

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**TESE**

**Efeito da Alta Pressão Hidrostática sobre o crescimento de bactérias  
ácido lácticas e inativação de *Salmonella* Enteritidis  
em presunto de peru.**

**Simone Pereira Mathias**

**2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE O  
CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS E INATIVAÇÃO  
DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS EM PRESUNTO DE PERU.**

**SIMONE PEREIRA MATHIAS**

*Sob a Orientação do Dr.*  
**Amauri Rosenthal**

*e Co-orientação da Professora Dra.*  
**Arlene Gaspar**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

Seropédica, RJ.  
Janeiro, 2011.

664.07

M431e

T

Mathias, Simone Pereira, 1973-  
Efeito da alta pressão  
hidrostática sobre o crescimento de  
bactérias ácido lácticas e  
inativação de Salmonella enteritidis  
em presunto de peru / Simone Pereira  
Mathias. - 2011.

129f. : il.

Orientador: Amauri Rosenthal.

Dissertação (mestrado) -  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro, Curso de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f.99-116.

1. Alimentos - Microbiologia -  
Teses. 2. Ácido láctico - Teses. 3.  
Bactérias patogênicas - Teses. 4.  
Carnes - Conservação - Teses. 5.  
Carnes - Processamento - Teses. 6.  
Alta pressão (Tecnologia) - Teses.  
I. Rosenthal, Amauri, 1960-. II.  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos.  
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**SIMONE PEREIRA MATHIAS**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Tecnologia de Alimentos.

TESE APROVADA EM ----/----/-----

---

Arlene Gaspar. Profa. Dra. UFRRJ.  
(Co-orientadora)

---

Sérgio Borges Mano. Prof. Dr. UFF.

---

Renata Torrezan. Dra. EMBRAPA CTAA

---

Janine Passos Lima da Silva. Dra. EMBRAPA CTAA

---

Tatiana Saldanha. Profa. PhD. UFRRJ.

**“Quem dentre vós é sábio e entendido?  
Mostre pelo seu bom trato  
as suas obras em mansidão de sabedoria...”**

**(Tiago 3: 13)**

**“Feliz aquele que transfere o que sabe  
e aprende o que ensina.”**

**(Cora Coralina)**

**Dedico...**

**Com grande amor:**

**À minha irmã Selma,  
À minha mãe Doraíza (*in memoriam*),  
Ao meu namorado Paulo Henrique.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder sabedoria, força e paciência para seguir adiante...

Aos meus familiares por todo amor, apoio e incentivo em minha vida e na trajetória profissional, principalmente ao meu pai Victal e meu irmão Marcos e em especial à minha amada irmã Selma, por ser parte fundamental em todos os momentos, meu alicerce.

Ao meu namorado Paulo Henrique, pelo amor, compreensão e ajuda nos momentos mais difíceis, sempre me fazendo acreditar que eu conseguiria alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador Amauri Rosenthal, pela orientação, apoio, amizade e confiança em meu trabalho.

A minha co-orientadora Arlene Gaspar pela grande amizade ao longo desses anos, sua orientação foi muito importante, obrigada sempre pela confiança e oportunidade de crescimento profissional.

A Renata Torrezan pela amizade e orientação, sempre com uma palavra de conforto... seu apoio foi muito importante, obrigada por tudo.

A grande amiga Marcela Andrade, sua ajuda foi fundamental para realização desse trabalho...

Ao amigo Sergio Macedo (Filé), uma pessoa iluminada que me trouxe vários conhecimentos e me ajudou muito desde o início, sem seu auxílio nada disso seria possível, muito obrigada por tudo!

A equipe da microbiologia: obrigada por me acolherem... Celina Mara Soares, Simone Duarte, Ivan Alcântara, Ana Paula de Oliveira e Ana Lúcia Penteado. Em especial à Flávia Reis Campos, pois sem seu auxílio não seria possível realizar todo esse trabalho, obrigada pela amizade, paciência e ajuda.

A todos os pesquisadores, professores, funcionários, técnicos, estagiários e amigos que estiveram presentes e me auxiliaram direta ou indiretamente em todo esse processo, acrescentando para minha formação profissional e de vida.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO

MATHIAS, Simone Pereira. **Efeito da Alta Pressão Hidrostática sobre o crescimento de bactérias ácido lácticas e inativação de *Salmonella* Enteritidis em presunto de peru.** 2011, 129p. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

No presente estudo, foi aplicada a alta pressão hidrostática (APH) de 400 MPa por 15 minutos em temperatura ambiente, em presunto de peru, com posterior estocagem a 4, 8 e 12°C, sendo utilizados os modelos matemáticos de Gompertz Modificado e Baranyi com intuito de ajustar as curvas do crescimento microbiano de bactérias ácido lácticas (BAL) durante o armazenamento. A mesma condição operacional do processo e armazenamento sob condição normal de refrigeração (7°C) e temperatura de abuso (13°C) foi empregada para isolamento, identificação e avaliação quanto à produção de bacteriocinas pelas BAL, frente à *Salmonella* Enteritidis ATCC 13706, utilizando os meios ágar MRS (Man Rogossa e Sharp) e ágar M-17. Outro ponto avaliado foi a inativação do patógeno com uso de pressões de 300 e 400 MPa, ciclo contínuo de 15 minutos e ciclos múltiplos de 2 ciclos de 7,5 minutos, de 3 ciclos de 5 minutos e de 5 ciclos de 3 minutos em temperatura ambiente. Após a avaliação de tal inativação pela APH as amostras foram armazenadas a 7°C e foi realizada posterior recuperação. Foi observado que o modelo de Gompertz Modificado se adequou melhor às temperaturas de 4 e 12°C e o modelo de Baranyi apresentou melhor ajuste para 8°C para o crescimento das BAL, e todas as amostras pressurizadas tiveram aumento de validade comercial quando comparadas às amostras controle. O tratamento a alta pressão, mesmo em temperaturas de abuso de armazenamento, proporcionou validade comercial de 42 dias, enquanto a amostra não pressurizada e armazenada a 7°C, apresentou validade comercial de 35 dias. No isolamento das BAL foram identificados os gêneros *Enterococcus sp* e *Streptococcus sp* como microbiota contaminante e as cepas foram capazes de produzir halo de inibição frente ao patógeno, na proporção de 91,6% de *Enterococcus sp* e 25,0% de *Streptococcus sp* para as amostras controle, e 70,8% dos isolados de *Enterococcus sp* e 8,3% de *Streptococcus sp* para amostras pressurizadas. Ao se avaliar a inativação, pode-se observar que a concentração inicial de 6,8 log<sub>10</sub> UFC/mL da cepa de *Salmonella* Enteritidis inoculada, após 24 horas sob refrigeração apresentou redução decimal de 1,5 log<sub>10</sub> UFC/g para as amostras controle. E a partir da aplicação de pressão de 300 MPa em ciclo contínuo de 15 minutos houve posterior redução de 2,8 log<sub>10</sub> UFC/g, enquanto que tratamentos a mesma pressão com 2 ciclos de 7,5 minutos, 3 ciclos de 5 minutos e 5 ciclos de 3 minutos resultaram em reduções de 2,9 log<sub>10</sub>, 2,9 log<sub>10</sub> e 3,2 log<sub>10</sub> UFC/g, respectivamente. Já tratamentos de 400 MPa em ciclo contínuo ou múltiplos ocasionou a completa inativação microbiana. Finalmente avaliando-se a recuperação de células injuriadas pela APH pode-se observar que houve maior recuperação através da metodologia TAL (Fina camada de ágar) ao ser comparada com os meios seletivos e usuais, o ágar XLD (ágar xilose lisina desoxicolato) e ágar TSA (ágar triptona de soja), após armazenamento a 10°C por 10 dias. De modo global, concluiu-se que a tecnologia de APH mostrou-se eficiente na inativação do patógeno e deteriorantes presentes no presunto de peru, proporcionando aumento significativo da validade comercial do produto.

**Palavras-chave:** Alta pressão hidrostática, microbiologia preditiva, bactérias ácido lácticas, *Salmonella* Enteritidis, inativação.



## ABSTRACT

MATHIAS, Simone Pereira. **Effect of High Hydrostatic Pressure on the growth of lactic acid bacteria and inactivation of *Salmonella* Enteritidis in turkey ham.** 2011, 129p. Doctoral thesis in Food Science and Technology. Institute of Technology, Department of Food Technology University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

In this study high hydrostatic pressure (HHP) at 400 MPa for 15 minutes at room temperature was applied to turkey ham followed by storage at 4, 8, 12°C. Lactic acid bacteria (LAB) growth data were adjusted to Modified Gompertz and Baranyi models at different storage temperatures. The same HHP operational conditions were applied followed by normal refrigerated (7°C) and abusive (13°C) storage conditions aiming at isolating, identifying and evaluating bacteriocin productions by LAB against *Salmonella* Enteritidis ATCC 13706, using MRS (Man, Rogossa and Sharp) agar and M-17 agar. Also the inactivation of such pathogen was evaluating by using either 300 or 400MPa in a continuous processing of 15 minutes or multiple cycles (2 cycles of 7.5 minutes; 3 cycles of 5 minutes; 5 cycles of 3 minutes) at room temperature. Following the HHP treatments the samples were stored at 4°C and carried out further evaluation of the pathogen recuperation. It was verified that the Gompertz Modified model better fitted LAB growth data at 4 and 12°C, while Baranyi model presented better adjustment at 8°C. It was also observed that pressurized samples showed higher commercial validity when compared to control samples. High pressure treatment even at abusive storage temperature allowed commercial validity of 42 days, while non pressurized control samples presented validity of 35 days. The *Enterococcus sp* and *Streptococcus sp* genera were identified as contaminant microbiote. The strains were able to produce inhibition halos against the pathogenic target, in the proportion of 91.6% of *Enterococcus sp* and 25% *Streptococcus sp* for control samples isolates, and 70.8% of *Enterococcus sp* and 8.3% of *Streptococcus sp* for pressurized samples isolated. By evaluation the HHP inactivation of 6.8 log<sub>10</sub> CFU/mL, a decimal reduction of 1.5 log<sub>10</sub> CFU/g was verified within 24 hours of refrigerated storage previously to the processing. The HHP continuous treatment at 300 MPa for 15 minutes lead to a reduction of 2.8 log CFU/g, while the treatments with 2 cycles of 7.5 minutes; 3 cycles of 5 minutes, and 5 cycles of 3 minutes, resulted in population decrease of 2.9 log, 2.9 log<sub>10</sub> and 3.2 log CFU/g, respectively. On the other hand, treatments at 400 MPa both continuously or in cycles resulted in complete inactivation of the pathogen. Finally, by evaluating the recuperation of injured cells by HHP it was possible to observed that a higher recuperation was obtained through TAL (thin agar layer) methodology in comparison to XLD (xylose lysine deoxycholate agar) and TSA agar (trypticase soy agar), in samples stored at 10°C for 10 days. In overall, it was concluded that HHP was shown to be an efficient method for inactivating the target pathogen and spoilage microorganism, allowing a greater significant increase in the commercial validity.

**Keywords:** High hydrostatic pressure, predictive microbiology, lactic acid bacteria, *Salmonella* Enteritidis, inactivation

## LISTA DE TABELAS

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

- Tabela 1.** Relação de países, produtos, processos de APH, embalagem e validade comercial de produtos cárneos disponíveis no comércio mundial, tratados por alta pressão hidrostática. Fonte: Sán Martín et al. (2002). 9
- Tabela 2.** Microrganismos e as pressões necessárias para sua inativação. Fonte: Chiavaro e Bonardi (1999) 12
- Tabela 3.** Pressões usadas para inativação de microrganismos patogênicos. Fonte: Fonte: Chiavaro e Bonardi (1999). 12
- Tabela 4.** Microrganismos, substrato, condições de tratamento de APH e a inativação logarítmica. Fonte: Patterson (2005). 13
- Tabela 5** – Exemplos de inativação de microrganismos tratados pela APH. Fonte: Sán Martín et al. (2002); Patterson et al. (1995). 14

### CAPÍTULO I

- Table 1.** Kinetic parameters for growth of Lactic Acid Bacteria adjusted to Modified Gompertz and Baranyi models. 44
- Table 2.** Statistics obtained from the fitting for modified Gompertz model and Baranyi of lactic acid bacteria population in pressurized vacuum packed turkey ham, in comparison to the control, and stored at 4, 8 and 12°C. 44

### CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Dias/tratamento, Média (UFC/g) e log N/No UFC/g do crescimento das bactérias ácido lácticas presentes nas amostras de presunto de peru controle e pressurizada, ao longo da validade comercial, ao atingir contagens de  $10^7$  UFC/g, armazenadas a 7°C. 54
- Tabela 2.** Dias/tratamento, Média UFC/g e log N/No UFC/g do crescimento das bactérias ácido lácticas presentes no presunto de peru controle e pressurizado, ao longo da validade comercial quando armazenadas a 13°C, até atingir contagens de  $10^7$  UFC/g. 56

### CAPÍTULO III

- Tabela 1.** Identificação do crescimento das BAL em relação à temperatura, concentração salina, pH e produção de CO<sub>2</sub> a partir da glucose. Fonte: Harrigan (1998). 65

<b>Tabela 2.</b> Formas bacterianas isoladas das amostras de presunto de peru nos meios MRS e M-17, coloração de Gram e prova de catalase negativa para BAL.	67
--	----

#### **CAPÍTULO IV**

<b>Tabela 1.</b> Representação das pressões de 300 e 400MPa, número de ciclos, tempo de retenção, representação em minutos e o código das amostras de presunto de peru.	79
---	----

<b>Tabela 2. Tabela 2.</b> Tratamentos, média (UFC/g), log <sub>10</sub> UFC/g e redução logarítmica de <i>Salmonella</i> Enteritidis inoculada em amostras de presunto de peru, comparada com amostra controle, baseando-se na inoculação inicial de 6,8 log <sub>10</sub> UFC/mL (n=36) para amostra controle e 5,3 UFC/g para as amostras pressurizadas (base na amostra controle).	80
--	----

#### **CAPÍTULO V**

<b>Tabela 1.</b> Condição operacional, tratamento de APH, tempo e meios de cultura ágar TSA, TAL (fina camada de ágar) e ágar XLD da inativação de <i>Salmonella</i> Enteritidis inoculada em presunto de peru, comparada com amostra controle, baseando-se na concentração inicial de 6,8 log <sub>10</sub> UFC/g (n=81).	91
--	----

#### **ANEXOS**

<b>Tabela 1.</b> Formulação do presunto de peru. (MATHIAS, 2008).	127
<b>Tabela 2.</b> MRS Agar (De Man, Rogosa, Sharpe) - OXOID	128
<b>Tabela 3.</b> M-17 Agar- FLUKA	128

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Forma de ação da alta pressão sobre o alimento (adaptado da AVURE, 2009). 6
- Figura 2.** Diagrama esquemático do equipamento de alta pressão hidrostática. Adaptado de Buzrul et al. (2007). 7
- ### CAPÍTULO I
- Figure 1.** Growth curves of lactic acid bacteria in control and pressurized turkey ham at different storage temperatures. 45
- ### CAPÍTULO II
- Figura 1 . (a)** Características sensoriais das amostras de presunto de peru controle e pressurizada, **(b)** formação do limo na amostra controle aos 35 dias de armazenamento a 7°C. (Fonte: autora). 57
- Figura 2.** Curvas de crescimento das bactérias ácido lácticas presentes nas amostras de presunto de peru controle e pressurizada nas temperaturas de 7 e 13°C, durante o armazenamento. 57
- ### CAPÍTULO III
- Figura 1.** Representação da porcentagem de bactérias ácido lácticas e não lácticas presentes nas amostras de presunto de peru. 67
- Figura 2.** (a) colônia em forma de gota (*Enterococcus sp*) meio ágar MRS e (b) colônias puntiformes e pequenas em meio ágar M-17 (*Streptococcus sp*). (Fonte: autora). 68
- Figura 3.** Morfologia de *Enterococcus sp* (a) e *Streptococcus sp* (b), identificadas em objetiva de imersão. (Fonte: autora). 68
- Figura 4.** Representação da porcentagem das 48 colônias de *Enterococcus sp* formadoras ou não do halo de inibição frente à *Salmonella* Enteritidis. 69
- Figura 5.** Representação da porcentagem das 24 colônias de *Streptococcus sp* formadoras ou não do halo de inibição frente à *Salmonella* Enteritidis. 70
- Figura 6.** Formação do halo de inibição de *Enterococcus sp* em ágar MRS, frente à *Salmonella* Enteritidis. (Fonte: autora). 70
- ### CAPÍTULO IV
- Figura 1.** Representação da inativação de *Salmonella* Enteritidis (log<sub>10</sub> UFC/g)

inoculada em amostras de presunto de peru após aplicação da APH em ciclos contínuo e múltiplo. 82

## CAPÍTULO V

**Figura 1.** Representação esquemática da metodologia TAL. Fonte: adaptado de Wu e Fung (2001). 91

**Figura 2.** Contagens da recuperação de *Salmonella* Enteritidis (log 10 UFC/g) inoculada em amostras de presunto de peru, em ágar TSA ao longo do 1, 5° e 10° dia de armazenamento a 7°C. 93

**Figura 3.** Contagens da recuperação de *Salmonella* Enteritidis (log 10 UFC/g) inoculada em amostras de presunto de peru, em TAL ( *fina camada de ágar*) ao longo do 1, 5° e 10° dia de armazenamento a 7°C. 93

**Figura 4.** Contagens da recuperação de *Salmonella* Enteritidis (log 10 UFC/g) inoculada em amostras de presunto de peru, em ágar XLD ao longo do 1, 5° e 10° dia de armazenamento a 7°C. 94

## ANEXOS

**Figura 1. (a) e (b).** Toaleta da coxa de peru, **(c)** carne de peru e condimentos e **(d)** condimentos - Preparo no laboratório da planta piloto I. (Fonte: autora). 118

**Figura 2. (a) e (b)** “Cutter” com a carne de peru em pedaços e salmoura **(c)** Autoclave para cozimento e formas de aço inox em banho de gelo e **(d)** presunto de peru – Processamento na planta piloto II. (Fonte: autora). 119

**Figura 3. (a)** Presunto de peru em câmara fluxo, **(b)** amostras de presunto embaladas a vácuo – laboratório da planta piloto IV **(c)** cilindro pressurizador com amostras e **(d)** Equipamento APH (*Stansted Fluid Power*) – Processo de APH na planta piloto II. (Fonte: autora). 120

**Figura 4. (a)** Amostras de presunto de peru, **(b)** diluição decimal seriada do presunto de peru em câmara de fluxo laminar, **(c)** Placa de ágar MRS com colônias características de BAL **(d)** Prova de catalase: amostras positiva e negativa, **(e)** *Enterococcus sp* e **(f)** *Streptococcus sp* em coloração de Gram e observação por microscopia óptica. (Fonte: autora). 121

**Figura 5.** Provas bioquímicas: (a) crescimento de BAL em pH 4,4; 9,6 e concentração de NaCl 6,5% (Caldo APT), (b) produção de CO<sub>2</sub> (Caldo MRS), (c) crescimento em temperaturas de 10 e 45°C (leite desnatado reconstituído). (d) Halo de inibição frente à *Salmonella* Enteritidis pelo *Enterococcus sp* – laboratório de microbiologia. (Fonte: autora). 122

**Figura 6.** *Salmonella* Enteritidis: **(a)** amostra em tubo de ágar TSA para repique, **(b)**

crescimento em placa de TSA por espalhamento em superfície, (c) crescimento em placa XLD agar por espalhamento em superfície, (d) crescimento em placa TSA por estrias, (e) preparo do inóculo em solução salina a 0,85% e (f) leitura da concentração desejada em Densimat – laboratório de microbiologia. 123  
(Fonte: autora).

**Figura 7.** (a) preparo da amostra: cominuição do presunto de peru e pesagem, (b) inoculação da concentração do inóculo, (c) selamento em mini seladora a vácuo (Vaccum sealer), (d) visualização da amostra já embalada em bag sealer, sendo colocada em saco duplo, (e) amostra final em saco duplo – laboratório de microbiologia e (f) pressurização: amostra em vaso pressurizador – planta piloto II. 124  
(Fonte: autora).

**Figura 8.** (a) preparo do meio de cultura TAL: camada inferior com ágar XLD solidificado e na camada superior sendo vertido o meio ágar TSA (b) espalhamento em superfície do inóculo com alça de drigalski, (c) e (d) crescimento de *Salmonella* Enteritidis em meioTAL (thin agar layer), concentrações decimais diferentes. (Fonte: autora). 125

**Figura 9.** Crescimento de *Salmonella* Enteritidis: (a) meio de cultura XLD por espalhamento em superfície, (b) diluições seriadas em meio TAL por espalhamento em superfície, (c) meio ágar TSA por espalhamento em superfície e espalhamento em superfície e (d) meio ágar TSA pour-plate. (Fonte: autora). 126

## LISTA DE SIGLAS

Aa	Atividade de água
APH	Alta pressão hidrostática
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
BAL	Bactérias ácido lácticas
BHI	Infusão de cérebro e coração ( <i>Brain Heart Infusion</i> )
Bar	Bar (medida de pressão, onde 1 bar =100000 Pa)
BOD	Incubadora bacteriológica
CEE	Comunidade Econômica Européia
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Eh	Potencial de oxirredução
EUA	Estados Unidos da América
Exp	Exponencial
FAO	Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FDA	U.S. Food and Drug Administration
g	Grama
GRAS	Geralmente reconhecido como Seguro (Generally Recognized as Safe – FDA)
K <sup>+</sup>	Potássio
kg	Quilograma
ISO	Organização Internacional para Padronização (International Organization for Standardization)
J/Kmol	Jaule/quilomol
J/mol	Jaule/mol
L(+) e D(-)	isômeros
Lag	Fase de crescimento microbiano
LDR	Leite desnatado reconstituído
Log	Logarítmico
M-17	Ágar M-17
mL	Mililitro
Mg <sup>2+</sup>	Magnésio
MPa	Mega pascal
MRS	Ágar de Man, Rogossa e Sharp
MSE	Erro médio quadrático
NaCl	Sal
µL	Microlitro
NaCl	Sal
Na <sup>+</sup>	Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
Psi	Psi (medida de pressão, onde psi x 0.07=Bar)
PMP	Programa de modelagem de patógeno (Pathogen Modeling Program)
RNA	Ácido ribonucléico
RSS	Soma dos quadrados residuais

TAL	Fina camada de agar (Thin agar layer)
TSA	Ágar triptona de soja
TT	Tetrationato
UFC	Unidade formadora de colônia
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
US\$	Dólar
XLD	Ágar xilose lisina desoxicolato



## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau celsius
≤	Maior ou igual
<	Menor
D	Tempo de tratamento térmico
z	Aumento na pressão de tratamento térmico
N	Contagem microbiana final
No	Contagem microbiana inicial
A	Log da contagem microbiana final
μ	Velocidade máxima de crescimento
λ	Tempo necessário para atingir a velocidade máxima de crescimento
t	Tempo
C	Aumento logarítmico da população microbiana
F	Crescimento relativo à metade da fase exponencial
K	Velocidade específica de crescimento
R <sup>2</sup>	Coefficiente de regressão
%	Porcentagem
w	wats

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL</b>	4
<b>2.1. Alta Pressão Hidrostática (APH)</b>	4
2.1.1. Histórico da alta pressão	5
2.1.2. Operações nos equipamentos de alta pressão	5
2.1.3. Produtos disponíveis no mercado mundial tratados por alta pressão	8
2.1.4. Efeito da alta pressão sobre os microrganismos	10
2.1.5. Fatores extrínsecos que afetam a sensibilidade dos microrganismos à alta pressão	14
<b>2.2. Microbiologia</b>	16
2.2.1. Fatores que influenciam o desenvolvimento dos microrganismos em alimentos	16
2.2.2. Injúria de microrganismos	16
2.2.2.1. Os efeitos e modificações nas células injuriadas	17
2.2.2.2. Recuperação de células injuriadas	18
<b>2.3. Microbiologia preditiva</b>	19
2.3.1. Modelos matemáticos	21
2.3.1.1. Nível primário	22
2.3.1.1.1. Modelo Gompertz	22
2.3.1.1.2. Modelo Logístico	23
2.3.1.1.3. Modelo de Baranyi	23
2.3.2.2. Nível secundário	24
2.3.2.3. Nível terciário	25
<b>2.4. Bactérias ácido lácticas (BAL)</b>	26
2.4.1. Gênero <i>Enterococcus sp</i>	27
2.4.2. Gênero <i>Streptococcus sp</i>	29
2.4.3. Bactérias ácido lácticas e produtos cárneos	29
2.4.4. Bacteriocinas produzidas por BAL	31
<b>2.5. Gênero <i>Salmonella sp</i></b>	33
2.5.1. Sorovar <i>Salmonella</i> Enteritidis	35
2.5.2. Dose infectante de <i>Salmonella</i> .	35
2.5.3. Capacidade adaptativa da <i>Salmonella</i>	36
<b>CAPÍTULO I</b>	38
<b>PREDICTION OF LACTIC-BACTERIA GROWTH IN TURKEY HAM PROCESSED BY HIGH HYDROSTATIC PRESSURE</b>	39
Abstract	39
Introduction	39
Material and methods	41
Material	41
Methods	41
High pressure operating conditions	42
Microbiological analysis	42

Evaluation of predictive model	42
Statistical analysis	43
Results and Discussion	43
Conclusion	46
References	46
<b>CAPÍTULO II</b>	48
<b>EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO PRESUNTO DE PERU ARMAZENADO EM TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO NORMAL E ABUSIVA</b>	49
Resumo	49
Abstract	50
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1. Processamento do presunto de peru	51
2.2. Preparo da amostra	52
2.3. Tratamento a alta pressão hidrostática	52
2.4. Análise microbiológica – isolamento e plaqueamento das bactérias ácido lácticas	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4. CONCLUSÃO	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
<b>CAPÍTULO III</b>	59
<b>ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO DOS GÊNEROS PREDOMINANTES E AÇÃO DE BACTERIOCINAS PRODUZIDAS FRENTE À <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> EM PRESUNTO DE PERU CONTROLE E SUBMETIDO À ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA</b>	60
Resumo	60
Abstract	61
1. INTRODUÇÃO	61
2. MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1. Processamento do presunto de peru	62
2.2. Preparo da amostra	62
2.3. Tratamento a alta pressão hidrostática	63
2.4. Análise microbiológica – isolamento das BAL	63
2.5. Coloração de Gram	64
2.6. Prova de Catalase	64
2.7. Métodos bioquímicos para identificação dos gêneros de BAL	64
2.8. Teste de inibição direta	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4. CONCLUSÃO	70
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
<b>CAPÍTULO IV</b>	73
<b>USO DE CICLOS CONTÍNUO OU MÚLTIPLO DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA INATIVAÇÃO DE <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> EM</b>	74

<b>PRESUNTO DE PERU</b>	
Resumo	74
Abstract	75
1. INTRODUÇÃO	75
2. MATERIAL E MÉTODOS	76
2.1. Obtenção do presunto de peru	76
2.2. Aquisição do microrganismo	76
2.3. Preparo do inóculo	76
2.4. Preparo da amostra	77
2.5. Tratamento a alta pressão hidrostática com ciclos	77
2.6. Enumeração de células viáveis de <i>Salmonella</i> Enteritidis	78
2.7. Análise microbiológica complementar	78
2.7.1. Detecção de <i>Salmonella</i> sp.	78
2.7.2. Contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias ácido lácticas	78
2.8. Análise estatística	79
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4. CONCLUSÃO	82
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
<b>CAPÍTULO V</b>	85
<b>AVALIAÇÃO DE MEIOS CONVENCIONAIS (TSA E XLD) E METODOLOGIA TAL (THIN AGAR LAYER METHOD) NA RECUPERAÇÃO DE SALMONELLA ENTERITIDIS INJURIADA PELA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA (APH)</b>	86
Resumo	86
Abstract	87
1. INTRODUÇÃO	87
2. MATERIAL E MÉTODOS	88
2.1. Processo de fabricação do presunto de peru	88
2.2. Preparo da cultura bacteriana	88
2.3. Preparo da amostra	89
2.4. Uso da alta pressão hidrostática	89
2.5. Contagem de células injuriadas de <i>Salmonella</i> Enteritidis	89
2.6. Análise estatística	90
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
4. CONCLUSÃO	94
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
<b>4. CONCLUSÃO GERAL</b>	97
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS</b>	99
<b>6. ANEXOS</b>	117
Anexo A - Processamento do presunto de peru (todos os capítulos).	118
Anexo B - Processamento do presunto de peru (todos os capítulos).	119
Anexo C - Processamento a alta pressão hidrostática (capítulos I, II e III).	120
Anexo D - Isolamento, identificação e plaqueamento de BAL (capítulos I, II e III).	121

Anexo E - Testes bioquímicos e inibição direta de BAL (capítulo III).	122
Anexo F - Preparo do inóculo de <i>Salmonella</i> Enteritidis (capítulos IV e V).	123
Anexo G - Inoculação de <i>Salmonella</i> Enteritidis (capítulo V).	124
Anexo H - <i>Salmonella</i> Enteritidis – meios de cultura (capítulo V).	125
Anexo I - <i>Salmonella</i> Enteritidis – meios de cultura (capítulo V).	126
Anexo J - Formulação do presunto de peru (MATHIAS, 2008).	127
Anexo L - Composição dos meios de cultura usados para isolamento de BAL (ágar MRS e M-17).	128

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O consumidor mudou o seu hábito alimentar com o passar do tempo, atualmente existe maior preocupação com a saúde e a procura por alimentos que sejam de fácil consumo, mais práticos e elaborados, que não demandem muito tempo em seu preparo e que tenham maior durabilidade, sem perder o valor nutricional. Logo, as indústrias alimentícias preocupadas com essas mudanças, têm buscado e desenvolvido cada vez mais tecnologias que tragam benefícios, principalmente em relação ao aumento da validade comercial aliada a segurança microbiológica, sem provocar alterações nutricionais e sensoriais indesejáveis.

