de Carne Ovina**: planejamento para o mercado. Sobral (CE), CNPQ, 1997. (Folder).

FLORETINO, E. R., LEITE JR., A. F., SA, S. N. et al. Avaliação da qualidade

microbiológica de carne moída comercializada em Campina Grande, PB. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, nº47, p.38-41, jan./fev. 1997.

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. ed. Atheneu: São Paulo, 1999. 182p.

FRAZIER, W. C., WESTHOFF, D. C. **Microbiología de los alimentos**. 4.ed. Zaragoza, Espanha: Acribia, 1993. 681p.

FREDERICK, T. L., MILLER, M. F., THOMPSON, L. D., et al. Microbiological Properties of Pork Cheek Meat as Affected by Acetic Acid and Temperature. **Journal of Food Science**, Chicago, v.59, n.2, p.300-302, mar./abr. 1994.

FU, A. H., SEBRANEK, J. G., MURRANO, E. A. Microbial and Quality Characteristics of Pork Cuts from Carcasses Treated with Sanitizing spray. **Jornal of Food Science**, Chicago, v.59, n.2, p.306-309, mar./abr. 1994.

GEESINK, G. H., KOOHMARAIE, M. *Postmortem* proteolysis and calpain/calpastatin activity in callipyge and normal lamb biceps femoris during extended *postmortem* storage. **Journal Animal Science**, Savoy, IL, v.77, n.6, p.1490-1501. june. 1999.

GODDARD, B. L., MIKEL, W. B., CONNER, D. E. et al. Use of Organic acids to Improve the Chemical, Physical, and Microbial attributes of beef strip loins Stored at -1°C for 112 days. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, v.59, n.8, p.849-853, 1996.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 10^o ed. Nobel: Piracicaba/ São Paulo, 1982. 430p.

HAMBY, P. L., SAVELL, J. W., ACUFF, G. R. et al. Spray-chilling and carcass decontamination systems using lactic and acetic acid. **Meat Science**, Oxford, UK, v.21, n.1, p.1-14, 1987.

HEDRICK, H. B., ABERLE, E. D., FORREST, J. C. et al. **Principles of meat science**, 3rd. ed. Iowa: Kendall/Hunt, 1994. 354p.

HOFFMANN, F. L., GERCIA-CRUZ, C. H., VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de amostras de carnes e de presunto. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.58, p.52-57, nov./dez. 1998.

HUFF, E. J., PARRISH JR., F. C. Bovine longissimus muscle tenderness as affected by *postmortem* aging time, animal age and sex. **Journal Food Science**, Chicago, v.58, n.4, p.713-716, july/aug. 1993.

HUFF-LONERGAN, E., PARRISH JR., F. C., ROBSON, R. M. Effects of *postmortem* aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle. **Journal Food Science**, Chicago, v.73, p.1064-1073, 1995.

HUFF-LONERGAN, E., MITSUHASHI, T., BEEKMAN, D. D. et al. Proteolysis of specific muscle structural proteins by μ -calpain at low pH and temperature is similar to degradation in *postmortem* bovine muscle. **Journal Animal Science**, Savoy, IL, v.74, n.5, p.993-1008. may. 1996.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microbial ecology of foods 1: factors affecting life and death of microorganisms**. London: Academic press, 1980. 259p.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods.

Ecologia microbiana de los alimentos 2: Productos alimenticios.

Zaragoza: Acribia, 1985. 989p.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods.

Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities.

London: Blackie Academic & Professional, 1998. 615p.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos.** 3.ed. Zaragoza:

Acribia, 1992. 804p.

KIM, C. R., KIM, K. H. CHUNG, H. J. et al. Microbiological and sensory

qualities of refrigerated chicken bresats treated with organic acids. In:

CONGRESS THE INSTITUTE FOOD TECHNOLOGY, 1999, Chicago.

Anais... Chicago: 1999. P.83C-17.

KOOMARAIE, M., BABIKER, A. S., MERKEL, R. A., et al. Role of Ca⁺⁺

dependent proteases and lysosomal enzymes in *postmortem* changes in

bovine skeletal muscle. **Journal Food Science**, Chicago, v.53, n.1,

p.1253-1257. jan./fev. 1988.

KOTULA, K. L., THELAPPURATE, R. Microbiological and sensory attributes

of retail cuts of beef treated with acetic and lactic acid solutions. **Journal**

of Food Protection, Des Moines, Iowa, v.57, n.8. p.665-670, 1994.

LAMBERT, A. D., SMITH, J. P., DODDS, K. L. Shelf Life extension and

microbiological safety of fresh meat. A review. **Food Microbiological**,

London, v.8, n.4, p.267-297, 1991.

LAWRIE, R. A. **Meat Science.** 4. Ed. Oxford: Pergamon Press, 1985. 267p.

MILANI, L. I. G., TERRA, N. N., OLIVEIRA, M. S. R. Filme comestível e

ácido acético na conservação de carcaças de frango resfriadas. **Higiene**

Alimentar, São Paulo, v.10, n.46, p.35-40. nov./dez. 1996.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiment**. 3^o Ed. John Wiley & Sons: Nova York, 1991. 649p.

NISSEN, H., SØRHEIM, O., DAINTY, R. Effects of vacuum, modified atmospheres and storage temperature on the microbial flora of packaged beef. **Food Microbiology**, London, v.13, n.3, p.183-191, jun. 1996.

O'CONNOR, S. F., TATUM, J. D., WULF, D. M., et al. Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. **Journal Animal Science**, Sawoy, IL, v.75, n.7, p.1822-1830, july. 1997.

O'HALLORAN, G. R., TROY, D. J., BUCKLEY, D. J., et al. The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle. **Meat Science**, Barking-UK, v.47, n.3/4, p.187-210, nov./dec. 1997.

OSTHOLD, W., SHIN, H. K., DRESEL, J. et al. Improving the storage life of carcasses by treating their surfaces with an acid spray. **Fleishwirtsch**, v.64, n.7, p.828-830, 1984.

PARDI, M. C., SANTOS, I. F. dos, SOUZA, E. R. de. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. Goiânia: UFG, 1995. 2v, v.1: Ciência e higiene da carne. Tecnologia da sua obtenção e transformação. p.35-259.

PINTO, P. S. A. Aspectos sanitários da salmonelose como zoonose. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.73, p.39-43, jun. 2000.

PODOLAK, R. K., ZAYAS, J. F., KASTNER, C. L. et al. Reduction of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* o157:H7 and *Salmonella typhimurium*

during storage on beef sanitized with fumaric, acetic and lactic acids. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 41, v.II, 1995, Texas. **Anais...** Texas: 1995. P.299-300.

PRICE, J. F. & SCHWEIGERT, B. S. **The science of meat and meat products**. 2rd. W.H.Freeman and company. San Francisco, 1971. 660p.

PUGA, D. M. U., CONTRERAS, C. J. C., TURNBULL, M. R. **Ciência Tecnol. Aliment**, Campinas, v.19, n.1, p.88-96, jan./abr. 1999.

QUATTARA, B., SIMARD, R. E., HOLLEY, R. A., et al. A Inhibitory Effect of Organic Acids upon meat spoilage Bacteria. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, v.60, n.3, p.246-253, 1997.

ROÇA, R. de O., SERRANO, A. de M. Abate de bovinos: Conversão do músculo em carne. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.8, n.33, p.7-33, set. 1994a.

ROÇA, R. de O., SERRANO, A. de M. Operações de abate de bovinos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.8, n.34, p.14-20, nov. 1994b.

ROÇA, R. de O., SERRANO, A. de M. Abate de bovinos: Alterações microbianas da carcaça. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.9, n.35, p.8-13, jan./fev. 1995.

RUBENSAM, J. M., FELÍCIO, P. E., TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatido no sul do Brasil. **Ciênc. tecnol. Aliment.**, Campinas, v.18, n.1, p.405-409, 1998.