O método de conservação de alimentos mais usado pelas indústrias para inativação de microrganismos patogênicos e deteriorantes ainda é o tratamento térmico, mas a alta pressão hidrostática (APH) tem-se mostrado bastante efetiva nessa inativação, tornando-se um atrativo para a indústria, sendo usada como método coadjuvante e até mesmo como tecnologia substituta do tratamento térmico para determinados alimentos. A inativação de microrganismos depende de vários parâmetros que incluem o tempo de pressurização, os ciclos (se contínuos ou múltiplos), a temperatura do processo, a espécie do microrganismo e tipo de substrato.

A tecnologia de alta pressão hidrostática possui os requisitos de uma tecnologia inovadora, caracterizada por se tratar de um processo não térmico e que utiliza pressões na faixa de 100 a 900 MPa, com opções de variação de tempo, de ciclos e temperatura de processo, o que garante uma grande flexibilidade de trabalho, podendo ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outras tecnologias e possui como principais vantagens o aumento da validade comercial, a inativação de microrganismos e enzimas, a manutenção das características sensoriais e nutricionais em níveis praticamente inalterados em relação ao alimento original, e o fato de ser considerada uma tecnologia limpa, que não causa danos ao meio ambiente.

O Brasil encontra-se entre os maiores exportadores de carne de peru e subprodutos, mas seu consumo interno está em crescimento, e se concentra mais nos embutidos cárneos. A carne de peru é tradicionalmente consumida na época natalina e, apesar de ainda manter sua demanda sazonal, o produto em si e seus derivados (presunto light, presunto defumado, blanquet, salsicha, hambúrguer, mortadela, lasanha, cortes de peito e coxa e sobrecoxa e peru temperado) já aparecem com mais frequência nas gôndolas dos supermercados, principalmente pelo enfoque comercial atribuindo à carne de peru a característica de ser mais saudável, relacionado a linha “light” (sem gordura), o que atrai os consumidores preocupados com a saúde.

A indústria avícola procura por tecnologias que possibilitem aumentar a qualidade de sua produção, principalmente relacionadas com medidas que tragam garantias da inocuidade dos produtos, com objetivo de proporcionar um maior crescimento e manutenção do setor avícola e aumento do mercado consumidor. Embora a indústria em questão utilize os avanços das tecnologias atuais, a carne de aves e subprodutos são apontados como um dos principais reservatórios de *Salmonella sp.* Produtos de origem animal, como a carne de frango, suína e bovina, representam um papel fundamental na epidemiologia das salmoneloses humanas que atualmente é considerada uma das zoonoses emergentes mais importantes, tornando-se uma preocupação constante das autoridades sanitárias em todo o mundo.

A validade comercial dos produtos cárneos consiste em um ponto crucial para as indústrias, que cada vez mais estão preocupadas em aumentar o prazo de validade dos seus produtos e inativar microrganismos patogênicos, garantindo um alimento seguro do ponto de vista microbiológico e com características sensoriais adequadas. Alguns gêneros de bactérias

pertencentes ao grupo das bactérias ácido lácticas, em determinadas condições, deterioram produtos cárneos embalados a vácuo, trazendo grandes perdas econômicas.

Como a preocupação de muitas das indústrias estão relacionadas com os casos de doenças veiculadas pelos alimentos e interessadas em resultados microbiológicos mais rápidos e seguros, buscam ferramentas que auxiliem nesse controle, tornando-o muito mais eficaz do que muitos métodos tradicionais, utilizando a microbiologia preditiva como uma grande aliada no controle microbiológico da produção industrial. Como a tecnologia de APH tem grande aplicabilidade no aumento da validade comercial e inativação de microrganismos, a sua utilização em conjunto com a microbiologia preditiva traz grandes vantagens no controle desses microrganismos, garantindo um alimento com maior sanidade e qualidade.

A microbiologia preditiva baseia-se na premissa de que é possível prever, através do uso de modelos matemáticos criados através do estudo quantitativo dos microrganismos, o crescimento de colônias nos alimentos. Os modelos preditivos (modelagem matemática) são de grande utilidade na indústria de alimentos, pois através de sua utilização pode-se prever com maior exatidão o crescimento dos microrganismos, os fatores envolvidos no seu desenvolvimento, e sua forma de controle, bem como determinada tecnologia aplicada pode interferir, aumentando a validade comercial de um produto.

Estudos realizados anteriormente por Mathias (2008), baseados no crescimento de bactérias ácido-lácticas, mostraram que a tecnologia de alta pressão hidrostática foi eficaz no aumento da validade comercial de 45 dias das amostras de presunto de peru armazenado a 8°C, quando comparado às amostras controle, garantindo um produto em boas condições de consumo, retardando o crescimento desses microrganismos deteriorantes e mantendo as características sensoriais satisfatórias. A tecnologia não alterou os parâmetros físico-químicos, como a aw, pH e composição centesimal, oxidação de lipídeos, teve apenas pequenas alterações de cor e na estrutura das proteínas miofibrilares, indicando que o produto pressurizado mantém praticamente as mesmas qualidades do produto original e possuindo boa aceitação sensorial por parte dos consumidores.

Por esse motivo, a presente pesquisa teve como objetivo geral o estudo da alta pressão hidrostática frente às bactérias ácido lácticas e *Salmonella* Enteritidis em presunto de peru embalado a vácuo.

Os objetivos específicos foram: isolar, identificar os gêneros predominantes e avaliar o crescimento de bactérias ácido lácticas relacionado com a validade comercial das amostras de presunto de peru pressurizadas, comparado às amostras controle (não pressurizada), utilizando variação da temperatura de refrigeração, além de verificar a possível atividade de produção de bacteriocinas, frente à *Salmonella* Enteritidis, baseado na formação do halo de inibição da bactéria ácido láctica selecionada. Também foram avaliados os fatores associados à inativação da cepa de *Salmonella* Enteritidis inoculada em amostras de presunto de peru tratada por alta pressão hidrostática e pesquisados os métodos que podem ser usados como meios específicos na recuperação do patógeno.

Para isso, procurou-se dividir o estudo na forma de capítulos (artigos científicos), que incluem os seguintes temas:

Capítulo I. Prediction of Lactic-Bacteria Growth in Turkey Ham Processed by High Hydrostatic Pressure.

Capítulo II. Efeito da Alta Pressão Hidrostática na Qualidade Microbiológica do Presunto de Peru Durante o Armazenamento em Temperaturas de Refrigeração e Abusiva.

Capítulo III. Isolamento, Identificação dos Gêneros Predominantes e Ação de Bacteriocinas Produzidas Frente à *Salmonella* Enteritidis do Presunto de Peru Controle e Submetido à Alta Pressão Hidrostática.

Capítulo IV. Inativação de *Salmonella* Enteritidis em presunto de peru tratado por APH com variação de pressão e uso dos ciclos múltiplos ou contínuos.

Capítulo V. Avaliação de Meios Convencionais e Metodologia TAL (*Fina camada de ágar*) para Recuperação de *Salmonella* Enteritidis Injuriada pela Alta Pressão Hidrostática.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Alta Pressão Hidrostática

Relacionado com a atual demanda do consumidor moderno por alimentos processados, com maior conveniência em sua utilização, maior qualidade em termos de sabor, textura e aparência, mais frescos e saudáveis, com redução dos teores de sal, açúcar, gordura e aditivos, a indústria de alimentos busca oferecer produtos de alto valor nutritivo e igualmente seguros e saudáveis, onde a produção também possa ser compatível e adequada para o meio ambiente. Com este objetivo, é que novas técnicas de processamento estão sendo desenvolvidas e aperfeiçoadas, e, em geral, têm mostrado resultados surpreendentes quando comparadas com métodos térmicos convencionais. Estas novas técnicas, algumas ainda em fase experimental, deverão satisfazer a essas exigências atuais e os alimentos deverão ser processados, por exemplo, através de radiação ultravioleta, ultra-som, impulso elétrico, campos magnéticos e por altas pressões (YALDAGARD et al., 2008).

A APH é um processo não térmico, capaz de inativar microrganismos patogênicos e deteriorantes nos alimentos, assim como ativar e inativar enzimas (KNORR, 1993; GOULD, 2000), minimizando a perda da qualidade do alimento em termos nutricionais e sensoriais. Os níveis de pressão normalmente não são capazes de romper ligações covalentes, mantendo inalterados os compostos que conferem cor, aroma e sabor aos alimentos (FARKAS; HOOVER, 2000; BARBOSA-CÁNOVAS; RODRÍGUES, 2002).

Ao afetar as ligações não-covalentes a alta pressão promove, por exemplo, como consequência, alterações na estrutura molecular secundária e terciária de proteínas. De um modo geral, pressões acima de 300 MPa causam desnaturação protéica irreversível à temperatura ambiente, enquanto que abaixo desse valor as alterações são reversíveis. Tais efeitos fazem com que, de um modo geral, o tratamento a altas pressões ocasiona a inativação (total ou parcial) de microrganismos e enzimas, enquanto deixa intactas moléculas pequenas, como a maioria das vitaminas e os compostos voláteis, que conferem sabor aos alimentos (SMELT, 1998).

Segundo Manas e Pagan (2005), embora pouco afete as características sensoriais dos alimentos no tocante a sabor, cor e aroma, o processamento por alta pressão pode alterar a estrutura de proteínas e polissacarídeos, causando mudanças na textura, aparência física e funcionalidade de alimentos.

No processo de APH, como o próprio nome sugere, alimentos líquidos ou sólidos são submetidos a pressões acima de 100 MPa (1 MPa = 145,038 psi = 10 bar). Em sistemas comerciais, as pressões utilizadas enquadram-se na faixa de 200 a 700MPa (SAN MARTÍN et al., 2002). Já de acordo com Zimmerman e Bergman (1993), o processamento a alta pressão consiste em submeter o produto aos níveis de pressões hidrostáticas bastante elevados (50 a 1000 MPa), bem acima daqueles normalmente empregados nos tratamentos convencionais e para estudos experimentais, os parâmetros de processo utilizados variam de 100 a 900 MPa, em temperatura ambiente ou próxima desta.

Na conservação de alimentos ácidos ( $\text{pH} < 4.6$ ) são usualmente aplicados apenas o tratamento de alta pressão para eficiente ação inativadora, já alimentos de baixa acidez necessitam de, aliado à alta pressão, um tratamento térmico (brando), sendo a combinação pressão-temperatura a forma mais eficiente de inativação, tanto enzimática como microbiana (HENDRICKX et al., 1998; HUGAS et al., 2002; CHEFTEL, 1995).

Em relação ao uso combinado de certas tecnologias, vê-se certo efeito sinérgico com outras técnicas de processamento, o que permite condições menos drásticas de processo e previne

mudanças durante a pressurização. Dentre essas possibilidades destacam-se a combinação de pressão com abaixamento de pH ou temperaturas amenas, que foi observado por Raso e Barbosa-Canovas (2003), ou alta pressão associada a pulsos elétricos ou combinada com CO<sub>2</sub>, por Spilimbergo et al. (2002).

### **2.1.1. Histórico da aplicação da alta pressão em alimentos**

A alta pressão hidrostática, como método para processar e conservar alimentos, é conhecida desde o século XIX. Entretanto, estudos relacionados com essa tecnologia foram intensificados somente na década de 80 (COSTA et al., 1999).

Os primeiros equipamentos desenvolvidos para a indústria de cerâmica sofreram modificações a fim de se adequarem à indústria de alimentos. O tempo de processamento foi aumentado, passando de entre 10 segundos e 1 minuto para 5 a 10 minutos, em pressões superiores a 400 MPa (SANGRONIS et al., 1997).

Os primeiros estudos datam de 1899, quando Bert Hite (químico do *Agricultural Experiment Station, West Virginia, EUA*) observou que a validade comercial do leite e de outros produtos poderia ser prolongada depois da pressurização (SAN MARTÍN et al., 2002). Hite mostrou que o leite cru poderia ser consumido em até quatro dias após o tratamento a 600 MPa por 1 hora, a temperatura ambiente (FARKAS; HOOVER, 2000).

O grande interesse pelo processamento a alta pressão tem ocorrido desde 1985, quando seu potencial de utilização foi reintroduzido à indústria de alimentos. Isto aconteceu particularmente no Japão onde, em setembro de 1989, um consórcio japonês de 21 empresas foi formado com apoio financeiro do Ministério da Agricultura Japonês, originando a Associação Japonesa de Pesquisa e Desenvolvimento para Alta Pressão na Indústria de Alimentos. Em tentativas iniciais, obteve-se sucesso na adaptação da tecnologia da indústria cerâmica em aplicar altas pressões a uma gama de alimentos, como peixes e proteína do ovo (WILLIANS, 1994). Esses desenvolvimentos tecnológicos aumentaram as possibilidades de aplicação comercial na área alimentícia.

Em abril de 1990, o primeiro produto da alta pressão (uma geléia altamente ácida) foi apresentado para o mercado de varejo japonês por uma companhia chamada Meidi-ya e em 1991, sua produção foi estendida para incluir iogurtes, geléias de fruta, molhos de saladas, e molhos de frutas. Também em 1991, Pokka e Wakayama (ambos processadores japoneses de sucos de frutas) instalaram um sistema semi-contínuo de altas pressões para o tratamento de sucos cítricos, com taxa de produção de 6000 e 4000 litros por hora, respectivamente (WILLIANS, 1994).

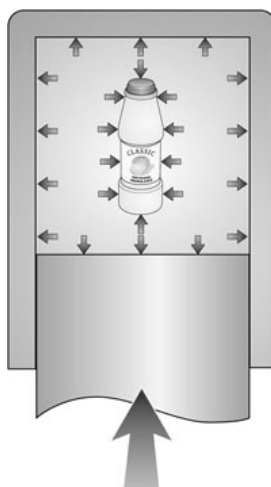
A partir de então, uma grande variedade de produtos tratados por pressão foi elaborada no mercado japonês, incluindo preparados de frutas, bolinhos de arroz e lula crua, procedentes de várias indústrias japonesas. As pressões envolvidas no processamento de alimentos são da ordem de 100 a 900 MPa, o que equivale de 1000 a 9000 atm (GRANT et al., 2000; SANGRONIS et al., 1997).

### **2.1.2. Operações nos equipamentos de alta pressão**

Para compreender os efeitos da APH é necessário conhecer dois princípios básicos: o princípio de *Lê Châtelier* e o princípio da pressão isostática. O primeiro é aquele no qual, qualquer fenômeno, transição de fase, mudança de conformação molecular ou reação química, que vem acompanhado por uma redução de volume, é favorecido pelo aumento de pressão. No caso de uma reação, a pressão alterará o equilíbrio no sentido do sistema de menor volume

(CHEFTEL, 1995). O segundo indica que a pressão é transmitida de uma forma uniforme e quase instantânea, através da amostra que está sendo submetida a este processo (Figura 1). (BARBOSA-CÁNOVAS; RODRÍGUEZ, 2002).

No processamento isostático, o produto é embalado em garrafa ou bolsa plástica e colocado no interior do vaso de pressão para ser processado. Esse vaso contém um meio que transfere a pressão ao produto, geralmente água (daí a denominação “alta pressão hidrostática”), ou, mais eventualmente, outro líquido (SANGRONIS et al., 1997).



**Figura 1.** Forma de ação da alta pressão sobre o alimento (adaptado da AVURE, 2009).

De acordo com a FAO (2001), os modos de operação da alta pressão, encontram-se divididos em 03 categorias, são elas à batelada, processo semicontínuo e contínuo. O modo de operação por batelada é o mais simples, nela uma determinada quantidade de produto é pressurizada por vez e a pressurização pode ser direta ou indireta. No processo direto (*bulk processing*), o próprio alimento funciona como meio pressurizador e os exemplos são os alimentos líquidos, como sucos e o leite, que são embalados após o processamento por alta pressão em sistema asséptico. Já a pressurização indireta (*in-container*) é aquela onde existe um meio pressurizante (como exemplo a água ou água/óleo) que é responsável por transferir a pressão gerada pelo gerador de pressão para o alimento e este processo é aplicado a alimentos previamente embalados.

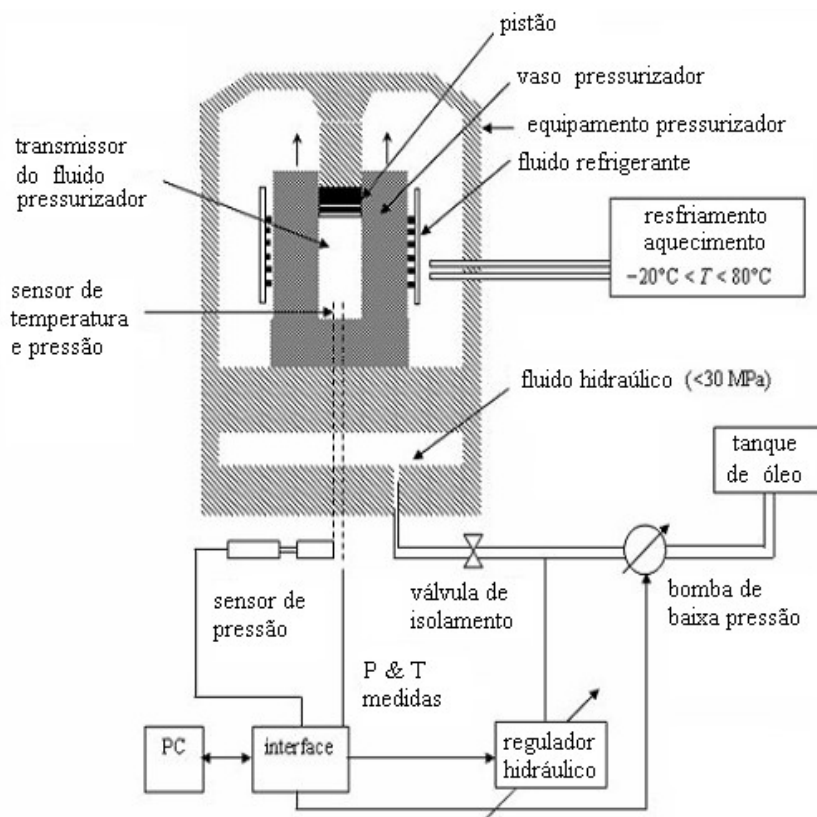
Mas, de acordo com FDA (2000), quando se deseja aumentar a produção do sistema por batelada, emprega-se o modo de operação semicontínuo. Nesse, vários recipientes de pressão são colocados em seqüência e, enquanto alguns estão em pressão constante, outros estão sendo pressurizados, carregados ou descarregados, reduzindo o tempo entre os processos e permitindo a recuperação de energia no equipamento utilizado. Desse modo, o pistão que gera a pressão fica livre, podendo atuar sobre vários recipientes.

De acordo com Campos et al. (2003) os produtos líquidos, por exemplo, podem ser submetidos à pressão mediante sistema semicontínuo (dentro ou fora da embalagem), constituído de três vasos de pressão e sistema de válvulas automáticas. Após o processamento, o produto é envasado assepticamente, caso a pressurização seja diretamente sobre o produto líquido não embalado.

Já o modo de operação contínuo pode apenas ser utilizado para alimentos líquidos, conforme anteriormente considerado, pois o equipamento é composto por tubos ou recipientes de retenção que promovem um tempo de tratamento específico para o processo e após o processamento, o alimento é acondicionado em tanques estéreis para posterior embalagem (MERTENS; DEPLACE, 1993).

De acordo com Mertens e Deplace (1993); Sangronis et al. (1997), existem três tipos de processos básicos de tratamento de APH, com ou sem variação de temperatura que são os processos em que se aplicam de 50 a 600 MPa e baixas temperaturas, denominados de alta pressão isostática a frio, que são técnicas essencialmente usadas na indústria de metal, cerâmica, carbono-grafite e plásticos, alcançando maior aplicação na indústria de alimentos; processos nos quais a pressão é aplicada em combinação com temperaturas, que variam entre 25 e 200°C, denominados de pressão isostática em média temperatura e pressões em que se aplicam pressões de 100 a 400 MPa em combinação com temperaturas que podem chegar a 2.200°C, denominados de pressão isostática em alta temperatura, processo aplicado às indústrias de metais e cerâmicas.

A Figura 2 representa o diagrama esquemático do equipamento de alta pressão hidrostática, segundo Buzrul et al. (2007).



**Figura 2.** Diagrama esquemático do equipamento de alta pressão hidrostática. Adaptado de Buzrul et al. (2007).

O processamento por alta pressão pode ser de forma contínua ou em pulso, sendo a primeira mais comumente utilizada. Na forma contínua, o alimento é pressurizado por um período de tempo contínuo e mais longo. Já na forma de pulso, a operação do equipamento é programada para uma série de ciclos de pressurização (pressão - despressurização - pressão) por,

normalmente, um período curto de tempo, sem retirá-lo da câmara. Dessa forma, o alimento sofrerá os efeitos associados de vários processos subsequentes de pressurização e despressurização (FARKAS; HOOVER, 2000).

O sistema de APH consiste de vaso de pressão, gerador de pressão, fluido condutor de pressão, dispositivo de controle de temperatura e recipiente para condicionamento do produto (CALDERÓN-MIRANDA et al., 1998). O vaso de pressão, cerne do sistema, em muitos casos é um cilindro monolítico construído em aço inoxidável de alta resistência à tensão. Determina-se a pressão máxima desse vaso pela pressão máxima de trabalho, diâmetro do vaso e número de ciclos para o qual foi projetado (MERTENS, 1995).

O alimento é acondicionado em embalagens flexíveis, inserido na câmara de pressão; a câmara é fechada e preenchida como meio de transmissão da pressão, eliminando todo o ar. O processo de pressurização é iniciado e ao final do ciclo a câmara é despressurizada (FARKAS; HOOVER, 2000; ZIMMERMAN; BERGMAN, 1993).

Segundo Farkas e Hoover (2000), pode ser utilizada para acondicionamento dos produtos processados por alta pressão qualquer embalagem com flexibilidade suficiente para compensar a compressão do ar no seu interior e a redução do volume do alimento (aproximadamente 12% a 400 MPa, ou até 15% em pressões acima de 500 MPa). Por isso as embalagens utilizadas devem possuir capacidade de redução e da subsequente expansão ao formato original, sem perda da integridade do material e da selagem utilizada.

A energia mecânica de pressurização, dentro do recipiente, resulta em uma geração de calor moderada e temporária que é chamada de calor adiabático, onde a cada 100 MPa de pressão, a temperatura dentro do recipiente é aumentada de 3 a 6°C, que pode variar conforme o tipo de sistema, a natureza do produto, a temperatura do processo e a pressão aplicada (ANSTINE, 2003; BUTZ; TAUSCHER, 2002; FARKAS; HOOVER, 2000). Por exemplo, se o alimento contém uma quantidade significativa de gordura, o aumento da temperatura será maior.

Os fluidos típicos usados em recipientes de pressão para a esterilização de alimentos incluem, além da água, glicerol, álcool 70%, óleos comestíveis e emulsões aquosas de óleos comestíveis (MEYER et al., 2000).

De acordo com Hayashi (1989), uma das vantagens deste processo é a possibilidade de utilizar o sistema para vários alimentos, sem o risco de contaminação cruzada ou a necessidade de limpeza entre um processamento e outro, pois os alimentos já foram previamente embalados e, segundo Cheftel (1995), o processamento utilizando o alimento embalado elimina qualquer risco de contaminação, com lubrificantes ou com qualquer outra parte mecânica do equipamento. Não é necessário a sanitização entre um produto e outro, eliminando qualquer possibilidade de contaminação do mesmo.

Antes da pressurização, é necessário um certo tempo inicial para que o equipamento atinja a pressão de trabalho (*come up time*). Em seguida, a pressão é mantida pelo tempo que foi programado e, ao final do processo, a pressão é equalizada à pressão ambiente, em apenas alguns segundos, a partir dos quais o alimento pode ser retirado (BARBOSA-CÁNOVAS; RODRÍGUEZ, 2002).

### **2.1.3. Produtos disponíveis no mercado mundial tratados por alta pressão**

Os produtos alimentícios processados por alta pressão estão chegando aos mercados ao redor do mundo. A França foi o primeiro país na Comunidade Européia a ter estes produtos comercialmente disponíveis. Desde 1994, a *Ulti* tem usado o processo de alta pressão (400 MPa) para estender a validade comercial de seus sucos cítricos frescos de 6 para 16 dias sob

refrigeração. Isto reduziu problemas de logística de transporte, além de preservar o gosto e conteúdo de vitaminas do suco (DONSI et al., 1996).

Segundo relatos de Donsí et al. (1996), o suco estabilizado apresentou validade comercial de pelo menos dois meses em condições refrigeradas (8°C), e no momento do relato, a companhia *Ulti* possuía vários outros produtos em desenvolvimento, como patê de fígado, de pato e produtos de “*delicatessen*”.

A esterilização a alta pressão pode também ser aplicada a pratos como macarrão, queijo, frango, “fettuccine” de salmão, “ravióli”, e “stroganoff de carne”, mantendo o sabor, textura e cor de alimento fresco (MEYER et al., 2000). Alguns exemplos de produtos cárneos tratados sob pressão comercialmente disponíveis estão citados na Tabela 1. (SÁN MARTÍN et al., 2002).

**Tabela 1.** Relação de países, processos de APH, embalagem e validade comercial de produtos cárneos disponíveis no comércio mundial, tratados por alta pressão hidrostática.

País (ano)	Produto	Processo	Embalagem	Validade comercial	Observações
Espanha (1998)	Presunto cozido fatiado	400 MPa/10 min a 8°C	Vácuo ou com gases	2 meses	Sem alterações de cor ou sabor. Aumento da validade comercial
EUA (2001)	Presunto cozido fatiado e presunto de Parma		Vácuo		Sem alterações de cor ou sabor. Destruição de <i>Listeria</i> spp. Aumento da validade comercial.
EUA (2001)	Preparações culinárias de ave (prontas para servir)		Plásticos embalados com gases a vácuo		Sem alterações de cor ou sabor. Destruição de <i>Listeria</i> spp. Aumento da validade comercial.
EUA (2002)	Frango temperado pré-cozido fatiado		Vácuo	21 dias	Sem alterações de cor ou sabor. Destruição de <i>Listeria</i> spp. Aumento da validade comercial
Espanha (2002)	Presunto em fatias finas, produtos de frango e peru.	500 MPa, 4 a 10 min a 8°C.	Vácuo	2 meses para produtos cozidos	Sem alterações de cor ou sabor. Destruição de <i>Listeria</i> spp. Aumento da validade comercial com redução dos conservadores.
Itália (2003)	Presunto de Parma, salame e mortadela	600 MPa por 10 min a 7°C.	Vácuo		Sem alterações da cor ou sabor. Destruição de <i>Listeria</i> spp. Aumento da validade comercial.
Japão (2005)	Salsicha, bacon, presunto	600 MPa por 5 min a 5°C	Vácuo	4 semanas	Aumento da validade comercial
Alemanha (2005)	Presunto alemão defumado: produtos inteiros e fatiados	600 MPa por 2min a 5°C.	Vácuo		Destruição de <i>Listeria</i> spp. Produtos para exportação para EUA. Aumento da validade comercial.

Fonte: Sán Martín et al. (2002).

Na Espanha, o processamento a alta pressão está sendo aplicado a presunto fatiado e outros produtos cárneos. Estes são embalados em embalagens flexíveis que são usadas na

unidade industrial de pasteurização a frio. São preservados o sabor e a textura de presunto fresco e a validade comercial é de 60 dias sob refrigeração. O exemplo de uma companhia da Espanha que utiliza alta pressão é a *España S. A Company in Olot* (GRANT et al., 2000). Tal fato é confirmado por San Martín et al. (2002), que relata que desde 2002 está sendo comercializado na Espanha presunto fatiado tratado sob alta pressão, e que, com o uso dessa tecnologia, a validade comercial do presunto passou de três para oito semanas.

Nos EUA, a primeira companhia a produzir alimentos processados sob alta pressão foi a *High Pressure Research*, localizado em Corvallis, Oregon. Sua pesquisa inclui ostras, salmão, iogurte, frutas e sucos de frutas com vida-de-prateleira de até 60 dias sob refrigeração. O guacamole processado por alta pressão, que é fabricado no México pela *Avomex* está disponível no mercado dos EUA (GRANT et al., 2000).

Os custos envolvidos na aquisição dos equipamentos ainda limitam o uso dessa tecnologia. Avanços têm sido realizados no desenho e construção desses equipamentos, para tornar os custos dos mesmos mais competitivos em relação à esterilização e ao congelamento. No entanto, estima-se que os custos operacionais decorrentes do processamento de um produto por alta pressão sejam bastante acessíveis, em torno de US\$ 0,0455/libras, já considerando-se a depreciação do equipamento como sendo de 10 anos (MEYER et al., 2000).

O tratamento à alta pressão ainda é de alto custo, principalmente devido ao alto capital inicial e a depreciação do equipamento, o que ainda limita a sua aplicação a produtos de alto valor agregado, considerando a taxa de retorno desejável do investimento. Entretanto, pode-se esperar que estes custos venham a se tornar mais acessíveis, como uma consequência do desenvolvimento tecnológico e aumento de escala de processo, com o incremento do aceite da tecnologia pelo consumidor, implicando o surgimento de novos produtos nos mercados. Salienta-se que estudos têm demonstrado que os consumidores não tem apresentado uma percepção negativa com o APH, como acontece relativamente à irradiação de alimentos (DELIZA et al., 2005), podendo-se associar sua utilização a um conceito positivo e desejável, pelos benefícios advindos da tecnologia.

#### **2.1.4. Efeito da alta pressão sobre os microrganismos**

Uma maneira de melhorar a qualidade do alimento é através da inativação dos microrganismos que causam contaminação e deterioração. Atualmente, o método mais usado para a inativação de bactérias, fungos e leveduras é o processamento térmico, porém, a alta pressão também pode ser efetiva. A extensão da inativação depende de vários fatores, inclusive da magnitude e duração da pressurização, das espécies microbianas, da temperatura do processamento e do tipo de substrato (GRANT et al., 2000).

Os primeiros estudos que avaliaram o efeito da pressão hidrostática sobre microrganismos em alimentos foram realizados na França, por Certes, em 1884, e nos Estados Unidos, por Hite, entre 1899 e 1914. A partir de então, outros pesquisadores têm se dedicado ao estudo da alta pressão em alimentos (CHEFTEL, 1995).

A APH produz alterações morfológicas, bioquímicas e genéticas que ocorrem na membrana e na parede celular dos microrganismos (SANGRONIS et al., 1997). Além disso, aumenta a permeabilidade da célula, inibe reações energéticas e desnatura enzimas essenciais ao crescimento e à reprodução microbiana (CALDERÓN-MIRANDA et al., 1998).

Segundo Sán-Martín et al. (2002); Hugas et al. (2002) o efeito da pressão sobre os microrganismos depende de fatores relacionados com os microrganismos propriamente ditos (espécie, formato, Gram, fase de crescimento e idade da cultura), com a natureza do meio (pH,

composição do alimento ou meio de dispersão, presença de sais e/ou nutrientes, atividade de água, força iônica e tipos de íons presentes) e com as variáveis de pressão (níveis de pressão, tempo e temperatura e tipo do tratamento, se é contínuo ou descontínuo).

O modo de ação da pressão em microrganismos depende do nível de pressão aplicado. Pressões entre 30 e 50 MPa podem influenciar a expressão do gene e a síntese de proteínas. Dependendo da pressão aplicada, pode ainda haver a ruptura da membrana celular de microrganismos e a alteração da estrutura de enzimas ocasionando, desta maneira, a sua destruição e desnaturação, respectivamente. Pressões acima de 100 MPa podem afetar a membrana nuclear de leveduras e, acima de 400 MPa, causar alterações em nível de mitocôndrias e de citoplasma, e íons metálicos são liberados em pressões acima de 300 MPa (SMELT, 1998).

De acordo com Cheftel (1995), as bactérias Gram positivas são mais resistentes aos efeitos da APH do que as Gram negativas. Os fungos filamentosos e leveduras são em geral muito sensíveis, enquanto que os vírus são bastante resistentes. Campos et al. (2003) citaram que a parede celular das bactérias Gram positivas é mais fina, quando comparada com a estrutura das Gram negativas, e a rigidez da parede celular confere fragilidade à estrutura em função da pouca flexibilidade frente à aplicação da APH.

O tratamento de APH pode garantir a destruição de até 8 ciclos logarítmicos de células bacterianas, sem alterar o sabor e o valor nutricional dos alimentos (DOGMAN; ERKMEN, 2004; KALCHAYANAND et al., 1998).

Várias mudanças morfológicas são observadas com o aumento da pressão, como compressão de vacúolos gasosos, alongamento da célula, separação da membrana da parede celular, contração da parede celular com formação de poros, modificações no citoesqueleto, modificações no núcleo e em organelas intracelulares, coagulação de proteínas citoplasmáticas e liberação dos constituintes intracelulares para o meio extracelular, entre outros (CAMPOS et al., 2003).

As moléculas de DNA são mais estáveis a APH do que as proteínas devido ao fato da alta pressão favorecer as pontes de hidrogênio, principal responsável pela estrutura dos ácidos nucleicos. Contudo, o processo de replicação e transcrição do DNA é inibido quando as células são submetidas a APH, pela inativação das enzimas envolvidas nesses processos (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 1999).

De acordo com Cheftel (1995); Hugas et al. (2002), a inativação dos microrganismos pela APH é, provavelmente, o resultado de diversos fatores, onde a APH não inibe ou destrói um local específico da célula ou exerce uma única função celular, mas ocasiona a morte pelo acúmulo de danos no interior celular. A membrana celular é o primeiro alvo dos danos causados pelas altas pressões, principalmente pelo efeito de cristalização dos fosfolipídios, alterando sua permeabilidade. Outras funções celulares sensíveis aos efeitos da pressão envolvem a troca de íons, a composição de ácidos graxos, a morfologia dos ribossomos, a desnaturação protéica, a atividade enzimática e a replicação do DNA.

As cinéticas de inativação por alta pressão são significativamente diferentes da térmica e de outros métodos de processamento de alimentos. Por exemplo, um número pequeno, mas significativo, de microrganismos pode sobreviver ao tratamento de alta pressão (GRANT et al., 2000).

Um nível de pressão elevado geralmente leva ao aumento da inativação dos microrganismos, entretanto, o aumento da duração do tratamento de alta pressão não potencializa necessariamente seu efeito letal. Em geral, as células bacterianas vegetativas podem ser inativadas em pressões entre 400 e 600 MPa, enquanto que os esporos podem suportar até 1000MPa em temperatura ambiente (PALOU et al. 1999).



A Tabela 2 apresenta dados sobre as condições de pressão para inativação de alguns microrganismos, de acordo com Chiavaro e Bonardi (1999).

**Tabela 2.** Microrganismos e as pressões necessárias para sua inativação.

Microrganismo	Pressão (MPa) para inativação
Bactérias Gram negativas	300
Bactérias Gram positivas não esporuladas	400-600
Leveduras e fungos não termorresistentes	400
Esporos de bactérias Gram positivas	700-800 <i>Bacillus spp</i> e 900 <i>Clostridium spp</i>
Esporos de fungos termorresistentes	700-800

Fonte: Chiavaro e Bonardi (1999).

Parish (1998) utilizou parâmetros de inativação microbiológica relacionados ao tratamento hidrostático análogos àqueles utilizados em termobacteriologia, onde D é o tempo de tratamento, a uma determinada pressão, necessário para reduzir em um ciclo logarítmico uma população de microrganismos; valor z é o aumento na pressão de tratamento necessário para reduzir em um ciclo logarítmico o valor de D. Na Tabela 3 é representada uma comparação de resistência à pressão hidrostática de alguns microrganismos de interesse em alimentos (CHIAVARO; BONARDI, 1999).

**Tabela 3** – Pressões usadas para inativação de microrganismos patogênicos.

Microrganismo	Pressão MPa	D (min)	T (°C)	Substrato
<i>Clostridium pasteurianum</i>	700	2,4	60	n.i.
<i>Clostridium pasteurianum</i>	800	3,4	60	n.i.
<i>Citrobacter freundii</i>	230	14,7	20	n.i.
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>1</sup>	414	2,17	25	n.i.
<i>Salmonella senftenberg</i>	414	1,48	2	n.i.
<i>Listeria innocua</i> <sup>2</sup>	400	3,12	2	n.i.
<i>Listeria innocua</i> <sup>2</sup>	400	4	25	n.i.
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>3</sup>	200	211,8	20	n.i.
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>3</sup>	250	15	20	n.i.
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>a</sup>	300	3,7	20	n.i.
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>a</sup>	350	2,6	20	n.i.
<i>Listeria innocua</i>	400	7,35	2	n.i.
<i>Listeria innocua</i>	400	8,23	20	n.i.
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>1</sup>	150	84,4	4	Leite cru
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>1</sup>	250	46,0	4	Leite cru
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>1</sup>	300	26,6	4	Leite cru
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>1</sup>	350	13,9	4	Leite cru
<i>Sacharomyces cerevisae</i>	350	0,64*	n.i.	Suco de laranja
<i>Sacharomyces cerevisae</i>	500	0,02*	n.i.	Suco de laranja
<i>Sacharomyces cerevisae</i> <sup>3</sup>	350	1,27**	n.i.	Suco de laranja
<i>Sacharomyces cerevisae</i> <sup>4</sup>	500	0,07*	n.i.	Suco de laranja

Fonte: Chiavaro e Bonardi (1999). <sup>1</sup>Scott A, <sup>2</sup>910CECT, <sup>3</sup>ATCC 27690, <sup>4</sup> ascósporos, \* z = 106 MPa, \*\* z = 123 MPa, n.i. = não informado.

As formas vegetativas dos eucariotos, tais como os fungos e leveduras, são inativadas por pressões entre 200 e 300 MPa. Bactérias Gram positivas são mais resistentes ao calor e à pressão

do que as bactérias Gram negativas. Segundo Patterson et al. (2005), o tratamento a alta pressão não inativa completamente microrganismos e uma pequena proporção da população sofre injúria.

Para inativar as células vegetativas, em geral, é necessário aplicar pressões superiores a 200 MPa. Para a inativação da maioria das bactérias Gram positivas são necessários tratamentos a 500 a 600 MPa a 25°C por 10 minutos, enquanto que as Gram negativas são inativadas com tratamentos de 300 a 400 MPa por 10 minutos (TRUJILLO et al., 1997). A Tabela 4 mostra a sensibilidade de algumas bactérias à alta pressão hidrostática.

**Tabela 4.** Microrganismos, substrato, condições de tratamento de APH e a inativação logarítmica.

Microrganismo	Substrato	Condições tratamento	Inativação (reduções log)
<b>Esporos de bactérias</b>			
<i>Clostridium botulinum</i> tipo E	Tampão fosfato (pH 7,0)	827 MPa/5 min./50°C	5
<i>Clostridium sporogenes</i>	Peito de frango	680 MPa/20 min./80°C	2
<i>Clostridium sporogenes</i>	Emulsão de carne	621 MPa/5 min./98°C	>5
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Água	600 MPa/6x5 min. ciclos/70°C	5
<b>Células vegetativas de bactérias</b>			
<i>Campilobacter jejuni</i>	Patê de presunto	300 MPa/10 min./25°C	6
<i>Salmonella senftenberg</i> 775W	Alimento infantil	340 MPa/10 min./23°C	<2
<i>Escherichia coli</i> O147:H7	Leite UHT	600 MPa/15 min./20°C	<2
	Carne de ave		3
<i>Staphilococcus aureus</i>	Leite UHT	600 MPa/15 min./20°C	2
	Carne de ave		3
<i>Listeria monocytogenes</i>	Leite UHT	375 MPa/15 min./20°C	<1
	Carne de ave		2
<i>Vibrio parahaemoliticus</i> O3:K6	Ostras	300 MPa/3 min./10°C	5
<i>Listeria helveticus</i>	Leite de ovelha	500 MPa/10 min./10°C	3
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Leite de ovelha	450 MPa/10 min./10°C	4

Fonte: Patterson (2005).

O nível de pressão elevado, geralmente, leva ao aumento da inativação dos microrganismos, entretanto, o aumento da duração do tratamento de alta pressão não potencializa necessariamente seu efeito letal (PALOU et al., 1999).

Dogman e Erkmen (2003) mostraram que a sensibilidade de *Escherichia coli* inoculada em meio de cultura e submetida à APH foi maior com a elevação do nível de pressão do que com o aumento do tempo de exposição ao tratamento, mas não existe relação proporcional entre o aumento do nível de pressão e a redução da população microbiana. Ainda, Kalchayanand et al. (1998) sugeriram que a pressurização por longo tempo associada com baixo nível de pressão, utilizado para minimizar efeitos adversos na textura e cor do alimento, pode não ser vantajosa para a inativação microbiana.

A Tabela 5 mostra alguns dos exemplos de inativação de microrganismos em alimentos e soluções tampão pela alta pressão hidrostática (SAN MARTÍN, et al., 2002; PATTERSON et al., 1995).

**Tabela 5** – Exemplos de inativação de microrganismos tratados pela APH.

Microrganismo	Tratamento	Substrato	Inativação (log)
<i>Staphylococcus aureus</i>	500 MPa , 15 min, 25°C	Leite	3,4
	600 MPa, 30 min, 20°C	Leite UHT	3,0
	600 MPa, 30 min, 20°C	Tampão fosfato	2,2
	400 MPa, 20 min, 20°C	Tampão fosfato	9,0
	500 MPa, 15 min, 55°C	Carne bovina	2,0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	550 MPa, 5 min, 30°C	Suco de laranja (pH=3,7)	7,0
	700 MPa, 30 min, 20°C	Carne de ave	3,0
<i>Escherichia coli</i> MG1655	500 MPa, 15 min, 20°C	Leite	1,4
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	375 MPa, 15 min, 20°C	Tampão fosfato	2,0
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 2433	375 MPa, 15 min, 20°C	Tampão fosfato	6,0
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	200 MPa, 5 min, 20°C	Geléia de maçã	2,8
<i>Listeria monocytogenes</i>	340 MPa, 60 min, 23°C	Leite UHT	7,0
<i>Listeria innocua</i> CECT 910	450 MPa, 10 min, 20°C	Ovo	6,63
<i>Salmonella typhimurium</i>	400 MPa, 15 min, 20°C	Tampão fosfato	6,2
<i>Salmonella enteritidis</i>	500 MPa, 1 min, 20°C	Tampão fosfato	7,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	253 MPa, 10 min, 25°C	Molho espaguete	3,0
<i>Campylobacter jejuni</i>	30 MPa, 10 min; 25°C	Carne suína	6,0

Fonte: Sán Martín et al. (2002); Patterson et al. (1995).

A APH representa um atrativo nos processos não térmicos para o processamento de carnes, especialmente com relação à contaminação pós-processamento (GARRIGA et al., 2002). No entanto, há poucos estudos até o momento empregando esta tecnologia no aumento da validade comercial de presuntos fatiados.

Trabalhos realizados comprovaram que a aplicação da APH por pulso é mais eficiente do que pelo método contínuo para inativação de microrganismos (ALEMÁN et al., 1996; PALOU et al., 1998). Isso é devido a grande injúria causada na membrana celular em função da rápida e grande diferença de pressão na interface da membrana intracelular e extracelular, porém, a APH em pulsos possui custo mais elevado e promove maior desgaste do equipamento (CHEFTEL, 1995). Logo, a aplicação de repetidos pulsos requerem equipamentos mais sofisticados, capazes de aumentar e decair a pressão rapidamente e aplicar repetidas sequências de ciclos de pressão (DONSI et al, 2007).

### 2.1.5. Fatores extrínsecos que afetam a sensibilidade dos microrganismos a alta pressão

De acordo com estudos realizados por Patterson et al. (1995); García-Graells et al. (1999), a sensibilidade do microrganismo à pressão é extremamente dependente da matriz do alimento, as bactérias classificadas como “barossensíveis” em estudos com tampões podem tornar-se barorresistentes em matriz complexa. Os constituintes dos alimentos e de meios enriquecidos parecem proteger os microrganismos do efeito da APH, enquanto que soluções não-nutritivas parecem reduzir a barotolerância dos microrganismos (PALOU et al., 1999; DOGMAN;

ERKMEN, 2003). Alguns constituintes dos alimentos como proteínas, vitaminas, carboidratos e lipídios exercem efeito baroprotetor (SIMPSON; GILMOUR, 1997; PATTERSON et al., 1995), motivo pelo qual muitos microrganismos apresentam maior resistência à pressão quando tratados em alimentos.

A capacidade de destruição ou inativação de microrganismos pelo processo de APH varia conforme o nível, o tempo e a temperatura de pressurização, o tipo e a fase de crescimento do microrganismo, além da composição do meio ou do alimento, como o pH e atividade de água (CALDERÓN-MIRANDA et al., 1998; ROSENTHAL; SILVA, 1997). Os fatores que influenciam a inativação dos microrganismos devem ser conhecidos e otimizados a fim de se obter um produto com qualidade e segurança, sob o ponto de vista microbiológico (SANGRONIS et al., 1997).

Segundo Cheftel e Culioli (1997), a resistência dos microrganismos à pressão aumenta com o decréscimo da atividade de água, isso porque a mesma tem sido considerada como efeito baroprotetor nos microrganismos. Segundo Smelt (1998), foi verificado que na mesma atividade de água, células se mostraram mais sensíveis à pressão em presença do glicerol do que em monossacarídeos e dissacarídeos.

Em relação ao pH, foi verificado que bactérias são bem mais sensíveis em pH baixo e vários estudos têm demonstrado a eficiência da utilização de baixas pressões para inativação de muitas bactérias vegetativas barorresistentes em alimentos ácidos (GARCÍA-GRAELLS et al., 1999; ALPAS et al., 2000; JORDAN et al., 2001).

O pH de soluções ácidas também diminui com o aumento da pressão (HEREMANS, 1995; PATTERSON, 2005) e essa mudança de pH que ocorre durante o tratamento pode ser medida diretamente em alimentos líquidos, mas ainda não foram desenvolvidos métodos para mensurar a variação de pH de alimentos sólidos (HAYERT et al., 1999).

Quando a pressão é restabelecida, o pH volta ao seu valor original, mas ainda não se sabe se essa mudança no pH afeta a sobrevivência dos microrganismos durante a aplicação da pressão, sabe-se que o pH e a pressão podem agir sinergisticamente aumentando a inativação microbiana. É que com a diminuição do pH, as células ficam mais susceptíveis à inativação ou à injúria subletal causada pela pressão que leva à rápida morte da bactéria (LINTON et al., 1999).

A temperatura é outro fator que durante o tratamento por APH exerce efeito extremamente significativo na inativação de microrganismos e geralmente, a inativação é aumentada acima ou abaixo de 20°C (TAKAHASHI et al., 1992; PATTERSON, 2005). O processamento por APH sob refrigeração, temperatura ambiente ou aquecimento moderado, pode inativar microrganismos patogênicos ou deteriorantes em diferentes níveis, com poucas mudanças no frescor dos produtos quando comparado com o processo de conservação convencional (TORRES; VELAZQUEZ, 2005). Pode também ser usado como método de esterilização de produtos alimentícios se aplicado em temperaturas elevadas (60-90°C), ou utilizar a compressão adiabática para o aquecimento, porém, para tal, deve-se combinar pressão e temperatura objetivando a inativação de esporos e enzimas.

O efeito negativo da esterilização convencional na qualidade do produto deve-se ao intenso tratamento térmico, mas a alta pressão sozinha ainda é incapaz de inativar esporos bacterianos, sendo necessária sua combinação com outras técnicas como certa elevação da temperatura (KREBBS et al., 2003).

## **2.2. Microbiologia**

### **2.2.1. Fatores que influenciam o crescimento de microrganismos nos alimentos**

A capacidade de sobrevivência ou de multiplicação dos microrganismos presentes em um alimento depende de fatores que podem estar relacionados ao próprio alimento (fatores intrínsecos) ou relacionados ao ambiente em que esse alimento se encontra (fatores extrínsecos) (ARCHER, 1996;). Os fatores intrínsecos são aqueles relacionados a composição dos alimentos, como exemplo os nutrientes, inibidores, estrutura biológica, acidez, água e presença de microrganismos competidores. Já os fatores extrínsecos são aqueles ligados ao meio no qual os alimentos se encontram, como por exemplo, a temperatura, umidade relativa e nível de oxigênio (ASHRAE, 1998). Dentre os fatores intrínsecos, a atividade de água constitui em um dos pontos fundamentais para o desenvolvimento microbiano, considerando a necessidade de água livre para sobrevivência, metabolismo e multiplicação dos microrganismos (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

O alimento pode exercer um forte efeito bacteriostático e até mesmo bactericida sobre os microrganismos, dependendo de suas propriedades intrínsecas como a atividade de água (Aa), o pH, o potencial de oxirredução (Eh), composição química do alimento e a exclusão competitiva da microbiota. Além disso, como fatores adicionais para o controle dos microrganismos podem ser citados os fatores extrínsecos relacionados ao ambiente como a temperatura, a composição gasosa do meio e a umidade e, no âmbito industrial, o processamento tecnológico dos alimentos. Estes devem tornar o produto seguro, caso os microrganismos tenham conseguido superar as barreiras do alimento e a do próprio ambiente (WESCHE et al., 2009).

O desenvolvimento microbiano depende muito da temperatura, devendo, portanto ser controlado constantemente e está fortemente relacionado com o tempo disponível para a multiplicação microbiana (CREMER; CHIPLEY, 1980). De acordo com Franco e Landgraf (2003), este talvez seja o fator mais importante que afeta a multiplicação dos microrganismos, que são muitas vezes capazes de se multiplicar em uma ampla faixa de temperatura.

De acordo com Busta (1976); Wesche et al. (2009), as condições de crescimento presentes no alimento e no ambiente podem interferir nas estruturas e funções celulares, afetando diretamente na suscetibilidade às injúrias sofridas. Esses fatores também possuem relação direta no processo de reparação dos microrganismos após a injúria.

### **2.2.2. Injúria de microrganismos**

Os procedimentos ou técnicas para a conservação de matérias primas ou para o processamento tecnológico dos alimentos utilizam-se de métodos de natureza física ou química que acabam por exercer um efeito deletério variável sobre os microrganismos presentes nos alimentos. Dentre os métodos existentes verifica-se que o aquecimento, congelamento, refrigeração, desidratação, irradiação, salga, acidificação, utilização de conservadores, desinfetantes, antimicrobianos naturais e compostos químicos são fatores capazes de provocar a injúria de células e até de esporos (BUSTA, 1976; RAY, 1979; WU et al., 2001a).

Segundo Busta (1976), injúria celular pode ser definida como uma célula que sobreviveu a um estresse, porém perdeu uma ou mais de suas qualidades distintivas. A injúria é, assim, a consequência de processos físicos ou químicos que danificam, mas não destroem os microrganismos (RUSSELL, 1984).

As injúrias implicam em lesões nas estruturas celulares e a conseqüente perda das funções, sendo de natureza temporária ou até mesmo permanente, fator este que depende dos tipos de tratamentos aplicados durante o processamento de alimentos (ZHAO; DOYLE, 2001).

Após o processamento tecnológico, a população de microrganismos existente no alimento inclui células mortas (após sofrerem injúrias letais ou irreversíveis), células normais (não injuriadas) e as células injuriadas, estressadas ou que sofreram injúrias subletais ou reversíveis, compondo cerca de 40% da população total (RAY, 1979; RUSSELL, 1984; WU et al., 2001b; WU, 2008).

Para Hartsell (1951), as células injuriadas são aquelas que conseguem formar colônias apenas em meios não-seletivos, visto que os meios seletivos possuem agentes que acabam por inviabilizar o processo de reparação dos danos celulares ocorridos, não proporcionando condições adequadas para a multiplicação celular. Segundo os relatos de Busta (1976); Ray (1989); Shintani (2006), as células injuriadas apresentam uma extensão da fase lag, fase de adaptação da curva de multiplicação microbiana, quando comparada com células não injuriadas, a fim de reparar os danos sofridos e sintetizar as proteínas e os ácidos nucléicos necessários à multiplicação microbiana.

Os microrganismos ao sofrerem injúrias subletais evidenciam características que os diferem das células normais, destacando-se a incapacidade de multiplicação e formação de colônias em meios seletivos, aumento da fase lag, ausência de turbidez em caldo e baixo acúmulo de metabólitos finais (BUSTA, 1976; ARCHER, 1996; CORRY et al., 2003).

As injúrias promovidas por diversas causas acarretam modificações celulares, por isso a diferenciação entre as células perante o seu comportamento. As injúrias celulares podem ser expressas como metabólicas, evidenciando a incapacidade das células em se desenvolverem em meios com quantidades mínimas de nutrientes e estruturais, perante a perda da capacidade de se multiplicar e até mesmo sobreviver em meios contendo agentes seletivos como sais biliares, telurito de potássio, desoxicolato de sódio, bismuto sulfito, azida sódica, cloreto de sódio, cristal violeta, verde brilhante e antibióticos (WU, 2008; WESCHE et al., 2009).

Muitas modificações celulares podem ocorrer nos microrganismos injuriados pela ação de agentes físicos e químicos, incluindo a perda de material celular como  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ , aminoácidos, danos na parede celular, membrana citoplasmática, ribossomos, RNA, DNA e enzimas (LEITÃO, 1985; CORRY et al., 2003).