- RUSSELL, N. J., GOULD, G. W.(Eds.). **Food Preservatives**. New York: Blackie and Son, 1990. 290p.
- SINGER, J. M., ANDRADE, D. F. Análise de dados longitudinais. In: VII SIMPÓSIO NACIONAL DE PROBABILIDADE E ESTATÍSTICA, 1986, Campinas, SP. **Anais**.Campinas: ABE, 1986. 108p.
- SHERIDAN, J. J., DOHERTY, A. M., ALLEN, P. et al. The effect of vacuum and modified atmosphere packaging on the shelf-life of lamb primals, storage at different temperature. **Meat Science**, Oxford, UK, v.45, n.1, p.107-117, jan. 1997.
- SOUSA, C. L., JOELLE, M. R. S. P., SILVA E. de C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química da carne bovina moída em açougues no município de Macapá-AP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.72, p.60-65, maio. 2000.
- SUDENE. Região Nordeste do Brasil em números. Recife, 1999., p.54-55. (Indicadores Sócio-econômico do Nordeste,3).
- SILVA, J. A. Sanitização da carne com ácidos orgânicos. Parte I. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.60, p.55-62, mar. 1999a.
- SILVA, J. A. Sanitização da carne com ácidos orgânicos. Parte II. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.62, p.37-43, jun. 1999b.
- SILVA, JR. E. A. da. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**.3 ed. São Paulo: Varela, 1999c. p.300-307.
- SILVA, J. A., BERAQUET, N. J. Redução da contaminação inicial de carne

bovina pela sanitização com ácidos orgânicos. **B. CEPPA**. Curitiba, v.15, n.2, p.127-142. jul./dez. 1997.

SILVA, J. A., BERAQUET, N. J. A microbiota contaminante da carcaça bovina. **Bol. SBCTA**, Campinas, v.32, n.2, p.157-166, set./dez. 1998a.

SILVA, J. A., BERAQUET, N. J. Sanitização da carcaça bovina. **Bol. SBCTA**, Campinas, v.32, n.2, p.172-179, set./dez. 1998b.

SILVA, N., JUNQUEIRA, U. C. A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1995. 229p. (Manual técnico, nº 14).

TAYLOR, R. G., GEESINK, G. H., THOMPSON, V. F. et al. Is z-disk degradation responsible for *postmortem* tenderization?. **Journal Animal Science**, Chicago, v.73, p.1351-1367, 1995.

TAYLOR, R. G., KOOHMARAIE, M. Effects of *postmortem* storage on the ultrastructure of the endomysium and myofibrils in normal and callipyge longissimus. **Journal Animal Science**, Savoy, IL, v.76, n.11, p.2811-2817. nov. 1998.

UYTTERHAEGEN, L., CLAYES, E., DEMEYER, D. Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and miofibrillar degradation and solubility. **Journal Animal Science**, Chicago, v.72, p.1209-1223, 1994.

VENUGOPAL, R. J., INGHAM, S.C., McDURDY ALAN R., et al. Anaerobic microbiology of fresh beef packaged under modified atmosphere or vacuum. **Journal of Food Science**, Chicago, v.58, n.5, p.935-938,

sept./oct. 1993.

XAVIER, C., V. A., BERAQUET, N. J. Shelf-life of organic acid treated vacuum packed chicken breast meat. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 46, v.II, 2000, Argentina. **Anais...** Argentina: 2000. P.664-665.

XAVIER, G. M., MARTINS, M. L. L. L., DE ALMEIDA, L. Ocorrência de coliformes e de bolores e leveduras em carne moída comercializada em campus dos Goytacazes – RJ. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 5, 1999, Foz do Iguaçu. **Anais...** São Paulo: Higiene Alimentar, 1999. P.35-36.

ZAPATA, J. F. F. Tecnologia e Comercialização de carne Ovina. In: SEMANA DA CAPRINOCULTURA E DA OVINOCULTURA TROPICAL BRASILEIRA, 1994, Sobral, CE. **Anais...**Sobral: EMPRABA-CNPC, 1994. p.115-128