#### **2.2.2.1. Os efeitos e modificações nas células injuriadas**

As injúrias celulares que afetam a parede celular são mais evidentes em bactérias Gram-negativas, fato este que não exclui a existência de lesões nas Gram-positivas, lesões estas mais ligadas ao ácido teicóico, componente importante da parede celular, que está relacionado ao movimento de cátions (íons positivos) entre os meios intracelular e extracelular (LEITÃO, 1985).

A membrana externa em microrganismos Gram-negativos protege a célula contra enzimas digestivas, como a lisozima, sais biliares, detergentes, metais pesados e alguns antibióticos, porém devido a sua conformação permite a difusão de alguns nutrientes de baixo peso molecular para o espaço periplasmático para que estes participem do sistema de transportes presente na membrana citoplasmática (WESCHE et al., 2009). Se a membrana externa for danificada, as células se tornam sensíveis e serão incapazes de se multiplicarem em meios seletivos contendo sais biliares ou corantes, como por exemplo, os ágaros MacConkey ou Verde Brilhante (CORRY et al., 2003). Este comportamento é típico de células expostas ao calor, choque pelo frio, congelamento, desidratação e alta pressão. De acordo com relatos de Pagan e Mackey (2000), há

uma forte relação entre os danos na membrana externa e a perda da viabilidade de células após tratamento com alta pressão hidrostática.

De acordo com Palumbo (1989); Cunha et al. (1998); Jay et al. (2005); Wu (2008), a membrana celular caracteriza-se como a estrutura mais afetada e a injúria resulta no extravasamento de componentes essenciais, principalmente os que possuem absorção entre 260nm, como por exemplo, ácidos nucleicos, e 280nm (proteínas), além de  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , aminoácidos, lipídeos e fosfolipídios, levando a um prejuízo no metabolismo celular.

A degradação de ribossomos e RNA resulta em perda de componentes essenciais com absorção a 260 nm. Vanbogelen e Neidhart (1990); Wesche et al. (2009) relatam que os ribossomos funcionam como um sensor de condições e de temperatura, evidenciando a ocorrência de tratamento térmico.

De acordo com os relatos de Jay et al. (2005); Wu (2008), as células danificadas por injúria ácida apresentam apenas danos no RNA, se diferenciando dos danos causados por aquecimento e congelamento onde se evidencia o extravasamento de constituintes celulares e componentes essenciais com absorção na faixa de 260 a 280 nm. O grau de degradação do RNA é dependente da quantidade da perda de  $Mg^{2+}$ , sendo provável que o prejuízo celular seja regulado pelo grau de extravasamento dos componentes celulares, devido a danos na membrana citoplasmática, componente de grande importância na manutenção da viabilidade da célula (CORRY et al., 2003).

Sob condições de estresse por aquecimento, congelamento e descongelamento, desidratação e acidez, os danos no DNA são manifestados pela quebra ou ruptura da molécula ou apenas de uma única fita do DNA, em consequência da atividade de endonucleases (MACKEY, 2000; WESCHE et al, 2009).

#### **2.2.2.2. Recuperação de células injuriadas**

As células injuriadas, quando mantidas sob condições favoráveis, apresentam a capacidade de reparação, retornando assim ao estado fisiológico normal e podendo dar início a fase de divisão celular. A restauração da perda de capacidades em células injuriadas pode ser denominada como reanimação ou ressuscitação, visto que as células se mostram aparentemente inviabilizadas (WU, 2008).

A fase de reparação celular pode ser estimada pelo tempo de extensão da fase lag ou pelo método diferencial de contagem a ser empregado, porém deve-se levar em consideração que as células apresentam características individuais, podendo apresentar diferentes tipos e graus de injúrias (WESCHE et al., 2009).

De acordo com Wu (2008); Wesche et al. (2009), utilizando-se de meios não-seletivos, a fase lag é o tempo necessário para que os microorganismos restabeleçam suas características e iniciem a fase de divisão celular. Os métodos de contagens diferenciais utilizam-se de meios seletivos que contêm substâncias inibitórias aos microrganismos injuriados. Já os meios não seletivos proporcionam um ambiente favorável para a fase de reparação celular, devido à inexistência de fatores que prejudiquem os microrganismos injuriados.

Inicialmente, a fase de recuperação celular era realizada em meios líquidos, talvez pela percepção que nesses meios poderia ocorrer um período de incubação, sob condições ideais, porém, mais tarde, observou-se que a restauração poderia ocorrer também em meios sólidos (JAY et al., 2005; WU, 2008).

Essa fase de reparação é importante para que as células recuperem-se das injúrias sofridas e retomem sua capacidade de resistência aos compostos seletivos, e para que os métodos diferenciais de contagem possam ser utilizados (MACKEY, 2000; WESCHE et al., 2009).

Muitos processos metabólicos ocorrem durante a fase de recuperação celular destacando-se a síntese de DNA, RNA, ATP, proteínas, fosfolipídios, a reorganização de macromoléculas como os lipopolissacarídeos presentes em bactérias Gram-negativas e o ácido teicóico em bactérias Gram-positivas. A reparação da membrana citoplasmática pela síntese de lipídeos é um dos processos mais rápidos que ocorrem (RAY, 1989; CORRY et al., 2003; WU, 2008; WESCHE et al., 2009).

Os ribossomos degradados durante os tratamentos térmicos são regenerados e a reparação da membrana desta organela parece ser essencial para recuperação, pelo menos a partir de injúrias por calor, congelamento, desidratação e irradiação (RAY; ADAMS, 1984; MACKEY, 2000; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; WU, 2008).

A maioria das células injuriadas necessita de um período de 2 a 4 horas para a fase de reparação celular, destacando-se também a importância de uma temperatura de incubação adequada e um meio de cultura não-seletivo, rico em nutrientes (JAY et al., 2005; WU, 2008). Porém, de acordo com os relatos de Mackey (2000); Wesche et al. (2009), alguns microrganismos, após terem sofrido injúrias intensas, necessitam de longos períodos para efetuarem a reparação celular, citando uma faixa de 4 a 5 horas para a recuperação. Diferentemente, as injúrias brandas são reparadas mais rapidamente, tendo uma fase lag mais curta quando comparada com células com injúrias severas.

Segundo Wu (2008), as injúrias celulares acarretam prejuízos aos agentes patogênicos eliminando sua capacidade de causar doença, no entanto, uma vez que as células são reparadas, a patogenicidade é totalmente restaurada.

De acordo com as observações de Ray e Adams (1984); Wu (2008); Wesche et al. (2009), a natureza do estresse imposto sobre um microrganismo não influencia na reparação das lesões, porém a incubação deve ser feita em ambiente adequado. Durante a fase de incubação, as faixas de temperatura e o tempo necessário irão variar de acordo com o microrganismo envolvido e com os diferentes graus de injúrias sofridas. As células podem se recuperar completamente, inclusive sua virulência e, principalmente a resistência aos agentes presentes em meios de cultura seletivos. Sabe-se que o processo de reparação antecede a fase de multiplicação celular, portanto, é desejável permitir que os microrganismos injuriados tenham seus danos reparados antes do isolamento ou enumeração por procedimentos habituais.

### **2.3. Microbiologia preditiva**

O uso de modelos matemáticos na microbiologia de alimentos começou em aproximadamente 1920, com o desenvolvimento de métodos para calcular o tempo de destruição térmica de microrganismos. Na época, estes modelos revolucionaram a indústria de enlatados (GOLDBLITH et al., 1997).

Muitos autores sugerem que a microbiologia preditiva teve origem com Easty e Meyer, em 1922, na descrição de um processo térmico suficiente para destruir esporos do *C. botulinum*. A moderna microbiologia preditiva teve seu início nas décadas de 60 e 70, ainda para o tratamento de botulismo e outras intoxicações alimentares (McMEEKIN; ROSS, 2002).

Essa técnica foi aplicada, por exemplo, na determinação do número de *Bacillus cereus* no leite pasteurizado. Obteve-se boa correlação entre os dados previstos pelos modelos matemáticos usados e a contagem tradicional. Enfatiza-se, ainda, o baixo custo que representa fazer estas



estimativas usando modelos ao invés dos tradicionais testes em laboratório (ZWIETERING et al., 1996).

Segundo Farber (1986) a aceitação comercial da microbiologia preditiva era limitada, e apenas algumas companhias do ramo alimentício no Canadá, Estados Unidos e Inglaterra utilizavam a modelagem preditiva em suas operações.

Desse modo, a aplicação de técnicas de modelagem matemática para descrever o crescimento e sobrevivência de microrganismos em alimentos não recebeu muita atenção até a década de 80 (ROSS; McMEEKIN, 1994).

A partir de 1983 é que o potencial da microbiologia preditiva começou a atrair considerável interesse em pesquisa e financiamento, particularmente nos Estados Unidos e Reino Unido, e também na Austrália e outros países da Europa (ROSS; McMEEKIN, 1994).

McMeekin et al. (1993) apontaram dois fatores como responsáveis pelo crescente interesse na aplicação da microbiologia preditiva: o primeiro foi o aumento de casos importantes de intoxicação alimentar durante os anos 80, levando ao aumento da conscientização pública da necessidade da oferta de alimentos seguros. O segundo foi a constatação de muitos microbiologistas de que os métodos tradicionais na determinação de qualidade e segurança, inclusive os considerados rápidos, eram limitados pelo tempo de obtenção de resultados, e tinham um pequeno valor preditivo.

Buchanan (1993) apontou, ainda, um terceiro fator que contribuiu para o aumento no interesse da aplicação do conceito da microbiologia preditiva: a crescente facilidade de acesso aos computadores, visto que as ferramentas estatísticas, matemáticas e microbiológicas já existiam, mesmo antes da expansão dos estudos em modelagem. O grande empenho em pesquisa não teria sido de valor sem a habilidade de solucionar de forma rápida as complexas equações de modelagem.

Zwietering et al. (1991) afirmaram que a modelagem pode ser uma ferramenta útil para o levantamento da importância dos fatores relacionados a deterioração do produto em qualquer parte da produção e da cadeia de distribuição, e é baseada em predições quantitativas da taxa de deterioração. Tal modelagem, segundo estes autores, permite a predição da qualidade ou da validade comercial dos produtos, identificação dos pontos críticos de controle na produção, na distribuição e na otimização da produção e cadeia de distribuição, combinando para a melhor relação custo/benefício.

Ainda segundo Zwietering et al. (1991) os modelos podem ser usados para descrever a deterioração sob condições físicas ou químicas diferentes, como temperatura, pH e atividade de água. Whiting (1995) afirmou que o objetivo principal da microbiologia preditiva é descrever matematicamente o crescimento ou a diminuição de microrganismos presentes em alimentos, sob condições ambientais específicas. O autor cita que, com esta habilidade para descrever, vem a habilidade para prever combinações de condições onde não existem dados experimentais, dentro de uma faixa apropriada de cada condição. Estas condições ambientais incluem ambos os fatores, intrínsecos e extrínsecos.

O verdadeiro poder das abordagens feitas pela microbiologia preditiva é que, ao contrário do processo tradicional de estocagem, os modelos, uma vez validados, podem ser utilizados para prever com rapidez e segurança a resposta dos microrganismos em várias condições. Isto faz com que a microbiologia preditiva seja considerada uma ferramenta preciosa para os microbiologistas de alimentos, na tomada de decisão diária (McCLURE et al., 1994).

O interesse pela microbiologia preditiva na Europa resultou no surgimento e desenvolvimento de um programa, o Food Linked Agricultural and Industrial Research, que reúne cerca de trinta laboratórios em dez países da Comunidade Econômica Européia (CEE),

colaborando no estudo de respostas de crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes em diversos produtos naturais (ROSS; McMEEKIN, 1994). Nos Estados Unidos, as pesquisas em microbiologia preditiva são feitas pelo USDA, na Pensilvânia, no Microbial Food Safety Research, onde foi desenvolvido um “software” denominado “Pathogen Modeling Program” (PMP). No Reino Unido, este interesse contribuiu para o desenvolvimento do *software* Food Micromodel (ROSS; McMEEKIN, 1994).

As vantagens potenciais da microbiologia preditiva são inúmeras (COLE, 1991). Apesar de alguns sistemas de modelagem preditiva já estarem disponíveis comercialmente, a completa utilização deste potencial depende da obtenção e modelagem dos dados de maneira consciente e rigorosa. Depende também de soluções e estratégias adequadas para a aplicação dos dados e modelos e do desejo por parte da indústria de alimentos em aplicar a microbiologia preditiva (ROSS; McMEEKIN, 1994).

### **2.3.1. Modelos matemáticos**

Os modelos matemáticos definidos para avaliar a segurança e qualidade dos alimentos são mais empíricos do que aqueles utilizados nos processos fermentativos. Nos alimentos, ao contrário do que se observam normalmente nos processos fermentativos, o tipo e a concentração dos nutrientes não são conhecidos e em geral não são limitantes, e os microrganismos presentes, especialmente os patogênicos, estão inicialmente em pequeno número e freqüentemente estão submetidos a condições subótimas (WHITING; BUCHANAN, 1997).

Apesar de empíricos, os modelos matemáticos definidos para avaliar a segurança e qualidade dos alimentos são baseados em técnicas de regressão linear e não-linear. Como em qualquer aplicação estatística de regressão, suposições quanto à aleatoriedade, normalidade, interpolação dentro da faixa de variação dos fatores testados ao invés de extrapolações, parcimônia e especificações estocásticas devem ser estabelecidas (McMEEKIN et al., 1993; RATKOWSKY, 1993b).

Independente do quanto um modelo se ajusta ao conjunto de dados que o gerou, o seu valor real está baseado no quão bem o modelo pode prever a variável de resposta, sob condições não testadas especificamente, para derivá-lo. Ou seja, o valor real de um modelo está baseado no quão bem ele trabalha no mundo real. Sendo assim, o último teste de qualquer modelo é avaliar sua habilidade em prever respostas às novas situações. Em microbiologia de alimentos, isto significa comparar os dados de comportamento de microrganismos de interesse, em alimentos submetidos a condições reais de estocagem e distribuição, com valores previstos pelo modelo ajustado. Considerando as perspectivas de segurança e confiança do consumidor e a aceitação da indústria do conceito da microbiologia preditiva, o resultado de um modelo não validado neste nível poderia ser sério e talvez levar a um descrédito do conceito (McMEEKIN et al., 1993). É fundamental que os modelos sejam validados antes de serem aplicados (WHITING; BUCHANAN, 1997).

Pode-se considerar que os modelos matemáticos estabelecidos para a microbiologia preditiva possuem três níveis: nível primário ou primeiro nível, nível secundário ou segundo nível e nível terciário ou terceiro nível (WHITING; BUCHANAN, 1993). Para se obter a previsão ou estimativa da segurança e qualidade de um alimento, o processo de modelagem é revertido, ou seja, os valores dos fatores ambientais de interesse são introduzidos no modelo secundário para se obter valores específicos para o modelo primário. O modelo primário é, então, resolvido por meio do incremento no tempo para se obter a curva de crescimento ou destruição

esperada, para aquela combinação de valores dos fatores ambientais (WHITING; BUCHANAN, 1997).

### 2.3.1.1. Nível primário

O nível primário corresponde a modelos matemáticos que descrevem a mudança do número de microrganismos em função do tempo (WHITING; BUCHANAN, 1997).

Os principais modelos de crescimento frequentemente estudados e utilizados são os modelos sigmóides de Gompertz, Gompertz modificado e o modelo logístico. A equação logística, proposta originalmente por Verhulst no século XVIII, tem sido um modelo ilustrativo da dinâmica do crescimento em um habitat de recursos finitos. A equação logística baseia-se na noção de que a taxa de crescimento da população em um ambiente é proporcional à população e a quantidade de recursos disponíveis no habitat para a exploração (PELEG et al., 2007). Em 1825, Benjamin Gompertz propôs uma função que expressava a taxa de mortalidade de seres humanos. Após alguns anos, o modelo de Gompertz começou a ser utilizado por diversos autores como uma curva de crescimento, tanto para descrições econômicas quanto para fenômenos biológicos (WINSOR, 1931 apud ROBAZZA et al., 2010).

#### 2.3.1.1.1. Modelo de Gompertz

O modelo de Gompertz é um modelo não linear e tem sido utilizado com sucesso para descrever o comportamento microbiano em diferentes alimentos (MASSON et al., 2002). O modelo de Gompertz corresponde a uma função exponencial dupla, que descreve uma curva sigmóide assimétrica (WHITING; BUCHANAN, 1997).

A equação original de Gompertz não considera a fase lag, como é o caso da sua forma modificada, mas apenas o aumento da densidade de células, uma vez iniciado o crescimento exponencial (McMEEKIN et al., 1993).

O modelo de Gompertz está representado na Equação (1) (ERKMEN; ALBEN, 2002).

$$\text{Log}(N / N_0) = A * \exp(- \exp(- \mu * (t - \lambda))) \quad (1)$$

Onde  $\log(N/N_0)$  é o logaritmo decimal da contagem microbiana [log UFC/g] no tempo  $t$ , sendo que  $N$  é o número de unidades formadoras de colônias finais [UFC/g] e  $N_0$  é o número de unidades formadoras de colônias iniciais [UFC/g],  $A$  é o equivalente ao log da contagem microbiana final [log (UFC/g)],  $\mu$  é a velocidade relativa máxima de crescimento [dias<sup>-1</sup>], e  $\lambda$  é o tempo necessário para atingir a velocidade máxima de crescimento [dias].

A função ou Modelo de Gompertz foi modificado por Zwietering et al. (1990). A reparametrização do modelo foi feita para que os parâmetros estimados pudessem ter um significado biológico.

O Modelo de Gompertz Modificado é também uma função exponencial dupla, que descreve uma curva sigmóide assimétrica. O Modelo está representado na Equação (2).

$$\text{Log} N / N_0 = A * \exp(- \exp((\mu * \exp(1 / A) * (\lambda - t) + 1))) \quad (2)$$

Onde  $\log N/N_0$  é o logaritmo decimal da contagem microbiana [ $\log$  UFC/g] no tempo  $t$ , sendo que  $N$  são as unidades formadoras de colônias em  $t$  [UFC/g] e  $N_0$  são as unidades formadoras de colônias no tempo inicial [UFC/g],  $A$  é o aumento logarítmico da população,  $\mu$  é a velocidade específica máxima de crescimento ( $\text{dias}^{-1}$ ) e  $\lambda$  é a duração da fase lag (dias).

Apesar de existir uma grande variedade de curvas sigmóides, o modelo de Gompertz modificado é o que costuma fornecer melhor ajuste aos dados relacionados com a microbiologia, segundo Whiting e Buchanan (1997).

Zwietering et al. (1990) concluíram que, em quase todos os casos testados, o Modelo de Gompertz Modificado é estatisticamente suficiente para descrever dados de crescimento e também o mais simples de se usar na maioria dos casos em que o mesmo é utilizado.

Tanto o Modelo de Gompertz original quanto o Modificado, segundo Labuza e Fu (1993), têm sido testados em muitas espécies de microrganismos com bons ajustes.

### 2.3.1.1.2. Modelo logístico

A equação (3) descreve o modelo logístico.

$$\text{Log}(N / N_0) = C / (1 + \exp(D - F * t)) \quad (3)$$

Onde  $\log (N/N_0)$  possui o mesmo significado que para o Modelo de Gompertz Modificado,  $D$  é um parâmetro adimensional,  $F$  é o crescimento relativo na metade do tempo da fase exponencial [ $\text{dias}^{-1}$ ].  $C$  é aumento logarítmico da população, equivalente a  $A$ . Destes parâmetros podem ser obtidos: a velocidade específica máxima de crescimento, que é dada pela equação (4), e a duração da fase lag é obtida pela equação (5).

$$\mu = \frac{C * F}{4} \quad (4)$$

$$\lambda = \frac{(D - 2)}{F} \quad (5)$$

Giannuzzi et al. (1998) compararam os modelos de Gompertz e o Logístico através de análise estatística, utilizando o teste F no crescimento microbiano de carnes embaladas e resfriadas em diferentes temperaturas de armazenamento.

### 2.3.1.1.3. Modelo de Baranyi

Mais recentemente Baranyi et al. (1993); Baranyi e Roberts (1994, 1995) desenvolveram um modelo mais mecânico a ser utilizado para avaliar o crescimento microbiano e esse modelo tem sido utilizado cada vez mais ao invés do Gompertz modificado. De acordo com George et al. (1996); McClure et al. (1997) um dos pontos mais atraentes do modelo de Baranyi, além da boa capacidade preditiva é o fato de se tratar de um verdadeiro modelo dinâmico, no sentido que pode lidar com o tempo de variação das condições ambientais.

Em vista da crescente atenção dada a previsão da validade comercial dos alimentos, esse modelo torna-se uma ferramenta indispensável (McMEEKIN; ROSS, 1996; FOEGEDING, 1997). O valor de previsões baseadas em análises de risco é em grande parte dependente da confiabilidade dos parâmetros do modelo.

O modelo de Baranyi (BARANYI; ROBERTS, 1994) está representado na equação (6), onde A, B, C e D estão matematicamente organizados:

$$\ln\left(\frac{x}{x_o}\right) = D + B t + \frac{\ln(e^{-n B t} + e^{-C} - e^{-n B t - C})}{B} \quad (6)$$

$$E \text{ as } - \frac{\ln\left(1 + \frac{e^{m B t + \frac{\ln(e^{-n B t} + e^{-C} - e^{-n B t - C})}{B}} - 1}{e^{m(A-D)}}\right)}{m} \quad y_{\max}, B = \mu_{\max},$$

$$C = h_o = \lambda \cdot \mu_{\max}, D = v \text{ and } n = \frac{\mu_{\max}}{v}$$

### 2.3.2.2. Nível secundário

Os modelos secundários descrevem como os parâmetros (A,  $\mu$  e  $\lambda$ ) do modelo primário mudam com parâmetros ambientais, como o pH, temperatura, atividade de água ( $a_w$ ), concentração de agentes antimicrobianos, entre outros (SCHAFFNER; LABUZA, 1997).

Quando um grupo específico de alimentos está sendo modelado, particularmente quando a temperatura for o fator primário de interesse, como é freqüentemente o caso, estas equações podem ser baseadas nas equações de Arrhenius ou de Bélerádek (modelo da raiz quadrada) (McMEEKIN et al., 1993; SKINNER et al., 1994).

Nos últimos anos, têm-se encontrado na literatura diversos trabalhos sobre modelos secundários. Alguns exemplos deste modelo são: modelos polinomiais ou metodologia de superfície de resposta, equação de Arrhenius, modelo da raiz quadrada ou de Ratkowsky, entre outros (DAVEY; DAUGHTRY, 1994; WHITING, 1995; SCHAFFNER; LABUZA, 1997).

Labuza e Fu (1993) mostram que a lei de Arrhenius se aplica para uma determinada faixa de temperatura, uma vez que o crescimento microbiano é um processo bioquímico. Deste modo, a influência da temperatura na velocidade específica de crescimento pode ser caracterizada por uma energia de ativação, uma vez que todos os outros fatores são mantidos constantes. A equação (7) de Arrhenius é dada por:

$$k = A * \exp(-E_a / (RT)) \quad (7)$$

Onde k é a velocidade específica de crescimento determinada da curva de crescimento; A representa o fator de colisão, T é a temperatura absoluta (K), R é a constante universal dos gases (8,314 J/K.mol) e  $E_a$  (J/mol) é a energia de ativação, a qual é uma medida da sensibilidade da temperatura na velocidade específica de crescimento.

O Modelo de Béléradek, ou Modelo da Raiz Quadrada é baseado na relação linear entre a raiz quadrada da velocidade específica máxima de crescimento e a temperatura. Este modelo foi inicialmente utilizado por Ratkowsky et al. (1983) para descrever o efeito da temperatura na velocidade específica máxima de crescimento. A equação (8) de Béléradek é dada por:

$$\sqrt{k} = a(T - T_0) \quad (8)$$

Onde k representa a velocidade específica máxima de crescimento ou outro parâmetro, a é a constante de regressão,  $T_0$  representa a temperatura mais baixa onde o crescimento é observado, e T é a temperatura (VAN- IMPE et al., 1992).

Além dos modelos da raiz quadrada e de Arrhenius, bastante utilizados na literatura, Corradini e Peleg (2005) têm demonstrado que modelos empíricos (equações empíricas) podem ser utilizados para descrever a variação dos parâmetros dos modelos primários com a temperatura e outros fatores, como atividade de água, pH, concentração de sal, etc.

### 2.3.2.3. Nível terciário

O nível terciário é constituído por programas (softwares) utilizados para resolver os modelos de nível primário e secundário. Os programas *Food Micro Model* (Leatherhead Food Research Association, Surrey, U.K) e o *Pathogen Modeling Program* (U.S. Department of Agriculture, Wyndmoor, Pa, UDA) são exemplos do nível terciário dos modelos. Esses programas incluem modelos definidos a partir de condições constantes do meio ambiente (WHITING; BUCHANAN, 1997).

Os seguintes índices são utilizados para comparação dos modelos: erro médio quadrático (“MSE”), coeficiente de regressão ( $R^2$ ), fator bias e fator de exatidão. Quanto menor o valor de “MSE”, melhor é o ajuste do modelo aos dados experimentais (SUTHERLAND; BAYLISS, 1994). O “MSE” é definido na equação (9):

$$MSE = (RSS / n)^E \left( (Valor_{observado} - Valor_{predito})^2 / n \right) \quad (9)$$

Onde RSS é a soma dos quadrados residuais, n é o número de graus de liberdade (n = número de pontos experimentais – número de parâmetros do modelo).

O fator *Bias* procura dar o mesmo peso na média dos valores que superestimam e subestimam a média, ou seja, é um desvio relativo médio, portanto, o fator *Bias* é uma estimativa para a diferença média entre os valores observados e preditos. O fator *Bias* deve estar próximo a 1 e pode ser calculado através da equação(10):

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

Sabe-se que, teoricamente, os valores do fator de exatidão dão uma estimativa da média dos valores da média e por se tratar de valores absolutos serão sempre maiores que 1. O fator de exatidão pode ser calculado pela equação (11):

$$\text{fator de exatidão} = 10 \sum \left( \log \left( \text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{predito}} \right) / n \right) \quad (11)$$

As vantagens potenciais da microbiologia preditiva são inúmeras (COLE, 1991). Apesar de alguns sistemas de modelagem preditiva já estarem disponíveis comercialmente, a completa utilização desta “ferramenta estatística” depende da obtenção de dados experimentais consistentes e modelos com elevado grau de ajuste aos mesmos, capazes de retratarem o elevado potencial para predição de validade comercial dos produtos comerciais (ROSS; McMEEKIN, 1994).

#### 2.4. Bactérias ácido lácticas (BAL)

As bactérias ácido lácticas são bastante difundidas na natureza e capazes de se desenvolverem sob diferentes condições ambientais. São associadas a ambientes ricos em nutrientes, sendo freqüentemente encontradas em alimentos fermentados, como leite, carnes, vegetais, grãos, frutas e bebidas. Algumas delas também fazem parte da microbiota natural dos tratos respiratório e intestinal e de cavidades naturais de humanos e animais (AXELSSON, 1993; POT et al., 1994). São amplamente utilizadas como fermentos lácticos devido a sua propriedade de conservar os alimentos e de fornecer uma proteção eficaz ao homem e animais contra infecções intestinais (DELLAGLIO et al., 1994).

Além de estarem presentes naturalmente em alimentos, BAL podem ser encontradas em solo, água, esterco, esgoto, silagem e ainda, podem ser isoladas da cavidade oral, trato digestivo e vagina, onde exercem influência benéfica nos ecossistemas microbianos de humanos e animais (HOLZAPFEL et al., 2001).

As BAL possuem grande importância na indústria de alimentos e saúde pública por suas características transformadoras, deteriorantes, probióticas e bioconservadoras (DE MARTINS et al., 2003). Esses microrganismos são utilizados como culturas iniciadoras, provocando alterações em matérias-primas devido à produção de ácidos e substâncias que conferem sabor e aromas específicos, originando os produtos fermentados (COTTER et al., 2005; ROUSE et al., 2007). Entretanto, também podem provocar a deterioração precoce dos alimentos, pela produção de ácidos e substâncias proteolíticas (GALIA et al., 2009).

O grupo conhecido como bactérias lácticas compõe-se de gêneros microbianos que apresentam alguns fenótipos comuns, como Gram positivo, e quase sempre catalase negativa. Algumas espécies podem produzir uma pseudo catalase, outras podem apresentar reações positivas em meios contendo hematina ou sangue como um dos seus componentes. Os componentes do grupo são asporogênicos e o ácido láctico é acumulado no meio como produto do metabolismo primário. Por várias décadas, foram considerados como verdadeiros componentes do grupo láctico os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e os recém denominados *Lactococcus*. Levando-se em consideração as desagregações, as agregações, as reclassificações e o aparecimento de novos gêneros, atualmente são 15 os constituintes desse grupo (*Aerocococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*) (HOLT et al., 1994; STILES; HOLZAPFEL, 1997 apud FERREIRA, 2003).

As primeiras definições de bactérias lácticas como um grupo restringiram-se à capacidade que essas bactérias tinham de coagular ou fermentar o leite. Assim, entre os microrganismos lácticos constavam tanto *Lactobacillus* quanto *Escherichia*, separados posteriormente como Gram positivos e Gram negativos, por Beijerinck em 1901. A primeira tentativa de organização do

grupo foi feita por Orla-Jensen em 1919, que utilizou descritores morfológicos, fisiológicos e bioquímicos para sua classificação, obtendo-se então o primeiro agrupamento composto por sete componentes (*Betabacterium*, *Betacoccus*, *Microbacterium*, *Tetracoccus*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium* e *Streptococcus*).

São anaeróbios facultativos ou microaerófilos as bactérias lácticas isoladas dos intestinos do homem e dos animais, e constituem atualmente uma subdivisão do grupo bactérias probióticas que, consumidas em números elevados, têm a propriedade de repor a microbiota intestinal desbalanceada pela dieta, por tratamentos com antibióticos e/ou quimioterapia ou por estresse do hospedeiro (KIM; GILLILAND 1983; MARTEAU et al., 1990a; IGARASHI et al., 1994).

As bactérias lácticas são basicamente mesófilas, com algumas linhagens termófilas e são capazes de crescer num intervalo de temperatura de 5 a 45° C. Podem crescer em pH de 3,8 e são proteolíticas fastidiosas em relação a alguns aminoácidos, e tem sua denominação por produzirem ácido láctico, nas formas de isômero L(+) ou D(-). As bactérias ácido lácticas produzem vários fatores antimicrobianos, tais como ácido láctico, acético e propiônico, os quais interferem na força promotiva e dos mecanismos de transporte ativo da membrana citoplásmica bacteriana. (FORSYTHE, 2000).

Ainda de acordo com Silva e Junqueira (1995), o grupo das bactérias lácticas está relacionado com a produção de alimentos de média e alta acidez, da qual podem participar como coadjuvantes da fabricação ou como deteriorantes, respondendo por perdas significativas na indústria de sucos, refrigerantes, maionese e outros.

Um dos papéis mais importantes das bactérias lácticas é o desenvolvimento das propriedades sensoriais dos alimentos fermentados, através da produção de um grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas. Essas bactérias transformam os nutrientes fundamentais em compostos com propriedades sensoriais complexas e tais atividades permitem às bactérias lácticas alterarem as estruturas e o aroma dos alimentos fermentados (JAY, 2005).

#### **2.4.1. Gênero *Enterococcus* sp.**

O nome *Enterococcus* foi isolado pela primeira vez por Thiercelin (1899) para descrever microrganismos de origem fecal, dispostos em pares ou em cadeias curtas (GODFREE et al., 1997). *Enterococcus* são bactérias classificadas dentro da definição geral de bactérias ácido lácticas por serem Gram positivas e catalase negativa (GIRAFFA et al., 1997), são produtoras de enterocinas que possuem grande espectro de inibição a diferentes patógenos. Podem ocorrer sob a forma de cocos isolados, em pares ou em cadeias curtas, não esporulam, são oxidase negativo e anaeróbios facultativos (HARDIE; WHILEY, 1997), mas também podem se apresentar na forma de cocobacilos, de acordo com Giraffa (2002).

Anteriormente, *Enterococcus* eram classificados como um grupo pertencente ao gênero *Streptococcus*, entretanto técnicas modernas de classificação, como o sequenciamento do 16s rDNA resultaram na transferência de alguns membros do gênero *Streptococcus*, como alguns dos *Streptococcus* do grupo D de Lancefield, ao novo gênero *Enterococcus*, que pertencem a família Enterococaceae (GIRAFFA et al., 1997).

Crescem em temperatura ótima de 35°C, embora a maioria das espécies do gênero, possuam crescimento em temperaturas que variam de 10 a 45°C. A maioria apresenta crescimento em altas concentrações de NaCl (até 6,5%), pH em torno de 9,6 e ainda pode sobreviver a 60°C por 30 minutos, sendo portanto, termodúricos (GIRAFFA et al., 1997, 2003; FOLQUE-MORENO et al., 2006).



Vários estudos mostram que bactérias do gênero *Enterococcus*, geneticamente indistinguíveis, têm sido encontradas tanto em animais como em humanos. Dessa forma, tais bactérias são consideradas ubiqüitárias, podendo ser naturalmente transmitidas de alimentos ou do ambiente para o trato gastrointestinal humano, e vice-versa (FRANZ et al., 2003). Uma outra característica importante desse grupo é que são resistentes ao estresse químico e físico, e ao contrário de outras bactérias fecais que são liberadas no ambiente, os *Enterococcus* são capazes de sobreviver por longos períodos fora do ambiente intestinal de seu hospedeiro (KÜHN, 2000).

Bactérias do gênero *Enterococcus* podem ser encontradas em todos os lugares, mas seu habitat é o trato gastrointestinal de humanos e animais, devido a sua alta tolerância ao calor e capacidade de sobrevivência em condições ambientais adversas, podem colonizar diversos nichos, servindo como indicadores da qualidade sanitária de alimentos (HARTMAN et al., 1992; GIRAFFA, 2002).

Segundo Hardie e Whiley (1997), também podem ser encontrados no solo, alimentos, água, plantas, animais, pássaros e insetos. Essa diversidade de ambientes é provavelmente devido à sua disseminação pela fezes de animais de sangue quente e por sua habilidade de crescer e sobreviver numa grande variedade de condições ambientais, incluindo temperaturas extremas e altas concentrações de sal.

É um fato que estes microrganismos ocorrem em grande número de produtos vegetais e principalmente produtos de origem animal, como queijos e lingüiças. Em carnes processadas estes não são desejáveis por causar deterioração precoce, enquanto que para a indústria de leite e derivados possuem utilização prática, desenvolvendo características sensoriais relacionadas com a fermentação, muitas das vezes utilizadas como culturas starters (GIRAFFA, 2002).

A utilização dessas bactérias como indicadores de contaminação fecal apresenta-se, assim, restrita por suas características de habitat não específico, porém a presença mostra práticas sanitárias inadequadas no manuseio, na conservação do produto ou nos procedimentos de higienização (GELSOMINO et al., 2001).

As espécies mais freqüentes em intestinos humanos são *E. faecium* e *E. faecalis*. Em animais, como aves, gado e suínos o *E. faecium* é mais freqüente, mas outras espécies também ocorrem em números elevados, como *E. faecalis* e *E. cecorum*, e outras de menor freqüência que são *E. gallinarum* e *E. avium*, indicando desta maneira a grande diversidade do gênero (KLEIN, 2003).

Este gênero apresenta características relevantes para ser empregado em tecnologia de alimentos e como probiótico (CINTAS et al., 1997). Contudo, existe dificuldade em regulamentar seu emprego na indústria de alimentos, apesar de não haver consenso quanto a possível patogenicidade deste gênero. Salminen e Von Wright (1993) relataram que *E. faecalis* poderia eventualmente comportar-se como patógeno oportunista, porém não mencionaram a espécie *E. faecium*. Já Giraffa et al. (1997) afirmam que os *Enterococos* tão bem quanto outras bactérias lácticas poderiam ocasionalmente estar envolvidos em infecções clínicas, porém muitas linhagens podem ser consideradas seguras para o emprego em alimentos. Em 1996, o “Advisory Committee on Novel Foods and Processes” do Reino Unido aprovou o uso de *E. faecium* K770 como cultura láctica em produtos lácteos fermentados (GIRAFFA, 2003).

#### **2.4.2. Gênero *Streptococcus* sp.**

Dos microrganismos componentes do grupo de bactérias lácticas, um dos gêneros mais pesquisados tem sido o *Streptococcus* que foi primeiramente estudado em profundidade por Sherman, em 1937, que o classificou em quatro grupos (*piogênicos*, *viridans*, *lácticos* e

*enterococcus*). A maioria das espécies patogênicas está reunida no primeiro grupo. As bactérias lácticas empregadas como fermentos pertencem ao grupo *lácticos* (atualmente redistribuídos principalmente nos gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc*) e *viridans* (*Streptococcus thermophilus*). Este representante é a única espécie do gênero empregada na produção de alimentos.

Produz ácido láctico na forma L(+), e é uma espécie quase obrigatória na composição de fermentos termófilos e, juntamente com *Lactobacillus bulgaricus* é responsável pela produção do iogurte, onde um balanço entre as espécies é essencial para a produção do acetaldeído, componente de sabor característico desta bebida. A espécie ainda tem função de bioajustadora em processos fermentativos, na presença de bactérias probióticas.

O gênero *Streptococcus* englobava todos os microrganismos que hoje fazem parte dos gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. O mesmo estava subdividido em quatro grupos diferentes, de acordo com suas características fisiológicas: *lactis*, *enterococos*, *pyogenis* e *viridians* ou *oral*. Os dois primeiros grupos se tornaram gêneros independentes e os dois últimos permanecem no gênero *Streptococcus* (HARDIE; WHILEY, 1995; HOLT et al., 1994).

Muitas espécies deste gênero ainda estão sendo estudadas e reagrupadas de acordo com suas características taxonômicas, sendo que algumas delas são parasitárias do homem e outras são patogênicas. Por apresentarem características taxonômicas muito próximas, as espécies *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus thermophilus* foram, temporariamente, tratadas como uma única espécie: *Streptococcus salivarius* subsp. *salivarius* e subsp. *thermophilus* (HARDIE; WHILEY, 1995).

*Streptococcus thermophilus* é a única espécie do gênero *Streptococcus* utilizada nas fermentações lácteas (HASSAN; FRANK, 2001). Esta espécie é diferenciada das demais pela sua resistência ao aquecimento, pois cresce bem a 45°C e também a 52°C, conseguindo sobreviver ao aquecimento de 60°C por 30 minutos (HARDIE; WHILEY, 1995).

Segundo Stiles e Rolzapfel (1997), os estreptococos estavam entre as primeiras bactérias que foram reconhecidas por microbiologistas, por causa de seu envolvimento em um grande número de doenças em humanos e animais. O nome genérico *Streptococcus* foi usado pela primeira vez por Rosenbach, em 1884, para descrever as bactérias em forma de cocos em cadeias que estavam associadas com feridas infeccionadas. O gênero *Streptococcus sp* foi originalmente descrito com base em suas características morfológicas, sorológicas, fisiológicas e bioquímicas, e composta por uma ampla gama de organismos, incluindo as bactérias altamente patogênicas e economicamente importantes.

De acordo com Jones (1978), os estreptococos possuem um sistema nutricional complexo e necessitam para o crescimento de ambientes com boa fonte de carboidrato e proteína, incluindo tecidos e trato intestinal dos animais, leite, laticínios, material vegetal e outros alimentos.

#### **2.4.3. Bactérias ácido lácticas e produtos cárneos**

Somente 10% das bactérias inicialmente presentes podem crescer em temperaturas de refrigeração. Quando produtos cárneos são armazenados sob refrigeração e em condições de microaerofilia, como em embalagens a vácuo ou com atmosfera modificada, são as bactérias ácido-lácticas que irão predominar no produto deteriorado. Como estes produtos são aquecidos, geralmente entre a faixa de 68 a 75°C, a maioria das células vegetativas é morta e a recontaminação do tratamento pós-aquecimento é que determina a validade comercial dos mesmos (BORCH et al., 1996; VERMEIREN et al., 2004;).

Borch et al. (1996); Korkeala e Bjorkroth (1997); Samelis et al. (2000) afirmaram que as bactérias ácido-lácticas constituem o maior grupo de bactérias associadas com a deterioração de

carnes cozidas e produtos cárneos embalados a vácuo (presunto) e estocados em temperaturas de refrigeração. Constataram, ainda, que estas bactérias fazem parte da microbiota natural de muitos produtos cárneos armazenados em temperaturas de refrigeração (BREDHOLT et al., 2001; CAYRE et al., 2003), causando defeitos tais como odores, coloração esverdeada e a formação de limo superficial (EGAN, 1983).

As bactérias ácido lácticas se desenvolvem em condições que impedem o crescimento de microrganismos aeróbios Gram negativos, como as *Pseudomonas sp.* Não requerem oxigênio para crescer, são tolerantes ao CO<sub>2</sub>, nitrito, defumação e concentrações de sal relativamente altas e, além disso, toleram baixas concentrações de pH. Por isso, as condições existentes nas carnes curadas e salgadas, embaladas a vácuo e produtos cárneos curados, favorecem o crescimento desses microrganismos (REUTER, 1975).

Segundo Bredholt et al. (2001), as bactérias ácido lácticas são consideradas microrganismos não patogênicos, seguros para o consumo e que já estão sendo utilizados em alimentos há vários anos. Algumas espécies de bactérias ácido-lácticas heterofermentativas, como os *Lactobacillus viridescens*, podem produzir peróxidos que reagem com os pigmentos da carne, causando a coloração esverdeada e afetando a validade comercial dos produtos.

Ainda de acordo com Shillinger e Lücke (1989), bactérias lácticas, originalmente isoladas de carnes e produtos cárneos são os microrganismos mais indicados para serem utilizados na intensificação da segurança microbiológica destes alimentos. Estas bactérias são adaptadas às condições das carnes e devem ser mais competitivas comparativamente às bactérias lácticas provenientes de outras fontes.

Ao utilizarem os carboidratos, as bactérias ácido lácticas existentes na formulação cárnea, determinam a formação do ácido láctico. Este ácido láctico é o mais importante produto metabólico gerado no processo fermentativo e responsável pela segurança e qualidade dos produtos cárneos curados fermentados. A conseqüente queda de pH irá refletir-se no efeito protetor contra os microrganismos indesejáveis, bem como a textura, desidratação e coloração do embutido fermentado. Entre estes microrganismos indesejáveis salienta-se o *Staphylococcus aureus*, *S. tryphimuriun*, *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytógenes* (TERRA, 1997).

A contagem de bactérias lácticas em alimentos é baseada principalmente em condições ótimas para o seu crescimento (condições microaerófilas e meios enriquecidos, para atender as altas exigências nutricionais), havendo pouca ênfase na criação de condições seletivas, uma vez que, nos alimentos onde sua enumeração é relevante, a microbiota competidora restringe-se quase que exclusivamente aos bolores e leveduras (SILVA; JUNQUEIRA, 1995).

O ponto de deterioração de produtos cárneos pode ser definido por um nível aceitável de bactérias presentes, ocorrência de odores indesejáveis ou pela aparência inaceitável. A validade comercial depende do número e do tipo de microrganismos inicialmente presentes, na sua maioria bactérias, e de seu crescimento subsequente. A contagem bacteriana inicial de mesófilos, em carnes e em produtos cárneos processados, é de aproximadamente 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> UFC/g, consistindo em uma variedade grande de espécies (BORCH et al., 1996).

Na determinação da validade comercial de produtos cárneos é comum o estudo de parâmetros microbiológicos (contagem bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, contagem de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas, contagem de *Lactobacillus*, enterobactérias, bolores e leveduras), químicos (acidez, índice de oxidação) e sensoriais (aparência, aroma, sabor e textura), devendo os produtos serem analisados no dia em que forem processados e pelo menos três vezes mais durante a vida útil projetada (EBURNE; PRETICE, 1996).

De acordo com Kotzekidou e Bloukas (1996), o presunto cozido é um produto cárneo altamente perecível. O seu índice de sal (em torno de 2,0%), seu valor de pH acima de 6,0 e sua

alta atividade de água de 0,96 a 0,98; favorecem o crescimento predominante de bactérias ácido lácticas.

Em presuntos, as bactérias ácido-lácticas constituem uma parte da microbiota inicial a qual se desenvolve facilmente após o presunto ser processado, estocado a baixas temperaturas, embalado sob vácuo ou sob atmosfera modificada. Os produtos metabólicos das bactérias ácido-lácticas e a bactéria em si têm sua importância na preservação dos alimentos, apesar de que o crescimento incontrolável de algumas espécies de bactérias lácticas pode causar deterioração em presuntos (HUGAS, 1998).

#### **2.4.4. Bacteriocinas produzidas por BAL**

Bacteriocinas são peptídeos biologicamente ativos, com atividade antimicrobiana contra bactérias, usualmente, estreitamente à bactéria produtora. São caracterizadas como substâncias de atividade de espectro restrito, possuidoras de uma fração protéica ativa, com atividade bactericida, com mecanismo de ação dando-se através de receptores específicos na parede celular das células sensíveis (TAGG et al., 1976 apud QUADROS, 2007).

Bacteriocinas são peptídeos e/ou proteínas com atividade bactericida ou bacteriostática. Estes compostos podem inibir ou eliminar o crescimento de espécies intimamente relacionadas (BENNICK et al. 1998). As BAL produzem uma ampla variedade de compostos com atividade antimicrobiana, dentre eles, as bacteriocinas. Segundo De Vuyst e Vandamme (1994), bacteriocinas são substâncias de natureza protéica, produzidas por muitas espécies de bactérias e que possuem atividade bactericida, particularmente contra espécies de bactérias intimamente relacionadas a elas. Estas substâncias são promissoras para uso como conservantes biológicos, pois muitas delas apresentam estabilidade ao aquecimento, podendo ser utilizadas em combinação com o tratamento térmico. Elas também são biodegradáveis, destruídas por enzimas digestivas, seguras à saúde e ativas em baixa concentração (DE VUYST; VANDAMME, 1994).

Alguns microrganismos produzem um extraordinário arsenal de sistemas defensivos. Esses incluem os clássicos antibióticos de amplo espectro, produtos do metabolismo como o ácido láctico, agentes líticos como lisozina e numerosos tipos de proteínas, as exotocinas e bacteriocinas (RILEY; WERTZ, 2002).

Mas, existe uma diversidade de outras substâncias com atividade antimicrobiana que não, necessariamente, apresentam todas essas características. O termo do tipo-bacteriocina engloba os compostos antimicrobianos de natureza protéica que ainda não estão bem definidos. Ou não cumprem com todas as características originalmente associadas às bacteriocinas. Estas substâncias, geralmente, possuem um espectro de ação maior, atuando contra uma variedade de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e contra alguns fungos (DE VUYST; VANDAMME, 1994).

A produção de bacteriocinas tem sido descrita por vários gêneros de bactérias ácido lácticas, incluindo *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (FRANZ et al., 1996).

O espectro inibitório das bacteriocinas produzidas por BAL é restrito a bactérias Gram positivas, pois sua ação ocorre por interferências na membrana citoplasmática dos microrganismos alvos. As bactérias Gram negativas são protegidas pela barreira lipopolissacarídica da membrana externa, e muitas das bacteriocinas são ativas contra microrganismos deteriorantes e patogênicos encontrados em alimentos (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Klaehammer (1988) classificou as bacteriocinas produzidas pelas BAL em duas classes, segundo o espectro antimicrobiano. A primeira classe engloba as bacteriocinas que inibem somente bactérias intimamente relacionadas à bactéria produtora, sendo a maioria das bacteriocinas desta classe. A segunda classe engloba bacteriocinas com espectro antimicrobiano mais amplo, embora atuem somente em bactérias Gram positivas.

De acordo com Hassan e Frank (2001); Teuber (1995), as bacteriocinas produzidas por BAL podem ser divididas em três grupos bioquímicos, que são os peptídeos que contêm lantionina (lantibióticos), como a nisina e a lacticina 481, sensíveis ao aquecimento em pH 9,4; as proteínas pequenas que não contêm lantionina ou peptídeos, como as lactococcinas A, B, G e M; e a diplococcina. Estas bacteriocinas são estáveis ao aquecimento e as proteínas grandes termolábeis e ativas somente em valores baixos de pH, como a helveticina J e a caseicina 80.

Sarantinopoulos et al. (2002), relataram que muitas enterocinas apresentam-se como metabólitos primários, sendo produzidas na fase exponencial de crescimento bacteriano. Um pico de atividade destas bacteriocinas é geralmente obtido no meio da fase de crescimento exponencial, entretanto, de modo geral, a atividade de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas é máxima no final da fase de crescimento exponencial.

Considerando que a produção de bacteriocinas é um processo relacionado ao crescimento bacteriano, condições favoráveis a este são também favoráveis à produção de bacteriocinas, entretanto condições ótimas de crescimento bacteriano não necessariamente resultam em altos níveis de atividade das bacteriocinas. Fatores ambientais como pH, temperatura e atividade de água devem ser consideradas, pois afetam não somente a quantidade de células bacteriocinogênicas produzidas, mas também determinam a produção de bacteriocinas por célula. Além disso, o ambiente em que as bactérias se encontram pode interferir também na estabilidade da bacteriocina produzida (SARANTINOPOULOS et al., 2002).

Ao final da fase log e durante a fase estacionária de crescimento, a atividade da bacteriocina diminui rapidamente. Vários mecanismos podem ser responsáveis por este decréscimo de atividade das bacteriocinas, dentre eles agregação da proteína, degradação proteolítica por enzimas específicas ou não específicas e adsorção destas bacteriocinas às próprias células bacteriocinogênicas (SARANTINOPOULOS et al., 2002).

A nisina é a bacteriocina mais extensivamente caracterizada. Ela possui *status* GRAS (*Generally Recognized As Safe*), sendo a única aprovada para uso como aditivo alimentar pelo FDA – Food and Drug Administration (MORENO et al., 2000; O’SULLIVAN et al., 2002).

A aplicação das bacteriocinas no biocontrole de alimentos é principalmente orientada em duas direções, uma para o uso de BAL produtoras de bacteriocinas, ou na adição direta de preparados com bacteriocinas, sintética ou purificada, de um sobrenadante da cultura da cepa produtora. A produção *in situ* de bacteriocinas pode aumentar a competitividade da cepa produtora na matriz do alimento contribuindo, desta forma, para a prevenção da degradação do mesmo. Contudo, a microbiota endógena, a fórmula e a tecnologia podem influenciar o desempenho da cultura produtora (HUGAS et al., 2003).

## 2.5. Gênero *Salmonella* sp

O gênero *Salmonella*, pertence à família *Enterobacteriaceae*, tribo *Salmonelleae* e é classificada como um bastonete Gram negativo, anaeróbica facultativa e não produtora de esporos (BRENNER, 1984). Segundo Holt et al. (1994), são predominantemente móveis pela presença de flagelos peritríquios, são anaeróbios facultativos que apresentam metabolismo respiratório e fermentativo e que, geralmente, não fermentam a lactose, são indol negativos,

oxidase negativos, catalase positivos e produzem gás sulfídrico. A partir da fermentação de D-glicose e outros carboidratos produzem ácido e gás (TORTORA et al., 1993).

Atualmente, o gênero *Salmonella* está dividido em três espécies (*S. entérica*, *S. bongori* e *S. subterrânea*) e em mais de 2.463 sorovares (HEYNDRICKX et al., 2005). A espécie *S. enterica* agrupa as *Salmonellas* associadas às infecções em humanos (principalmente as gastroenterites) e animais de sangue quente, enquanto que as *S. bongori* são encontradas em animais de sangue frio e no meio ambiente (BARROW, 1999). Já as *S. subterrânea* foram isoladas de superfícies sedimentares e apresentam 96,4% de similaridade com a *S. bongori* (SHELOBOLINA et al., 2004).

A *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies: enterica (I), salamae (II), arizonae (IIIa), diarizonae (IIIb), houtenae (IV) e indica (VI), que por sua vez são classificadas em sorotipos ou sorovares, isto é, grupos de linhagens que compartilham antígenos de superfície reconhecidos por anticorpos específicos. A *Salmonella bongori* antigamente constituía a subespécie V (SÁ; SOLARI, 2001).

A diferenciação entre gêneros e espécies é feita por meio da realização de uma série de provas bioquímicas; o metabolismo fermentativo pode gerar ácido misto ou butanodiol, o que se constitui em uma característica importante na distinção de enterobactérias. Algumas espécies são divididas em tipos sorológicos denominados sorotipos, de acordo com a especificidade imunológica dos antígenos. Nas enterobactérias, a estrutura antigênica é caracterizada por antígenos somáticos “O”; antígenos capsulares “K”, denominados “V i” em *Salmonella Typhi*; e antígenos flagelares “H” (EWING, 1986) e todos os sorovares são considerados potencialmente patogênicos, sendo o grau de virulência dependente da própria linhagem, do hospedeiro e do meio ambiente (BURR et al., 1998).

De acordo com o esquema de Kauffmann White, os antígenos O, Vi e H são fatores antigênicos destas espécies e subespécies, e levaram à identificação de 2.463 sorotipos (POPOFF et al, 2000). Os 1.435 sorovares da espécie enterica subespécie enterica (I) colonizam o trato entérico dos animais de sangue quente, enquanto os demais das subespécies II, IIIa, IIIb, IV a VI e da espécie bongori são encontradas em animais de sangue frio e no ambiente (POPOFF; LE MINOR, 1997).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), do ponto de vista ortográfico, contrariamente ao que se tem por hábito, os sorotipos devem possuir a primeira letra maiúscula a fim de diferenciá-los de espécie e não serem grafados em itálico. Muitas vezes, o nome da cidade onde foram isolados é utilizado para definir o nome do sorotipo. As fórmulas antigênicas dos sorotipos de *Salmonella* são definidas e mantidas pelo Centro de Referência e Pesquisa de *Salmonella* da OMS no Instituto Pasteur (Paris, França), sendo os novos sorotipos atualizados anualmente (POPOFF; LE MINOR, 1997; POPOFF et al, 2000).

A *Salmonella* é um patógeno intracelular facultativo, que pode causar doenças como gastroenterites ou febre entérica, sendo a forma de contágio normalmente relacionada à ingestão de alimentos ou água contaminados (MARCUS et al., 2000).

As bactérias do gênero *Salmonella sp* ocorrem geralmente nos animais, especialmente nas aves e nos suínos, presente também nos seres humanos, alimentos e meio ambiente, podendo ser patogênica para humanos e muitas espécies de animais (HOLT, 1994). É destacado o papel importante das aves dentro da cadeia epidemiológica como reservatórios, pois podem ser portadoras e excretar continuamente salmonela nas fezes (ALMEIDA; SCHNEIDER, 1993).

A *Salmonella* está bastante difundida, estando presente no solo, no ar, nas águas residuais e nos equipamentos, mas seu habitat natural é trato intestinal dos seres humanos e animais, principalmente das aves (SILVA et al., 2004). Também pode ser isolada de carne crua, incluindo

frango e seus produtos, leite e derivados (GORMAN et al., 2002). Além disso, também possui importância no ambiente de processamento, pois esse microrganismo possui a habilidade de formar biofilmes em superfícies de contato com os alimentos (JOSEPH et al., 2001).

A transmissão da *Salmonella sp* ao homem, através da população animal, pode ocorrer por contato direto com os animais tanto nas granjas como nos frigoríficos. Mais frequentemente ocorre pela ingestão de produtos contaminados de origem animal (WEGENER; BAGER, 1997), o que pode resultar em infecções de origem alimentar (LEITÃO, 1998).

A contaminação dos alimentos pode ocorrer devido ao controle inadequado de temperatura, manipulação incorreta ou contaminação cruzada (FORSYTHE, 2002). Para que ocorra uma infecção gastrointestinal de origem alimentar por *Salmonella*, são necessárias as seguintes condições: o alimento deve estar contaminado com a bactéria, as mesmas devem se encontrar no alimento em número elevado e os microrganismos ingeridos devem estar viáveis (FRAZIER; WESTHOFF, 1993). Wegener e Bager (1997), também ressaltam a importância da composição do produto, da manipulação e práticas no preparo do alimento, e da suscetibilidade dos consumidores primários.

Dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) mostram que a prevalência de *Salmonella* em carne crua e produtos de aves inspecionados tem diminuído, em alguns casos, pela metade ou mais. Entretanto, o taógeno é ainda muito comum em alguns produtos, tendo sido encontradas contaminações em um quarto das amostras de peru e um quinto das amostras de aves (ROOS, 2002).

Esta bactéria é altamente contagiosa, e a principal forma de transmissão é a via fecal – oral. Desta forma, um intensivo controle de qualidade tem buscado minimizar problemas deste tipo através das Boas Práticas de Fabricação (HUMPREY, 2000, apud KICH, 2004).

Quanto à patogenicidade destas bactérias, observamos que as cepas que apresentam maiores problemas de saúde pública são diferentes sorotipos de *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, sendo que os principais são *S. enterica* sorotipo Typhi, *S. enterica* sorotipo Typhimurium, *S. enterica* sorotipo Enteritidis (ANDERSON; ZIPRIN, 2001).

As doenças causadas por esses microrganismos são conhecidas como salmoneloses e podem ser divididas em três grupos: a febre tifóide, causada pela *S. Typhi*, as febres entéricas causadas pela *S. Paratyphi* (tipos A, B e C) e as enterocolites, causadas pelos demais sorovares (JAY, 2005).

As enterocolites são umas das mais frequentes infecções de origem alimentar no mundo (LACONHA et al., 2000; LOPALCO et al., 2000). Os sintomas da infecção em humanos surgem de 12 a 14 horas após a ingestão do alimento contaminado, embora períodos mais curtos e longos tenham sido relatados. O indivíduo infectado geralmente apresenta náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, dor de cabeça e calafrios. Esses sintomas geralmente são acompanhados por fraqueza, fadiga muscular, febre moderada e sonolência, que persistem por 2 a 3 dias. As crianças com menos de 01 ano e idosos com mais de 60 anos são mais susceptíveis e tendem a apresentar infecção mais severa (JAY, 2005).

Ainda de acordo com Franco e Landgraf (2003), a gastroenterite é caracterizada pela invasão do epitélio e do tecido subepitelial dos intestinos grosso e delgado; as linhagens não invasivas não causam doença. As salmonelas atravessam a camada do epitélio do intestino, alcançam a lâmina própria, camada na qual as células epiteliais estão ancoradas e proliferam-se, provocando inflamação e diarreia. Uma resposta leucocitária polimorfonuclear limita a infecção aos intestinos e aos nódulos linfáticos mesentéricos adjacentes. A resposta inflamatória está relacionada com a liberação de prostaglandinas, que estimulam a adenilciclase, o que acarreta aumento de secreção de água e eletrólitos, provocando diarreia aquosa. O estabelecimento dos

sintomas de salmonelose, bem como a sua gravidade, dependem do sorotipo de *Salmonella* envolvido, da competência dos sistemas de defesa inespecífico e específico do indivíduo afetado e das características do alimento envolvido.

### **2.5.1. Sorovar *Salmonella* Enteritidis**

A *Salmonella* Enteritidis é um patógeno entérico de origem alimentar mais frequentemente relatado na literatura nas ocorrências de gastroenterite em seres humanos. A importância deste microrganismo é em decorrência de sua prevalência significativa com distribuição mundial nos lotes de frango de corte e suas implicações na saúde pública (GAST, 2003).

*Salmonella enterica* subespécie enterica sorotipo ou sorovar Enteritidis, referida como *Salmonella* Enteritidis foi nomeada em 1888 (POPOFF; LE MINOR, 1997). É frequentemente encontrada no trato intestinal de animais, domésticos e selvagens, sendo muito comum em aves (JAY, 2000).

Nas aves, as *Salmonellas* podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com o poder epidemiológico e com isso, seu efeito na escolha da melhor estratégia de controle. A *Salmonella* Enteritidis enquadra-se no grupo III, juntamente com a *S. Typhimurium*, sendo estes sorotipos os líderes de causas de toxinfecções alimentares no homem, podendo ocasionalmente ser consideradas patogênicas para aves, principalmente jovens (BACK; BELTRÃO 2006).

De acordo com Back (2007) a *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* causam infecção humana, elas têm o potencial de causar gastroenterites, são bactérias móveis que eventualmente podem causar doença clínica em aves jovens e estão relacionadas com a grande maioria de casos de doenças transmitidas por alimentos por salmonelas em humanos. Além da transmissão horizontal, verificou-se nestes dois sorotipos, e principalmente com a Enteritidis, um certo nível de transmissão vertical.

Apesar de toda a monitoria industrial com o propósito da segurança alimentar, ainda assim, essas infecções têm sido frequentes, constituindo-se as aves em uma significativa fonte de contaminação de salmonelas para o homem. O fato de o Brasil ser o maior exportador de carne de aves e pela grande exigência dos países importadores, se reforça a necessidade de maior controle (BACK; BELTRÃO 2006).

### **2.5.2. Dose infectante de *Salmonella***

A determinação exata da dose infectante de *Salmonella* em humanos não está em consenso entre os pesquisadores até o momento. Valores entre  $10^1$  e  $10^8$  de células bacterianas são reportadas como causadores de infecções (BORSOI, 2005).

Poope (1996) relata que há evidências de que contagens de  $10^1$  a  $10^3$  bactérias possam causar doenças em crianças, idosos, pessoas imunodeprimidas, especialmente se a bactéria estiver contaminando alimentos com alto teor de gordura. Horrox (1997) cita que na maioria dos surtos relatados a dose está ao redor de  $10^3$  UFC/g.

Segundo FDA (2000), a dose infectante depende do sorovar e alimentos envolvidos e do estado fisiológico do hospedeiro e de 15 a 20 células de *Salmonella* já podem causar a doença em pacientes imunocomprometidos e/ou quando ingeridos com alimentos gordurosos. Entretanto, a dose infectante em condições normais é de aproximadamente  $10^5$  células.



Para Riedel (1992), o número está acima de  $10^5$  células e segundo Jawetz et al. (1991) esta estaria para humanos em uma faixa entre  $10^5$  e  $10^8$  de células, dependendo do sorotipo, da imunidade, e de outros fatores como acidez gástrica e microbiota intestinal.

Fehlhaber e Janetschke (1995) referem-se a dose de  $10^2$  a  $10^6$  células por grama de alimento ingerido como sendo suficiente para causar infecção. Em testes com alimentos envolvidos em surtos, Blaser e Newman (1982) obtiveram quantidades inferiores a  $10^3$  salmonelas, causando sinais clínicos evidentes da infecção (apud FLORES, 2001).

De acordo com Humphrey (2004), a dose infectante de *Salmonella* é altamente variável. Embora se considere uma dose infectante para humanos de  $10^6$  a  $10^8$  UFC/g, diversos surtos de salmonelose foram relatados em doses muito menores. A quantidade exata varia de acordo com as linhagens, com o alimento veículo e com o estado fisiológico do hospedeiro (DARWIN; MILLER, 1999).

De acordo com o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos (BRASIL, 2001), as carnes e produtos cárneos devem ter ausência de *Salmonella sp* em 25g da amostra, em caso contrário o alimento está impróprio para consumo e deve ser descartado.

### **2.5.3. Capacidade adaptativa da *Salmonella***

A *Salmonella*, assim como outros microrganismos enteropatogênicos, possuem uma grande capacidade de sobrevivência em condições rigorosas que são encontradas no meio ambiente e no organismo do hospedeiro. Essa capacidade de adaptação e sobrevivência a esses estresses está diretamente relacionada à habilidade de alguns microrganismos em causar doenças (AUDIA et al., 2001).

Vários tratamentos térmicos ou ácidos utilizados em nível doméstico ou pelas indústrias de alimentos são efetivos para inativação de bactérias patogênicas de origem alimentar. Mas, existem sorovares de *Salmonella* que apresentam maior capacidade de sobrevivência às técnicas de processamento de alimentos, o que pode resultar em surtos alimentares e, de acordo com alguns autores, essa capacidade está relacionada à resistência térmica e ácida desses sorovares (HUMPHREY et al., 1995; DOYLE; MAZZOTTA, 2000).

Isolados que exibem maior resistência ao calor e acidez podem apresentar maior capacidade de sobrevivência ao cozimento e condições estomacais. Células com tolerância térmica aumentada possuem maior capacidade de sobreviverem na presença de ácidos (HUMPHREY et al., 1995). A tolerância térmica e ácida em espécies patogênicas merece atenção especial devido à possibilidade do microrganismo passar pelo baixo pH estomacal, possibilitando o estabelecimento da infecção (AUDIA et al., 2001).

De acordo com Wilcock e Schwartz (1993), as salmonelas podem se desenvolver em temperaturas que variam de 7 a 45°C, sendo resistentes à dessecação e ao congelamento. No entanto, é classificada como mesófila, tendo sua temperatura ótima de crescimento a 37°C (FRANCO; LANDGRAF, 2003) e é sensível à luz solar e a maioria dos desinfetantes como fenóis, clorados e iodados (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Jay (2005) relata que a temperatura ótima de crescimento da *Salmonella* é de aproximadamente 38°C, sendo que o mínimo observado foi de 5,3 a 6,2°C, dependendo do sorovar, e temperaturas em torno de 45°C foram descritas como limite de crescimento. De acordo com Forsythe (2002), como as *Salmonellas* não formam esporos, são mais termo sensíveis, podendo ser destruídas em temperaturas acima de 60°C, por alguns minutos. Contudo, a termo resistência pode ser aumentada devido a alterações na acidez, atividade de água, microbiota

acompanhante, alterações no conteúdo de sólidos totais, mudanças na formulação, características dos alimentos ou condições de armazenamento (DOYLE; MAZZOTTA, 2000).

Franco e Landgraf (2003) citaram que algumas salmonelas são mais resistentes do que outras ao calor, como exemplo a *S. seftemberg* 775 w que é 10 a 20 vezes mais resistente em relação às demais. A composição do alimento onde o microrganismo está é muito importante e, especificamente, a presença de sacarose pode dobrar a resistência térmica de *S. Typhimurium*. A presença de água também é muito importante, sendo que em ambiente úmido a resistência é menor do que em ambiente seco.

Assim como a temperatura, o pH de crescimento desse gênero pode variar amplamente, admitindo valores entre 4,0 e 9,0, e sendo considerado o pH ótimo de crescimento entre 6,5 e 7,5. Já os valores inferiores à 4,1 inativam a *Salmonella sp* (TORTORA et al., 1993).

Segundo Humphrey (2004), as Salmonellas apresentam um sistema regulatório complexo, que regula sua resposta em relação ao ambiente externo, podendo ser ativado sob condições de estresse, pH estomacal, intestino humano, mudança de temperatura, baixo nível de oxigênio e água. Ainda de acordo com Audia et al. (2001), a adaptação pode ser induzida, tanto na fase exponencial, quanto na fase estacionária, promovendo, nessas situações, maior resistência à acidez letal e outros tipos de estresse.

Existe a possibilidade de células ácido-adaptadas induzirem proteção cruzada contra estresses ambientais que podem ser encontrados durante o processamento de alimentos, incluindo sal, aquecimento (LEYER; JOHNSON, 1993; TOSUN; GÖNÜL, 2003), agentes de superfície e lactoperoxidase (LEYER; JOHNSON, 1993). Esse fenômeno de proteção cruzada produzido pela acidez ainda é pouco conhecido, mas pode estar relacionado a atividade de vários reguladores globais em resposta a mudanças do pH interno e externo (AUDIA et al., 2001).

A adaptação ácida pode ser um importante mecanismo de sobrevivência de microrganismos em indústrias de alimentos, sendo que a sua avaliação pode ser útil para identificar a eficácia de métodos de conservação e desinfecção. Um melhor entendimento sob a adaptação ao estresse pode aumentar o conhecimento sobre microrganismos patogênicos específicos e como controlá-los, contribuindo com a segurança dos alimentos (LEYER; JOHNSON, 1992) e prevenção de doenças (TOSUN; GÖNÜL, 2003).

## **CAPÍTULO I.**

### **PREDICTION OF LACTIC-BACTERIA GROWTH IN TURKEY HAM PROCESSED BY HIGH HYDROSTATIC PRESSURE**

**Prediction of Lactic-Bacteria Growth in Turkey Ham Processed by High Hydrostatic Pressure**

**Simone P. Mathias, Amauri Rosenthal, Arlene Gaspar, Gláucia M. F. Aragão, Adriana Slongo-Marcusi, Rosires Deliza**

Simone P. Mathias. Federal Rural University of Rio de Janeiro, DTA, Rodovia BR 465, Km7, Seropédica-RJ, Brazil.  
A. Rosenthal\*. Embrapa Labex Brazil-Europe, Laboratory of Food and Microbial Engineering (GPMA), University of Bourgogne and Agrosup Dijon, 21000 Dijon, France, +33(0)380774056  
Arlene Gaspar. Federal Rural University of Rio de Janeiro, DTA, Rodovia BR 465, Km7, Seropédica-RJ, Brazil.  
Gláucia M.F. Aragão. Federal University of Santa Catarina, EQA/CTC, Florianópolis, S.C., Brazil  
A. Slongo-Marcusi. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense, Cabo Frio, RJ, Brazil  
Rosires Deliza. Embrapa Labex Brazil-Europe, INRA, UMR CSGA, Dijon, France.

Financial support: FAPERJ and FINEP (Brazil) for funding the project and CAPES for awarding the scholarship.

Equipments and infra-structure: Processing and analyses were carried out at Embrapa Food Technology (Rio de Janeiro, Brazil)

**Abstract** High hydrostatic pressure (HHP) has been investigated and already industrially applied to extend shelf life of meat-based products. Traditional ham stored under refrigeration and microaerophilic conditions may sometimes present high population level of deteriorating lactic acid bacteria, which limits shelf life due to development of unpleasant odor and greenish and sticky appearance. This study aimed to evaluate the shelf life of turkey ham pressurized at 400 MPa/15 minutes and stored at fridge temperatures 4, 8 and 12° C, in comparison to the non pressurized product. The population of lactic acid bacteria was considered the limiting shelf life parameter up to 10<sup>7</sup> CFU/g of product. It was found that by using the storage temperature of 4°C, the commercial viability of the control sample resulted in 45 days while the pressurized sample achieved 75 days, showing that the high pressure process greatly increased the product shelf life. Predictive models using Gompertz and Baranyi & Roberts models fitted well both for the pressurized and control samples, allowing further prediction of product shelf life according to the storage conditions. These results indicated that the high hydrostatic pressure treatment may more than double the commercial viability of turkey ham in comparison to the usual length, by slowing down the growth of microorganisms in the product.

**Keywords:** High hydrostatic pressure, predictive models, lactic acid bacteria, turkey ham.

**Introduction**

For many years, conventional thermal treatment has constituted the method most widely employed to ensure the microbiological safety of foods. Recent trends in processing have aimed to produce more healthy, nutritious and convenient foods. High hydrostatic pressure (HHP) treatment is currently considered as an attractive, nonthermal process to preserve foods (Knorr 1993). HHP is an emerging technology that is receiving a great deal of attention as shown by research and commercialization efforts performed worldwide. Within the meat sector, the

technology offers a valuable alternative to the thermal pasteurization to be applied after product manufacture, especially for convenience products (Rastogi et al. 2007).

This technology produces morphological, biochemical and genetic changes in the microorganisms, and particularly affects their membranes and cell walls (Sangronis et al. 1997). It increases cell permeability and inhibits reactions and energy production by denaturing enzymes that are essential for growth and microbial reproduction (Calderón-Miranda et al. 1998). The treatment can ensure the destruction of up to 8 log units of certain types of bacterial cells, without altering the flavor and nutritional value of foods (Dogman & Erkmen, 2004). The capacity for destruction or inactivation of microorganisms by high hydrostatic pressure process varies according to the level, time and temperature of pressurization, the type of microorganism and its growth stage, as well as the food composition (mainly depending on the pH and water activity) (Calderón-Miranda et al. 1998; Rosenthal & Silva, 1997).

A cooked, cured meat product is a perishable product spoiled mainly by acid lactic bacteria (LAB) and it is a cause of discoloration, slime formation, off-odors and off-flavors as the result of their metabolic activity producing various products. These microbial products in conjunction with the microbial population could be used to assess the degree of spoilage of this type of product (Mataragas et al. 2007). When meat products are stored under refrigeration and microaerophilic conditions, such as vacuum or modified atmosphere packaging, lactic acid bacteria may very often predominate in the product deterioration. Since these products are commonly heated usually within the range of 68 to 75°C, most vegetative cells are killed and recontamination of the post-heating products determines the commercial validity (Borch et al. 1996; Vermeiren et al. 2004). The recontamination after cooking, especially by the microbiota present in processing courts of industries, is considered as the main factor, along with the storage temperature, which affects the shelf life of meat products (Samelis et al. 1998). Typically, the initial count of lactic acid bacteria in meat products packaged under vacuum is low, but increases during storage under refrigeration and can cause evident deterioration when the count reaches 7 to 8 log 10 CFU/g (Santos et al. 2005; Vermeiren et al. 2005).

The prediction of shelf life allows companies to optimize their storage management and is, due to the minimization of economic losses, one of the most important company planning issues these days (Raab et al. 2008). During the last years, several models have been developed to predict the growth of the specific spoilage organism (SSO) in fresh food products such as meat and meat products (Baranyi et al. 1995; Mataragas et al. 2006; Gospavic et al. 2008). The majority of the developed shelf-life models for chilled products describe the growth of the SSO depending on the temperature, because this is the most important influencing factor on shelf life (Zwietering et al. 1991; McMeekin et al. 1992). Food microbiologists have sought efficient models to describe microbial growth that may allow its prediction and consequences during food storage (Baranyi & Roberts, 1994). They have been using a classic three parameters model in the characterization of bacterial growth: the lag phase ( $\lambda$ ) the maximum specific growth rate ( $\mu$ ) and maximum population density within a certain growth period ( $A$ ) (Baty et al. 2004).

This study aimed to model the growth of lactic acid bacteria in pressurized turkey ham in comparison to the unpressurized product (control) at different storage temperatures, estimating the trade product validity in each case.

## Material and Methods

### *Material*

Turkey legs, frozen, packed in small plastic bags containing about 1.2kg per package and gathered in cardboard boxes with 15kg each for commercialization, were acquired from a company based in southern Brazil which distribution network includes Rio de Janeiro city. The company works with special cuts of frozen turkey and delivers the goods in temperature-controlled trucks, following all the basic requirements of hygiene and conservation. The goods were stored at -18°C in a refrigerator.

### *Methods*

The experimental work was carried out at Embrapa Food Technology. For the manufacture of ham, first a "toilet" was carried out on the frozen turkey thigh, using knives for removing bones, tendons, nerves, and skin, and cut the meat into smaller pieces. For the formulation additives and spices were used, purchased from the company Duas Rodas Industrial ®, which is certified ISO 9001/2000 and ISO 14001 for the manufacture of all its products. The components of the brine were weighed and diluted in cold water, by constantly stirring up to complete dissolution until it was added to the meat. The meat mixed with brine was taken to the "cutter" (*Geiger, model UMI2*) in which alternating operation (2 or 3) were carried out lasting few seconds each, in order to reduce the meat into smaller pieces to obtain a more homogeneous mass. Next it was transferred to a plastic container covered with a lid and brought to the refrigerator at 5°C, where it remained for 24 hours. After this period, the mass in portion of 2.5kg in average each was placed in high temperatures resistant plastic (cook-in), enclosed in a vacuum sealer (*Engevac, model 30 gas*) and placed in stainless steel cooking forms. The cooking was carried out in an autoclave by setting and controlling the internal temperature of the product at 72°C, by using an internal temperature controller (*model ELLAB*) connected to thermocouples placed in different parts of the control. After cooking, the product was cooled in ice bath for 40 minutes and then stored in the refrigerator at 4°C for 24 hours. After that period, the turkey ham was ready to be vacuum packed and undergo high hydrostatic pressure treatment. The pieces of turkey ham were sliced (*SKYMSEN, model CFI-300*) into 0.5 mm thickness slices and packaged in plastic film, being kept in cold room up to the processing time. For aseptic assurance all manipulation was carried out inside an air flow chamber (*Booth FLV-K, series 256-8I*) with all materials previously facing the action of UV light for at least 15 minutes. Each- sterile plastic bags containing sliced turkey ham and sealed under vacuum measured in average 10cm x 4cm.

The high hydrostatic pressure equipment used was a laboratory model (*Stansted Fluid Power, model S-FL-850-9-W*), located in Embrapa Food Technology. The equipment has the capacity to operate at a pressure of 100 MPa to 900 MPa, at temperatures between 0 to 80°C and various time intervals. The equipment was controlled through a digital panel for adjusting pressure, time and temperature. The samples of turkey ham were placed inside the cylinder-shaped, stainless steel sample holder, containing several holes through which circulates the pressurizing liquid, in this case 70% alcohol. At the end of the process, the chamber was opened and samples were taken from the pressurized cylinder and destined to microbiological analysis.

### *High pressure operating conditions*

Pressure level of 400 MPa for 15 minutes was used at room temperature, based on the results obtained by Slongo et al. (2009) focusing on storage of pork ham treated by high pressure. According to the study it was concluded that the conditions above specified significantly increased the commercial viability (cv) of the pork ham and preserved sensory properties, being therefore adopted as a model for the present study.

### *Microbiological analysis*

To perform the microbiological testing, samples were handled in the flow chamber cleaned, removing aseptically 5.000 g and divided into sterile bags (*Nasco WHILE-PACK*®) containing 25 g each, vacuum packed and stored at 4, 8 and 12°C for 75 days.

The commercial viability of turkey ham and pressurized control was determined based on the research of lactic acid bacteria (LAB) following the methodology recommended by Hall et al. (2001). From each piece of turkey ham, either control (unpressurized) or pressurized, 25 g of product were aseptically sampled, placed in sterile bags and added by 225 mL of peptone water (1%). Samples were homogenized for 60 seconds in *stomacher*, following by dilution and plating on agar culture of Man, Rogosa, Sharp (MRS), and incubation at 30°C for 5 days. The analyses were performed in duplicate and results were expressed in Log (N) (N: colony forming unit end [CFU/g]), until microorganism growth reached the stationary phase.

### *Evaluation of the predictive model*

The predictive models of Modified Gompertz and Baranyi were adjusted to the growth curves using software Matlab® (Math Works, Natick, MA, USA) and DMFit 2.1 (Baranyi & Roberts, 1994), respectively.

The Modified Gompertz Model (Gibson et al. 1987) is defined by the equation:

$$\text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu \cdot e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (1)$$

where  $\lambda$  is the extension of lag phase (days);  $\mu$  is the rate of exponential microbial (days<sup>-1</sup>), A is the logarithmic increase of population and t is time of storage.

The Baranyi Model (Baranyi & Roberts, 1994) is represented by the equation below, where A, B, C and D are mathematically rearranged:

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = D + B t + \frac{\ln(e^{-n B t} + e^{-C} - e^{-n B t - C})}{B} \quad (2)$$
$$\frac{\ln\left(1 + \frac{e^{m B t + \frac{\ln(e^{-n B t} + e^{-C} - e^{-n B t - C})}{B}} - 1}{e^{m(A-D)}}\right)}{m}$$

Constants have the following physical meaning:  $A = y_{\max}$ ,  $B = \mu_{\max}$ ,  $C = h_o = \lambda \cdot \mu_{\max}$ ,  $D = v$  and  $n = \frac{\mu_{\max}}{v}$

### Statistical analysis

The following statistical indices were used in order to compare the performance of models: mean-squared error (MSE), regression coefficient ( $R^2$ ), bias factor and accuracy factor. The lower the value of MSE, the better is the fit of the model to experimental data (Sutherland & Bayliss, 1994). The MSE is defined in the following equation:

$$MSE = \Sigma (O-P)^2 / (n-p). \quad (3)$$

In which O represents the observed value, P is the predictive value, n is the number of experimental points and p is the number of model parameters). The *bias* factor is represented by the equation:

$$BF = \exp[\Sigma(\ln(P/O))/n] \quad (4)$$

and consists of an estimate for the average difference between the observed and predicted and should be close to 1. If the value is greater than 1, it indicates that the expected value is greater than that observed, but if it is less, it indicates that the predicted value is lower than that observed. The factor of accuracy is the sum of absolute differences between predictions and observations and measures the overall error of the model and is calculated by the equation:

$$AF = \exp\left[\frac{(\Sigma | \log(\text{Value}_{\text{predicted}} / \text{Value}_{\text{observed}}) |)}{n}\right] \quad (5)$$

The higher this value is the lower is the accuracy of the estimate of the average.

## Results and Discussion

The microbiological parameters of growth: A - logarithmic increase of the population,  $\mu$  - maximum specific growth days<sup>-1</sup>),  $\lambda$  - duration of the lag phase (days) and time in days to reach the end of the commercial viability for the growth of lactic acid bacteria in turkey ham are presented in Table 1. These results were obtained by fitting the modified Gompertz model to the growth curves of LAB for the storage temperature of 4 and 12°C, both in the control and pressurized samples. For the conditions of control and pressurized at 8°C, the modified Gompertz model did not provide a good fit and the model of Baranyi was instead used for a better fit of the curves.



**Table 1.** Kinetic parameters for growth of Lactic Acid Bacteria adjusted to Modified Gompertz and Baranyi models.

T (°C)	Control					Pressurized					
	CV (days)	A	$\lambda$ (days)	$\mu$ (day <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>	CV (days)	A	$\lambda$ (days)	$\mu$ (day <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	
4	40	<b>Modified Gompertz Model</b>				0,948	75	<b>Modified Gompertz Model</b>			
		6,401	25	0,4326	0,1501			0,956			
8	25	<b>Baranyi Model</b>				0,976	65	<b>Baranyi Model</b>			
		----	----	0,2387	0,0841			0,959			
12	24	<b>Modified Gompertz Model</b>				0,984	30	<b>Modified Gompertz Model</b>			
		6,208	6	0,4521	0,317			0,999			

The experimental and adjusted LAB growth curves under different storage conditions, according to either the modified Gompertz model and Baranyi model, are shown in Table 2.

The storage temperature was shown to have great influence on the growth of LAB. The parameters obtained in the study showed the importance of maintaining low temperatures to achieve greater commercial viability, and yet it can be seen that the use of high hydrostatic pressure led to highly increased commercial viability and a reduction of  $\mu$ . Such implications were evident from the fact that the pressurized turkey ham stored at 12°C showed greater validity when compared to the control ham stored at 8°C. It was also observed that at 4°C the commercial viability of the control sample achieved 45 days, while the pressurized sample lasted up to 75 days, assuring extra 30 days for commercialization.

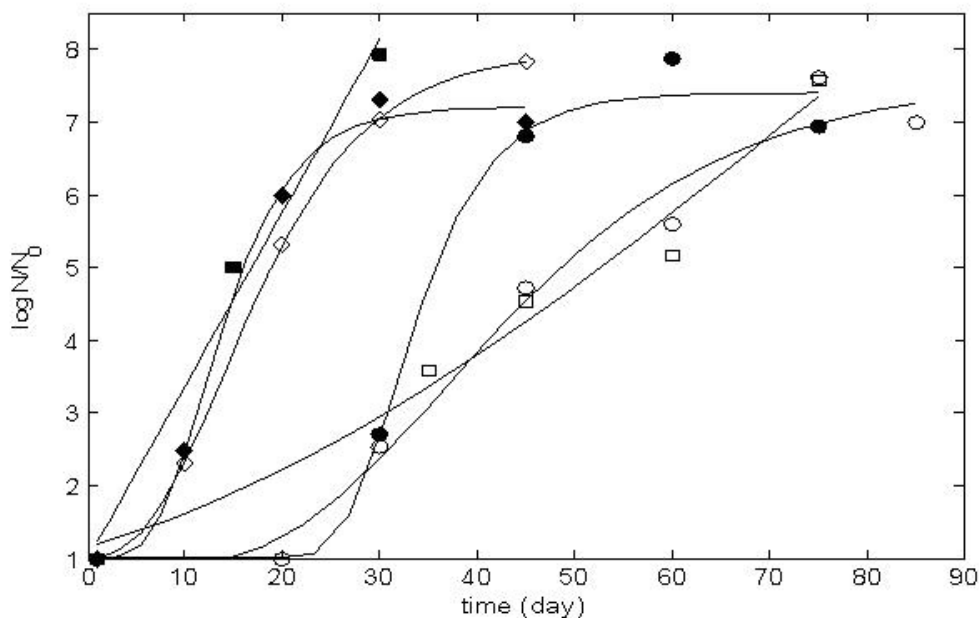
**Table 2.** Statistics obtained from the fitting for modified Gompertz model and Baranyi of lactic acid bacteria population in pressurized vacuum packed turkey ham, in comparison to the control, and stored at 4, 8 and 12°C.

Predictive Model	Statistical parameters			
	r <sup>2</sup>	MSE	Bias factor	Accuracy factor
<b>Control stored at 4°C</b>				
Modified Gompertz Model	0,948	0,05878	0,9989	1,0294
<b>Pressurized stored at 4°C</b>				
Modified Gompertz Model	0,9586	0,11615	0,9989	1,0864
<b>Control stored at 8°C</b>				
Baranyi Model	0,9768	0,09382	1	1,0396
<b>Pressurized stored at 8°C</b>				
Baranyi Model	0,9595	0,1394	1,0078	1,0437
<b>Control stored at 12°C</b>				
Modified Gompertz Model	0,9843	0,0254	1,00195	1,01812
<b>Pressurized stored at 12°C</b>				
Modified Gompertz Model	0,9999	0,00017	0,99967	1,00203

To date, most studies of high pressure treatment on the microflora of ready to eat and meat products have been directed to control after processing storage temperature at 4°C, instead of including temperature abuse evaluation (Kreyenschmidt et al. 2009). In this study a higher temperature (12°C) was also used aiming at reproducing possible unexpected variations temperature abuse that can occur in storage and to allow the models used to predict the validity of these unfavorable conditions. It could be verified that even at higher temperatures high pressure processed turkey ham showed satisfactory shelf-life, when compared with the control stored at lower temperature, based on lactic bacteria growth.

Figure 1 represents the growth curves of lactic acid bacteria according to storage temperatures at 4, 8 and 12°C, applying predictive models of modified Gompertz and Baranyi. The curves of microbial growth presented in overall good fit, giving important information about

the potential growth of lactic bacteria and commercial viability of turkey ham for each storage temperature.



**Figure 1.** Growth curves of lactic acid bacteria in control and pressurized turkey ham at different storage temperatures.

**Legend:** ● control 4°C    ● adjustment of control 4°C (Gompertz modified model)    ◻ pressurized 4°C    ◻ adjustment of pressurized 4°C (Gompertz modified model)    ■ control 8°C    ■ adjustment of control 8°C (Baranyi model)    ◻ pressurized 8°C    ◻ adjustment of pressurized 8°C (Baranyi model)    ◆ control 12°C    ◆ adjustment of control 12°C (Gompertz modified model)    ◊ pressurized 12°C    ◊ adjustment of pressurized 12°C (Gompertz modified model)

In pork ham treated at 400 MPa for 15 minutes at a temperature of 8°C, Slongo et al. (2009) obtained commercial viability of 85 days in comparison to the control, which lasted only 19 days. Those results are similar to the presently obtained with turkey ham using the same processing and storage conditions, in which the pressurized sample showed commercial viability of 65 days and the control sample lasted 25 days. According to the studies by Ruiz-Capellas (2007), the high-pressure treatment of 400 MPa for 10 minutes to vacuum packaged ham provided a commercial validity of 77 and 28 days for products stored between 2 and 12°C, respectively. However, López-Caballero et al. (1999), with the same type of product but treated at pressures between 200 MPa and 400 MPa did not attain the same degree of inactivation, and commercial viability achieved at 3°C was only 21 days.

At higher pressures, such as those used by Slongo et al. (2009) with ham slices pressurized at 600 MPa for 5 minutes at 30°C and stored at 5°C for 120 days, LAB population growth had not increase significantly during storage period. Park et al. (2001) in studies with ham processed at 600 MPa for 5 minutes and 25°C showed a reduction of ~ 4 log<sub>10</sub> CFU/g of LAB due to the processing. Garriga et al. (2004) reported that vacuum packaged ham treated at a pressure of 600 MPa for 4 minutes at 16°C showed LAB count after 30 days of 2.10 log<sub>10</sub>, and observed a significant microbial inactivation after pressure treatment. That also agrees with the results from by Carpi et al. (1999), which reported an increase up to 75 days in the commercial viability of sliced cooked ham treated at 600 MPa for 5 minutes, when stored at 4°C.

## Conclusion

Application of High Hydrostatic Pressure at 400 MPa and 15 minutes was effective to greatly delay lactic bacteria growth in turkey ham. The time required for the microbial population to achieve the limit presently defined for the product validity was larger for the stored pressurized sample at 12°C even when compared to the control stored at 8°C. Both Modified Gompertz and Baranyi models provided good fitness for the variation of lactic acid bacteria population with the storage time, showing high determinant coefficients for the regression adjustments. Modified Gompertz models presented better fitting for the lactic bacteria growth for both pressurized and control sample, either stored at 4°C or 12°C, while Baranyi model presented a better fit for samples stored at 8°C. Predictive microbiology showed to be a valuable tool to provide a good estimative of the validity of the product based on lactic bacteria growth, and high hydrostatic pressure proved to be very effective to delay microbial development and allow an extended product shelf life.

## References

- Baranyi J, Robinson TP, Kaloti A & Mackey BM. (1995). Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 27, 61–75.
- Baranyi J & Roberts TA. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.
- Baty F & Delignette-Muller, ML. (2004). Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? *International Journal of Food Microbiology*, 91(3), 261-277.
- Borch E, Kant-Muermans ML & Blixt Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 103-120.
- Calderón-Miranda ML, González MFSM & Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG. (1998). Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: variables e inactivación microbiana. *Brazilian Journal of Food Technology*, 1, 3-11.
- Carpí G, Squarcina N, Gola S, Rovere P, Pedrielli R & Bergamaschi M. (1999). Application of high pressure treatment to prolong the refrigerated shelf-life of sliced cooked ham. *Industria Conserve*, 74, 327-339.
- Dogman C & Erkmen O. (2004). High pressure inactivation Kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation in broth, milk, and peach and orange juice. *Journal of Food Engineering*, 62, 47-52.
- Gospavic R, Kreyenschmidt K, Bruckner S, Popov V & Haque N. (2008). Mathematical modelling for predicting the growth of *Pseudomonas ssp.* in poultry under variable temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 290–297.
- Hall PA, Ledenbach L & Flowers RS. Acid Producing Microorganisms. In: Downes FP & Ito K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4<sup>th</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 2001, 19, p.201-207.
- Knorr D. (1993). Effects of high hydrostatic pressure processes on food safety and quality. *Food Technology*, 47 (6), 156-161.
- Kreyenschmidt J, Hübner A, Beierle E, Chonsch A, Scherer A & Petersen B. (2009). Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 510-520.
- López-Caballero ME, Carballo J & Jimenez-Colmenero. (1999). Microbiological changes in pressurized, prepackaged sliced cooked ham. *Journal of Food Protection*, 62(12), 1411-1415.

- Mataragas M, Drosinos EH, Vaidanis A & Metaxopoulos, I. (2006). Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions. *Journal of Food Science*, 71, 157–167.
- Mataragas M, Skandamis P, Nychas G-JE & Drosinos EH. (2007). Modeling and predicting spoilage of cooked, cured meat products by multivariate analysis. *Meat Science*, 77, 348–356.
- McMeekin TA, Ross T & Olley J. (1992). Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 13–32.
- Park SW, Sohn KH, Shin JH & Lee HJ. (2001). High hydrostatic pressure inactivation of *Lactobacillus viridescens* and its effect on ultrastructure of cells. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 775-781.
- Raab V, Bruckner S, Beierle E, Kampmann Y, Petersen B & Kreyenschmidt J. (2008). Generic model for the prediction of remaining shelf life in support of cold chain management in pork and poultry supply chains. *Journal on Chain and Network Science* 8, 59–73.
- Rastogi NK, Raghavarao KSMS, Balasubramaniam VM, Niranjana K & Knorr D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 69–112.
- Rosenthal A & Silva JL. (1997). Alimentos sob pressão. *Engenharia de alimentos*, 14, 37-39.
- Ruiz-Capillas C, Carballo J & Colmenero FJ. (2007). Biogenic amines in pressurized vacuum-packed cooked sliced ham under different chilled storage conditions. *Meat Science*, 75, 397-405.
- Samelis J, Kakouri A, Georgiadou KG & Metaxopoulos J. (1998). Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 649-660.
- Sangronis E, Pothakamury U, Ramos AM, Ibraiz A, Barbosa-Cánovas GV & Swanson, BG. (1997). La alta presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento no térmico de los alimentos. *Alimentaria*, 283, 33-43.
- Santos EM, Jaime I, Rovira J, Lyhs U, Korkeala H & Björkroth J. (2005). Characterization and identification of lactic acid bacteria in “Morcilla de Burgos” *International Journal of Food Microbiology*, 97, 285-296.
- Slongo AP, Rosenthal A, Camargo LMQ, Deliza R, Mathias SP & Aragão GMF. (2009). Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. *LWT-Food Science Technology*, 42, 303-6.
- Sutherland JP & Bayliss AJ. (1994). Predictive modelling of growth of *Yersinia enterocolitica* : the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 197-215.
- Vermeiren L, Devlieghere F & Debevere J. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 149-164.
- Vermeiren L, Devlieghere F, De Graef V & Debevere J. (2005). In vitro and in situ growth characteristics and behaviour of spoilage organisms associated with anaerobically stored cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 33-42.
- Zwietering MH, de Koos JT, Hasenack BE, de Wit JC & van't Riet K. (1991). Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1094–1101.

## **CAPÍTULO II.**

### **EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO PRESUNTO DE PERU ARMAZENADO EM TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO E ABUSIVA**

# Efeito da Alta Pressão Hidrostática na Qualidade Microbiológica do Presunto de Peru Armazenado em Temperatura de Refrigeração e Abusiva

Simone Pereira Mathias, Amauri Rosenthal, Arlene Gaspar, Rosires Deliza e Renata Torrezan

## RESUMO

As bactérias ácido lácticas (BAL) envolvem um grupo de microrganismos responsáveis pela fermentação de alimentos, mas podem também causar deterioração em produtos cárneos embalados a vácuo conferindo, aos mesmos, odor desagradável, cor esverdeada e limosidade ao atingirem contagens em torno de  $10^7$  UFC/g, tornando o produto impróprio para o consumo. A tecnologia de alta pressão hidrostática (APH) consiste em um tratamento não térmico, que usa pressões elevadas para conservação de alimentos, sendo considerada atualmente um grande atrativo para a indústria de produtos cárneos, principalmente pelo alto potencial de inativação de microrganismos aliada ao aumento da validade comercial. Por esse motivo, no presente estudo, foi utilizado o presunto de peru, submetido a pressão de 400 MPa por 15 minutos a 25°C, e posteriormente armazenado em temperaturas de refrigeração de 7°C e temperatura de abuso de 13°C, comparado ao controle (não pressurizado). O ágar MRS foi usado para contagem das BAL, expressa em UFC/g e analisada estatisticamente por análise de variância e teste de Tukey, a amostra controle, armazenada a 7°C, alcançou a validade comercial de 35 dias ( $1,46 \times 10^7$  UFC/g), e a armazenada a 13°C, de 21 dias ( $1,25 \times 10^7$  UFC/g). Já para as amostras pressurizadas armazenadas a 7°C, foi observado um aumento de 56 dias quando comparada com amostra controle, resultando em validade comercial de 91 dias ( $1,70 \times 10^7$  UFC/g), enquanto no armazenamento a 13°C o aumento de validade foi de 21 dias, com o produto apresentando validade comercial de 42 dias ( $1,79 \times 10^7$  UFC/g). Dessa forma, ficou evidenciado que o tratamento prévio a alta pressão propiciou amplo aumento na validade comercial do presunto de peru, tanto à temperatura normal de refrigeração como abusiva, porém de forma menos pronunciada na segunda condição, quando a condição inadequada associada a temperatura superior acarretou menor tempo possível de potencial comercialização do produto.

**Palavras-chave:** alta pressão hidrostática, bactérias ácido-lácticas, armazenamento refrigerado, presunto de peru.

---

Simone P. Mathias. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, DTA, Rodovia BR 465, Km7, Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: [spmathias@ufrj.br](mailto:spmathias@ufrj.br)

Amauri Rosenthal. Embrapa Labex Brazil-Europe, Laboratory of Food and Microbial Engineering (GPMA), University of Bourgogne and Agrosup Dijon, 21000 Dijon, France, +33(0)380774056

Arlene Gaspar. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, DTA, Rodovia BR 465, Km7, Seropédica, RJ, Brasil.

Rosires Deliza. Embrapa Labex Brazil-Europe, INRA, UMR CSGA, Dijon, France.

Renata Torrezan. Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas, 29501, Guaratiba, Rio de Janeiro, R.J, Brasil.

## ABSTRACT

The lactic acid bacteria (LAB) involved a group of microorganisms responsible for food fermentation which can also cause deterioration in meat products packaged under vacuum, giving them, unpleasant odor, slime green color and by reaching around  $10^7$  CFU/g, making the product unfit for consumption. The technology of high hydrostatic pressure (HHP) treatment consists of a non-thermal, which uses high pressure for food preservation and is currently considered a major attraction for the industry of meat products, mainly for the high potential to inactivate microorganisms combined with increased commercial validity. Therefore, in this study, we used turkey ham treated under pressure at 400 MPa for 15 minutes at 25°C and then stored at refrigeration temperatures of 7°C and abuse temperature of 13°C, compared to the control. The MRS agar was used for counting the LAB population which was expressed in CFU/g and statistically assessed by variance analysis and Tukey test. The control sample stored at 7°C reached commercial validity in 35 days ( $1.46 \times 10^7$  CFU/g) while the control stored at 13°C achieved 21 days ( $1.25 \times 10^7$  CFU/g) of storage. The pressurized samples stored at 7°C resulted in 91 days ( $1.70 \times 10^7$  CFU/g) of commercial validity, which represented a period 56 days higher than the control, while the sample stored at 13°C resulted in a commercial validity of 42 days ( $1.79 \times 10^7$  CFU/g), 21 days greater than the control. Thus, it was evident that the preliminary high pressure treatment resulted in higher commercial validity of the turkey ham, both at the normal refrigerated temperature and at the abusive refrigeration condition. However, the benefits of the treatment was much higher in the normal refrigerated than in the abusive temperature, in which higher temperature lead to a shorter possible time of the product commercialization.

**Keywords:** high hydrostatic pressure, lactic acid bacteria, cold storage, turkey ham.

## 1. INTRODUÇÃO

O processo de cozimento de produtos cárneos leva à condições praticamente estéreis e após esse procedimento a concorrência entre os microrganismos é pequena, restando apenas alguns sobreviventes. Parte dos microrganismos deteriorantes será introduzida após processamento, favorecendo o desenvolvimento, alcançando assim contagens elevadas (BORCH et al., 1988). De acordo com Samelis et al. (1998) a contaminação após processamento é oriunda principalmente da microbiota presente nas indústrias, sendo considerado como um dos principais fatores, juntamente com a temperatura de armazenamento, que afetam a validade comercial de produtos cárneos.

Segundo Balasubramaniam e Farkas (2008), o processamento térmico é um método primário de pasteurização e esterilização de alimentos, contudo a aplicação do calor intenso pode prejudicar a qualidade dos alimentos. Como alternativa para esse método tradicional, o processamento de alta pressão (APH) utiliza pressões elevadas com ou sem adição de calor e serve para inativar microrganismos, e tem-se tornado um tema de grande interesse, sendo citada como uma das melhores inovações tecnológicas para transformação de alimentos, dos últimos cinquenta anos (DUNNE, 2005). De acordo com López-Caballero et al. (2002), a pressão pode causar danos à fisiologia microbiana e à sua viabilidade, podendo causar danos ou inativar completamente a célula microbiana, levando a um aumento da validade comercial. O processamento por alta pressão hidrostática sob refrigeração, temperatura ambiente ou aquecimento moderado, pode inativar os microrganismos deteriorantes em diferentes níveis, com poucas mudanças no frescor dos produtos quando comparado com o processo de conservação

convencional (TORRES; VELAZQUEZ, 2005). De acordo com Balasubramaniam e Farkas (2008), pressões entre 200 e 600 MPa são eficazes para inativação de patógenos e células vegetativas de microrganismos deteriorantes, podendo ser usada usada com sucesso após o processamento convencional, para descontaminação de produtos cárneos (SLONGO et al., 2009).

Os produtos cárneos embalados a vácuo e armazenados em temperaturas de refrigeração possuem como principal população microbiana, as bactérias ácido lácticas (SAMELIS et al., 2000). Korkeala et al. (1989) citaram que podem ser observados como resultado da atividade microbiana das BAL a cor esverdeada, exsudação, limosidade e odor desagradável e o grau de deterioração é determinado por fatores extrínsecos e intrínsecos, tais como a composição do alimento, a atividade de água, o método de embalagem e a temperatura de armazenamento.

Nychas et al. (2008) puderam avaliar que, em relação a aceitação dos consumidores, a maioria concorda que quando a deterioração de produtos cárneos progride ocorre uma intensa descoloração, odor desagradável, bem como o desenvolvimento do limo superficial, o que constitui em um dos principais critérios qualitativos de rejeição desses produtos.

A capacidade de sobrevivência ou multiplicação dos microrganismos que estão presentes em um alimento dependem de uma série de fatores, dentre estes estão aqueles relacionados com as características próprias do alimento (intrínsecos) e os fatores relacionados com o ambiente em que o alimento se encontra (extrínsecos). A temperatura de armazenamento consiste no fator extrínseco mais importante relacionado com a multiplicação dos microrganismos (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Segundo Kennedy et al. (2005), muitas das vezes as condições de temperatura durante o transporte e no varejo não atendem as devidas especificações fugindo ao controle do fabricante. Os autores relataram que 3% dos produtos produzidos no Sul da Europa foram mantidos em temperaturas de 10°C no mercado varejista e nos frigoríficos, e que no Norte da Europa, 5% estavam acima dos 13°C no varejo e acima dos 10°C em domicílio, comprometendo a qualidade do produto. O risco potencial para a validade comercial dos produtos refrigerados processados e embalados que seguem as boas práticas de fabricação são determinados pelas condições de temperatura aplicada à cadeia de distribuição de frios (WELLS; SING, 1989).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o crescimento de bactérias ácido lácticas em presunto de peru controle e pressurizado armazenado em temperatura de refrigeração e abusiva.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Processamento do presunto de peru

O produto foi elaborado na Embrapa Agroindústria de Alimentos. Utilizaram-se coxas de peru congeladas, embaladas em sacos plásticos contendo aproximadamente 1,2 kg por embalagem, adquiridas de uma empresa sediada no Sul do Brasil e que possui distribuição no Rio de Janeiro. Realizou-se a limpeza da coxa de peru, retirando-se tendões, nervos, pele e ossos, cortando-as em pedaços menores. O produto foi formulado segundo Mathias (2008) e foram adquiridos aditivos e condimentos da empresa Duas Rodas Industrial. Os componentes da salmoura foram pesados e diluídos em água gelada, sob agitação constante para completa dissolução, até que fosse adicionada à carne. Em seguida, a carne foi misturada à salmoura, levando-a ao “cutter” (*Geiger* e modelo UM12), com intuito de reduzir a carne a pedaços menores até a obtenção de uma massa mais homogênea, que depois foi transferida para um recipiente plástico com tampa e levada para câmara frigorífica a 7°C, permanecendo por 24 horas.



Após este período, a massa de 2,5 kg embutida em embalagem plástica resistente a altas temperaturas (*cook-in*), foi fechada em uma seladora a vácuo (*Engevac* - modelo 30 gás) e posteriormente colocada em formas de aço inoxidável para o cozimento, e este foi realizado em autoclave até que a temperatura interna do produto atingisse 72°C, cuja verificação foi feita com controlador interno de temperatura (modelo *ELLAB*) em umas das peças controle. Após o cozimento, o produto foi resfriado em banho de gelo por 40 minutos e, posteriormente, armazenado em BOD a 4°C durante 24 horas.

## **2.2. Preparo da amostra**

Após esse período, o presunto foi fracionado em condições de assepsia adequadas, com uso de utensílios e equipamentos previamente higienizados, embalado a vácuo (seladora *Engevac* e modelo 30 gás) utilizando-se sacos plásticos estéreis (*Nasco WHIL-PACK®*), de onde foram separadas amostras controle (c) e amostras pressurizadas (p) com 10 g cada.

As amostras controle e pressurizadas foram armazenadas em câmara frigorífica de refrigerados a 7°C (simulando a temperatura de um refrigerador, com as devidas variações) e 13°C (simulando a temperatura de abuso, situação ocorrida ao se deixar o presunto fora da refrigeração na armazenagem e transporte inadequados), durante o período de validade do produto.

## **2.3. Tratamento a alta pressão hidrostática**

Foi utilizada a pressão de 400 MPa por 15 minutos em temperatura ambiente, baseando-se no delineamento experimental realizado por Slongo (2008), referente ao acompanhamento da validade comercial do presunto suíno submetido à alta pressão. Através desse estudo, foi concluído que nas condições citadas acima houve aumento significativo da validade comercial do presunto e preservação das propriedades sensoriais, sendo por esse motivo, tal condição adotada no presente trabalho.

As amostras trituradas e embaladas a vácuo foram então submetidas ao tratamento de alta pressão. O equipamento de alta pressão hidrostática (*Stansted Fluid Power* e modelo S-FL-850-9-W) utilizado é um modelo laboratorial, sendo controlado através de um painel para o ajuste da pressão, tempo e temperatura desejada, de acordo com o planejamento experimental. As amostras de presunto de peru foram colocadas dentro do suporte de adição de amostras, em forma de cilindro, de aço inoxidável e com aproximadamente 7,0 cm de diâmetro e 20,0 cm de comprimento, com vários orifícios por onde circula o líquido pressurizador, neste caso álcool 70%. A câmara contendo o suporte de amostras foi hermeticamente fechada e vedada para evitar vazamentos. Primeiramente, uma bomba pneumática foi acionada na câmara, injetando uma pré-carga até que os selos da mesma se fechassem. Posteriormente, foi acionada automaticamente, uma segunda bomba hidráulica que deslocou um pistão e elevou a pressão até a condição de trabalho desejado caracterizando, assim, dois estágios de pressurização. O tempo de processo foi contado a partir do momento em que a câmara alcançou a pressão desejada, até o início da despressurização. Ao término do ciclo, após a despressurização, a câmara foi aberta e as amostras pressurizadas foram retiradas do cilindro e enviadas para as respectivas análises.

## 2.4. Análise microbiológica - Isolamento e Plaqueamento das BAL

As análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de microbiologia e para isolamento e avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas (BAL) seguiu-se a metodologia preconizada por Hall et al.(2001).

Para essa análise foi realizada uma alteração em relação à quantidade de amostra, contudo, mantendo a proporção da diluição (0,1) proposta na metodologia (25 g da amostra para 225 mL de água peptonada a 0,1%). Esse procedimento foi realizado após testes iniciais e demonstrou que melhora a homogeneidade e resulta em maior representatividade global, por se tratar de um alimento sólido e de difícil homogeneidade. Para isso, de cada peça de presunto de peru controle (não pressurizado) e pressurizado, retirou-se, de forma asséptica, em câmara de fluxo laminar (marca Veco, modelo VLFS-12), 10 g de amostra que foram colocados em sacos estéreis com tarja de separação (Nasco WHIL-PACK®) e acrescidos de 90 mL de água peptonada a 0,1% .

Homogeneizou-se a amostra por 2 minutos em stomacher (marca Nova Ética), realizando-se na seqüência as diluições decimais seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  em tubos de 9 mL de água peptonada a 0,1%, homogeneizados em agitador tipo vórtex e depois feito plaqueamento pour-plate e sobrecamada em ágar de Man, Rogosa, Sharp-MRS (Oxoid), seguido de incubação em BOD a 30°C de 3 a 5 dias. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram analisados em contador de colônias (CP600 Plus-Phoenix) expressos em Log (N) (N: unidade formadora de colônias final [UFC/g]); até que as amostras atingissem a contagem de  $10^7$  UFC/g (deterioração) e tempos superiores, para alcançar as contagens de decréscimo da colônia.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar que o uso da APH associada à temperatura foram fundamentais para determinar a validade comercial do presunto de peru. Os resultados obtidos para o crescimento das bactérias ácido lácticas em 7°C estão expressos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Dias/tratamento, Média (UFC/g) e log N/No UFC/g do crescimento das bactérias ácido lácticas presentes nas amostras de presunto de peru controle e pressurizada, ao longo da validade comercial, ao atingir contagens de  $10^7$  UFC/g, armazenadas a 7°C.

Dias/tratamento	Média UFC/g	log N/No UFC/g
1*c	1,00E+01 <sup>d</sup>	0,0000
7c	1,00E+01 <sup>d</sup>	0,0000
14c	1,24E+04 <sup>cd</sup>	3,0934
21c	1,30E+06 <sup>c</sup>	5,1139
28c	6,80E+06 <sup>b</sup>	5,8325
35c	1,46E+07 <sup>a</sup>	6,1644
1**p	1,00E+01 <sup>d</sup>	0,0000
7p	1,00E+01 <sup>d</sup>	0,0000
14p	1,00E+01 <sup>d</sup>	0,0000
21p	1,43E+01 <sup>d</sup>	0,1538
28p	1,56E+01 <sup>d</sup>	0,1917
35p	2,75E+01 <sup>d</sup>	0,4393
42p	2,85E+01 <sup>d</sup>	0,4548

49p	4,58E+01 <sup>d</sup>	0,6604
56p	6,63E+01 <sup>b</sup>	0,8212
63p	1,60E+03 <sup>cd</sup>	2,2029
70p	1,55E+03 <sup>cd</sup>	2,1903
77p	4,10E+05 <sup>c</sup>	4,6128
84p	6,27E+06 <sup>b</sup>	5,7973
91p	1,70E+07 <sup>a</sup>	6,2304

Letras diferentes na coluna da média UFC/g diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ), teste de Tukey (n=40). \*c= tratamento controle e \*\*p=tratamento pressurizado de 400 MPa/15 minutos a 25°C.

Nos resultados obtidos para o presunto de peru controle armazenado a temperatura de 7°C, foi observado que a validade comercial alcançada foi de 35 dias, enquanto que para a amostra pressurizada a 400 MPa por 15 minutos, esta resultou em 91 dias, indicando uma diferença de 56 dias e representando um aumento de quase 3 vezes mais, quando comparado ao controle. Em trabalho semelhante realizado por Garriga et al. (2004) com presunto cozido, utilizando pressão de 400 MPa, puderam avaliar que as bactérias ácido lácticas presentes no produto foram oriundas de contaminação cruzada durante o fatiamento e embalagem e as amostras controle apresentaram contagens de  $10^8$  UFC/g em até 30 dias, enquanto que amostras tratadas a alta pressão mostraram um retardamento significativo no crescimento de deteriorantes, mantendo a validade em até 120 dias.

Já em trabalhos realizados por López-Caballero et al. (1999), ao estudarem o efeito da alta pressão hidrostática de 400 MPa por 20 minutos a 7°C, em presunto cozido fatiado e estocado a 2°C, constataram que a pressurização provocou maiores efeitos relevantes quando foram utilizados altos níveis de pressão e maior tempo de processamento, quando comparado com pressões de 200 MPa por 5 minutos, pois a contagem total e de bactérias ácido lácticas foi bastante reduzida, não sendo detectado crescimento em nenhum momento do armazenamento do produto. Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por Slongo (2008) com presunto suíno, que verificou que as amostras controle atingiram o final da validade comercial em 32 dias de armazenamento do produto a 5°C, quando foi observado um aumento significativo na contagem microbiana de bactérias ácido lácticas, enquanto que o presunto pressurizado a 600 MPa a 30°C e armazenado nas mesmas condições não apresentou crescimento microbiano durante 120 dias de armazenamento.

Em estudos realizados por Mathias (2008) com presunto de peru pressurizado a 400 MPa por 15 minutos e armazenado a 4°C, pode-se observar que a amostra controle apresentou validade comercial de até 30 dias, enquanto a amostra pressurizada permaneceu viável por 75 dias, indicando um grau de inativação menor ao ser comparado com as amostras de presunto de peru no tratamento atual, mostrando que a variação é decorrente das condições de preparo e dependem muito do grau de contaminação inicial do produto, oriundas dos processos de fatiamento e embalagem.

Essas diferenciações são possivelmente também exemplificadas pelos estudos realizados por Carpi et al. (1999) que, ao usarem pressão de 600 MPa por 5 minutos em presunto cozido fatiado armazenado a 4°C, observaram que a validade comercial do produto pressurizado foi menor, alcançando 75 dias. Já López-Caballero et al. (1999), com o mesmo tipo de produto mas com pressão de 400 MPa por 20 minutos, não atingiram o mesmo grau de inativação e a validade máxima obtida a 3°C foi de 21 dias, para presunto cozido fatiado e tratado a alta pressão.

Por outro lado, em condições de armazenamento do presunto de peru a 13°C (Tabela 2) observou-se que com 21 dias a amostra controle alcançou o final da validade comercial, e para a amostra pressurizada essa condição foi atingida aos 42 dias. Dessa forma, ficou evidenciado que a temperatura de armazenamento é um fator extrínseco fundamental para o controle do produto e que quanto maior for temperatura de armazenamento, menor será a conservação, porque mais próximo estará da temperatura ótima de crescimento das BAL, que são mesófilas. Logo, maiores cuidados são necessários no controle da temperatura, principalmente em condições onde ocorrem flutuações relacionadas com o tipo de armazenamento, transporte inadequado, preparo do produto em temperatura ambiente e exposição do alimento sem a devida refrigeração, todos esses fatores representando condições de risco.

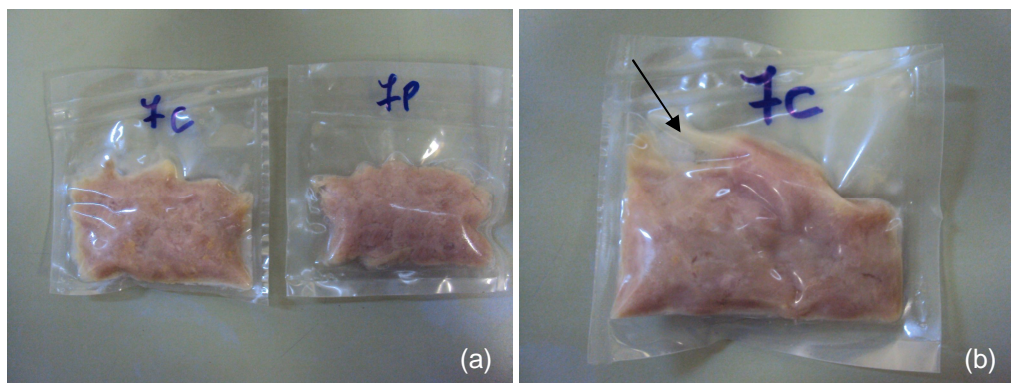
**Tabela 2.** Dias/tratamento, Média UFC/g e log N/No UFC/g do crescimento das bactérias ácido lácticas presentes no presunto de peru controle e pressurizado, ao longo da validade comercial quando armazenadas a 13°C, até atingir contagens de 10<sup>7</sup> UFC/g..

Dias/tratamento	Média UFC/g	log N/No UFC/g
1*c	1,43E+04 <sup>c</sup>	0,0000
7c	2,69E+05 <sup>c</sup>	2,0000
14c	2,95E+06 <sup>b</sup>	2,9638
21c	1,25E+07 <sup>a</sup>	3,6355
1**p	1,00E+01 <sup>d</sup>	0,0000
7p	2,74E+01 <sup>d</sup>	0,4378
14p	7,86E+01 <sup>d</sup>	0,8951
21p	1,66E+03 <sup>cd</sup>	2,2206
28p	3,84E+05 <sup>c</sup>	4,5846
35p	6,48E+06 <sup>b</sup>	5,8116
42p	1,79E+07 <sup>a</sup>	6,2516

Letras diferentes na coluna da média UFC/g diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ), teste de Tukey (n=40). \*c= tratamento controle e \*\*p=tratamento pressurizado de 400 MPa/15 minutos a 25°C.

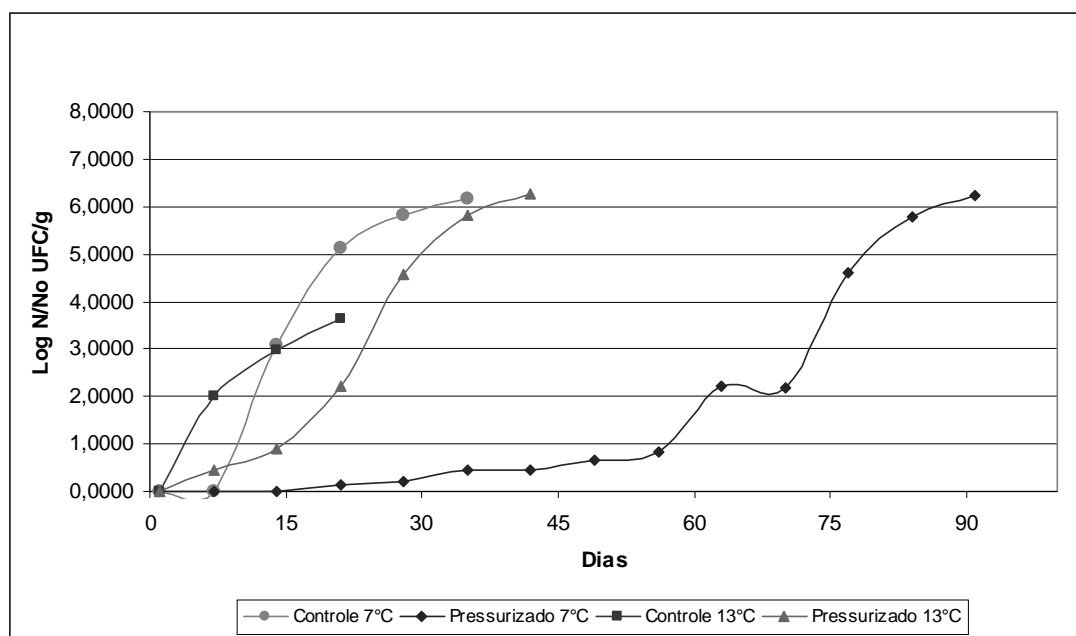
Na Figura 1 pode-se observar que o presunto controle (7,1 log<sub>10</sub> UFC/g), ao ser comparado com o pressurizado (1,4 log<sub>10</sub> UFC/g) aos 35 dias de armazenamento a 7°C, já apresentava limosidade, e a embalagem ao ser aberta para realização das análises mostrou um produto deteriorado, com odor desagradável, cor mais clara e textura mais amolecida, enquanto o presunto pressurizado encontrava-se em perfeitas condições.

Ao observar a Figura 2, ao se comparar a amostra controle armazenada a 13°C com a amostra armazenada a 7°C, podemos verificar que a temperatura é um fator determinante da fase lag ( $\lambda$ ) de crescimento microbiano, resultando menos extensa a 13°C e indicando que a adaptação foi melhor a essa temperatura.



**Figura 1.** (a) Características sensoriais das amostras de presunto de peru controle e pressurizada, (b) formação do limo na amostra controle aos 35 dias de armazenamento a 7°C. (Fonte: autora).

Foi verificado que a fase lag em 7°C para a amostra pressurizada foi muito longa, tendo duração média de 15 dias, indicando que a alta pressão aliada à temperatura reduzida causou uma injúria celular, dificultando a adaptação da BAL, retardando seu crescimento e aumentando a validade comercial.



**Figura 2.** Curvas de crescimento das bactérias ácido lácticas presentes nas amostras de presunto de peru controle e pressurizada nas temperaturas de 7 e 13°C, durante o armazenamento.

Em estudo realizado por Slongo (2008) com presunto cozido, ao usar pressão de 400 MPa em temperatura ambiente por 15 minutos e armazenamento de 8°C, foram obtidos resultados próximos àqueles encontrados no presente estudo, com amostra controle apresentando validade comercial de 35 dias e a pressurizada de 90 dias. A amostra de presunto de peru pressurizada a 13°C apresentou um crescimento semelhante ao controle a 7°C, diferenciando em uma semana, mostrando que mesmo em temperatura de abuso (13°C), a amostra pressurizada teve uma validade compatível com a amostra controle que estava armazenada em condições adequadas de refrigeração, mostrando desta forma a grande capacidade que a tecnologia de alta pressão possui

em retardar o crescimento microbiano, sendo esse fato confirmado pela validade comercial que a amostra pressurizada em 7°C alcançou, com duração média de 91 dias.

#### 4. CONCLUSÃO

A temperatura de armazenamento de produtos cárneos é um fator de extrema importância para a garantia da qualidade dos mesmos, pois oscilações na temperatura de transporte, armazenamento e preparo, favorecem o aumento da mesma, levando ao desenvolvimento das bactérias ácido lácticas e a rápida deterioração.

A alta pressão mostrou ser uma tecnologia que possui um grande potencial de aplicação comercial no processamento de presunto de peru, pois reduziu significativamente o crescimento de microrganismos deteriorantes, aumentando a validade e garantindo um produto em melhores condições microbiológicas, mesmo quando comparado com o produto controle em temperaturas menores, indicando um método bastante atrativo para a indústria de produtos cárneos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALASUBRAMANIAM, V.M.; FARKAS, D. High pressure of food processing. **Food Science and Technology**, v.14, n.5, p.413-418, 2008.

BORCH, E.; NERBTINK, E.; SVENSSON, P. Identification of major contamination sources during processing of emulsion sausage. **International Journal of Food Microbiology**, v.7, p.317-330, 1988.

CARPI, G.; SQUARCINA, N.; GOLA, S.; ROVERE, P.; PEDRIELLI, R.; BERGAMASCHI, M. Application of high pressure treatment to extend the refrigerated shelf-life of sliced cooked ham. **Industria Conserve**, v.74, p. 327-339, 1999.

DUNNE C.P. **Killing pathogens: high-pressure processing keeps food safe**. Disponível em: [http://www.military.com/soldiertech/0,14632,Soldiertech\\_Squeeze,00.html](http://www.military.com/soldiertech/0,14632,Soldiertech_Squeeze,00.html) Acesso: 25 de julho de 2010.

FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. (Ed) São Paulo: Atheneu. 2003, Cap.2, 13-23p.

GARRIGA, M.; AYMERICH, M.T.; COSTA, S.; MONFORT, J.M.; HUGAS, M. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. **Food Microbiology**, v.19, p.509-518, 2002.

GARRIGA, M., GREBOL, M.T., AYMERICH, J.M., MONFORT, J.M., HUGAS, M. Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.5, p.451-457, 2004.

HALL, P.A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R.S. **Acid Producing Microorganisms**. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4ed. Washington: American Public Health Association, 2001, v.19, p.201-207.

KENNEDY, J.; JACKSON, V.; BLAIR, I.S.; MCDOWELL, D.A.; COWAN, C.; BOLTON, D.J. Food safety knowledge of consumers and the microbiological and temperature status of their refrigerators. **Journal of Food Protection**, v.68, p.1421–1430, 2005.

KORKEALA, H.; ALANKO, T.; MAKEL, A.P.; LINDROTH, S. Shelf-life of vacuum-packed cooked ring sausages at different chill temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v.9, p.237–247, 1989.

LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; CARBALLO, J.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Microbial inactivation in meat products by pressure/ temperature processing. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1411-1415, 1999.

\_\_\_\_\_. Responses of *Pseudomonas fluorescens* to combined high pressure/ temperature treatments. **European Food Research Technology**, v.214, n.6, p.511-515, 2002

MATHIAS, S. P. **Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial do presunto de peru submetido à tecnologia de alta pressão hidrostática**. 2008, 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.

NYCHAS, G-J, E.; SKANDAMIS, P.N.; TASSOU, C.C.; KOUTSOUMANIS, K.P. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, v.78, p.77-89, 2008.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; GEORGIADOU, K.G.; METAXOPOULOS, J. Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p. 649-660, 1998.

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

SLONGO, A.P. **Determinação da Vida de Prateleira e Análise Sensorial de Presunto Suíno Submetido ao Tratamento de Alta Pressão Hidrostática**. 2008, 163f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, 2008.

SLONGO, A.P.; ROSENTHAL, A.; CAMARGO, L.M.Q.; DELIZA, R.; MATHIAS, S.P.; FALCÃO DE ARAGÃO, G.M. Modelling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. **LWT-Food Science Technology**, v.42, p.303-306, 2009.

TORRES, J.A.; VELAZQUEZ, G. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of food. **Journal of Food Engineering**, v.67, p.95-112, 2005.

WELLS, J.H.; SINGH, R.P. A quality-based inventory issue policy for perishable foods. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.12, p.271–292, 1989.

### **CAPÍTULO III.**

## **ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO DOS GÊNEROS PREDOMINANTES E AÇÃO DE BACTERIOCINAS PRODUZIDAS FRENTE À *SALMONELLA* ENTERITIDIS DO PRESUNTO DE PERU CONTROLE E SUBMETIDO A ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA**



# **Isolamento, Identificação dos Gêneros Predominantes e Ação de Bacteriocinas Produzidas Frente à *Salmonella* Enteritidis do Presunto de Peru Controle e Submetido à Alta Pressão Hidrostática**

**Simone Pereira Mathias, Amauri Rosenthal, Arlene Gaspar e Flávia Reis C. das Neves**

## **RESUMO**

O presente estudo teve como objetivo isolamento das BAL nos meios ágar MRS e M-17, identificação dos gêneros através das provas bioquímicas, de catalase e coloração de Gram e avaliação da produção de bacteriocinas através do teste de inibição direta, procedente da microbiota de amostras de presunto de peru processado convencionalmente (controle) e a amostra submetido à alta pressão hidrostática (APH) e foi usada com intuito de aumentar a validade do produto, através de processamento do presunto de peru a 400 MPa por 15 minutos a temperatura ambiente, com subsequente armazenamento a 7°C. Foi observado que os gêneros encontrados em ambos os produtos foram o *Enterococcus sp* e *Streptococcus sp*, e em relação à produção de bacteriocinas, a maior parte dos isolados de *Enterococcus sp* formou halo de inibição frente à *Salmonella* Enteritidis, enquanto no caso de *Streptococcus sp* somente a menor parte dos isolados resultou em tal inibição. Em ambos os casos, os isolados procedentes das amostras controle (91,6% de *Enterococcus sp* e 25,0% de *Streptococcus sp*), resultaram em maior proporção de formação de halo de inibição em comparação com as amostras pressurizadas. (70,8% dos isolados de *Enterococcus sp* e 8,3% de *Streptococcus sp*). A tecnologia de alta pressão hidrostática inibiu a formação do halo de inibição das bactérias ácido lácticas frente ao patógeno.

**Palavras-chave:** Bactérias ácido-lácticas, bacteriocinas, alta pressão hidrostática, presunto de peru.

---

Simone P. Mathias. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, DTA, Rodovia BR 465, Km7, Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: [spmathias@ufrj.br](mailto:spmathias@ufrj.br)

Amauri Rosenthal. Embrapa Labex Brazil-Europe, Laboratory of Food and Microbial Engineering (GPMA), University of Bourgogne and Agrosup Dijon, 21000 Dijon, France, +33(0)380774056

Arlene Gaspar. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, DTA, Rodovia BR 465, Km7, Seropédica, RJ, Brasil.

Flávia R. C. das Neves. Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas, 29501, Guaratiba, Rio de Janeiro, R.J, Brasil.

## ABSTRACT

The present study aimed at isolating LAB and evaluating their bacteriocine effect, either from isolates originated from conventionally processed turkey ham or processed by high hydrostatic pressure (HHP) and was used in intention to increase the validity of the product through processed of turkey ham at 400 MPa for 15 minutes at room temperature followed by storage at 10°C was used aimed at potentially increasing the validity of the product. LAB were isolated in MRS agar media and M-17 and their genera identified by biochemical and catalase tests and, Gram staining. It was observed that the LAB genera presented in both products were *Enterococcus sp* and *Streptococcus sp*. Regarding the bacteriocins production, most *Enterococcus sp* isolates formed the inhibition zone against the *Salmonella* Enteritidis, while only a minor part of the *Streptococcus sp* isolates originated positive inhibition responses. Inhibition effects were verified in higher proportion and in greater intensity from LAB isolates originated from conventional processed (91.6% of *Enterococcus sp* and 25.0% de *Streptococcus sp*), in comparison to pressurized turkey (70.8% of *Enterococcus sp* and 8.3% of *Streptococcus sp*). The technology of high hydrostatic pressure inhibited the formation of inhibition zone of lactic acid bacteria against the pathogen.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, bacteriocins, high hydrostatic pressure, turkey ham.

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido lácticas constituem um grupo de microorganismos amplamente distribuídos nos alimentos, produtoras de uma variedade de compostos antimicrobianos, incluindo: ácidos, diacetil, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, álcool, aldeído e bacteriocinas. Todos esses compostos podem antagonizar o crescimento de bactérias deterioradoras e patogênicas presentes nos alimentos (HUGAS, 1998; SCHILLINGER; LÜCKE, 1989), sendo que as bacteriocinas têm atraído grande interesse na indústria de alimentos, em decorrência ao seu uso potencial como conservante “natural” (CLEVELAND et al., 2001).

A microbiota é constituída por uma grupo heterogêneo de bactérias, com diferentes necessidades fisiológicas, que inclui espécies pertencentes a vários gêneros, entre os quais, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella* e *Lactobacillus* e possuem em comum as características de serem Gram positivas, catalase negativas, não esporuladas, anaeróbias facultativas, adaptadas a ambientes ricos em nutrientes e produzirem ácido láctico, como principal produto da fermentação dos glicídeos (AXELSSON, 1993).

Segundo Caplice e Fitzgerald (1999), bactérias produtoras de bacteriocinas são isoladas normalmente de alimentos que contém bactérias ácido lácticas, como produtos cárneos e lácteos. Já Shillinger e Lücke (1989) consideram que as bactérias lácticas, originalmente isoladas de carnes e produtos cárneos, são os microrganismos mais indicados para serem utilizados na intensificação da segurança microbiológica destes alimentos. Segundo esses autores, essas bactérias são adaptadas às condições das carnes e produtos cárneos e devem, desta forma, ser mais competitivas comparadamente às bactérias lácticas provenientes de outras fontes. Ainda segundo Shahidi (1991); Stiles e Hastings (1991); Yousef et al. (1991), as bactérias ácido lácticas com essas características de crescimento são susceptíveis a ter um valor muito maior como conservantes de carnes e seus derivados.

A atividade antimicrobiana das bacteriocinas está estritamente ligada a ação nas bactérias Gram positivas, por isso o custo benefício na biopreservação de alimentos que possuam

microbiota Gram negativa, torna-se um possível impedimento quando o interesse é o uso de bacteriocinas (LEISTNER; GORRIS, 1995).

As bacteriocinas podem atuar sinergicamente com os sistemas tradicionais de conservação de alimentos ou aquelas novas tecnologias de conservação que venham a induzir uma injúria subletal. Esse é o caso da alta pressão hidrostática (APH), que consiste em uma tecnologia emergente que apresenta como vantagem a redução da carga microbiana, mantendo as características sensoriais adequadas (RASTORGI et al., 2007).

De acordo com Kalshayanand et al. (1994); Ter Steeg et al. (1999), a APH aumenta a eficiência antimicrobiana das bacteriocinas devido a maior permeabilização da membrana externa em bactérias Gram negativas que sofrem o tratamento. Em produtos alimentícios ainda é limitado o número de estudos que envolvem a combinação do efeito da APH e bacteriocinas (AYMERICH et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2005).

O presente estudo teve como objetivo isolar, identificar os gêneros de bactérias ácido lácticas e avaliar a formação do halo de inibição frente à *Salmonella* Enteritidis inoculada em amostras de presunto de peru controle e pressurizada.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Processamento do presunto de peru

O trabalho experimental foi desenvolvido nas plantas piloto e laboratórios da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Foram usadas coxas de peru congeladas, embaladas em sacos plásticos contendo aproximadamente 1,2 kg por embalagem, adquiridas de uma empresa sediada no Sul do Brasil e que possui distribuição no Rio de Janeiro. Para fabricação do presunto de peru, foi inicialmente realizado a “toalete” na coxa de peru congelada, com facas do tipo desossa, retirando-se tendões, nervos, pele e ossos, e cortando-se a carne em pedaços menores. Para a formulação, foram utilizados aditivos e condimentos, adquiridos da empresa Duas Rodas Industrial®, a qual possui certificação ISO 9001/2000 e ISO 14001 para fabricação de todos os seus produtos. Os componentes da salmoura foram pesados e diluídos em água gelada, sob agitação constante para completa dissolução, até que fosse adicionada à carne. Em seguida, a carne foi misturada à salmoura, levando-a ao “cutter” (*Geiger* e modelo UM12), intercalando-se a operação com 2 a 3 intervalos de alguns segundos, com intuito de reduzir a carne a pedaços menores até a obtenção de uma massa mais homogênea. Depois, foi transferida para um recipiente plástico com tampa e levada para câmara frigorífica a 7°C, permanecendo por 24 horas.

Após este período, a massa obtida, acondicionada em porção de em média 2,5 kg cada, foi colocada em embalagem plástica resistente a altas temperaturas (*cook-in*), fechada com seladora a vácuo (*Engevac* e modelo 30 gás) e posteriormente colocada em formas de aço inoxidável para o cozimento. O cozimento foi realizado em autoclave até que a temperatura interna do produto atingisse 72°C, cuja verificação foi feita com controlador interno de temperatura (modelo *ELLAB*) em umas das peças controle. Após o cozimento, o produto foi resfriado em banho de gelo por 40 minutos e, posteriormente, armazenado em BOD a 4°C durante 24 horas.

### 2.2. Preparo da amostra

Foi utilizada 01 peça de presunto de peru de 2,5 kg, e a mesma foi manuseada em condições de assepsia adequadas, com uso de utensílios e equipamentos previamente

higienizados. Foram separadas amostras controle e para pressurização, com 10 g cada, divididas em sacos estéreis (*Nasco WHIL-PACK®*) embaladas a vácuo, e posteriormente armazenadas em câmara frigorífica a 7°C, durante o período abrangendo a validade do produto.

### **2.3. Tratamento a alta pressão hidrostática**

Foi realizado processamento a pressão de 400 MPa por 15 minutos em temperatura ambiente, baseando-se no resultado de estudo realizado por Slongo (2008), relativo ao acompanhamento da validade comercial do presunto suíno submetido ao tratamento por alta pressão. Com base nesse estudo, foi concluído que nas condições acima citadas houve aumento significativo da validade comercial do presunto suíno e preservação das propriedades sensoriais sendo, por esse motivo, essas mesmas condições de processo adotadas no presente trabalho.

O equipamento de alta pressão hidrostática (*Stansted Fluid Power* e modelo S-FL-850-9-W) utilizado é um modelo laboratorial e possui capacidade para operar em uma faixa de pressão de 100 a 900 MPa, em temperaturas variando de 0 a 80°C, e intervalos de tempos variados.

As amostras de presunto de peru previamente trituradas e embaladas a vácuo foram colocadas dentro do suporte de adição de amostras, em forma de cilindro, de aço inoxidável e com aproximadamente 7,0 cm de diâmetro e 20,0 cm de comprimento, com vários orifícios por onde circula o líquido pressurizador, neste caso álcool 70%. A câmara contendo o suporte de amostras foi hermeticamente fechada e vedada para evitar vazamentos. As condições de processo foram controladas através de um painel para o ajuste da pressão, tempo e temperatura desejados, de acordo com o planejamento experimental. O tempo de processo foi contado a partir do momento em que a câmara alcançou a pressão desejada, até o início da despressurização. Ao término do ciclo, após a despressurização, a câmara foi aberta e as amostras pressurizadas foram retiradas do cilindro e enviadas para as respectivas análises.

### **2.4. Análise microbiológica - Isolamento das BAL**

As análises para isolamento e avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas (BAL), foram realizadas no laboratório de microbiologia, seguindo a metodologia preconizada por Hall et al. (2001).

Para essa análise foi realizada uma alteração em relação à quantidade estipulada de amostra, contudo mantendo-se a proporção da diluição (0,1) proposta na metodologia (25 g amostra: 225 mL de água peptonada a 0,1%), esse procedimento foi realizado após alguns testes iniciais e demonstrou que melhora a homogeneidade e alcança um universo de amostras mais representativo, por se tratar de um alimento sólido e de difícil homogeneidade. Para isso, de cada peça de presunto de peru controle (não pressurizado) e pressurizado, retirou-se, de forma asséptica, em câmara de fluxo laminar (marca Veco, modelo VLFS-12) 10 g de amostra que foram colocados em sacos estéreis com tarja de separação (*Nasco WHIL-PACK®*) e acrescidos de 90 mL de água peptonada a 0,1%. Homogeneizou-se a amostra por 2 minutos em *stomacher* (marca Nova Ética) realizando-se, na seqüência, diluições decimais seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  em tubos de 9 mL de água peptonada a 0,1%, homogeneizados em agitador tipo vórtex, sendo posteriormente feito plaqueamento pour-plate e sobrecamada em ágar de Man, Rogosa, Sharp-MRS (Oxoid) e ágar M-17 (Fluka Analytical), seguido de incubação em BOD a 30°C de 3 a 5 dias. As análises foram realizadas em duplicata e, após o crescimento no meio de isolamento, as colônias com características bem definidas foram selecionadas e repicadas para os meios usados

na identificação posterior do gênero e prova de catalase, além da confecção do esfregaço para a coloração de Gram.

## 2.5. Coloração de Gram

Para identificação da morfologia celular, utilizou-se a coloração de Gram, lâminas em duplicata, baseada na metodologia de Vanderzant e Splittstoesser (1992). Para isto, a colônia desejada foi transferida para uma lâmina previamente seca e feito um esfregaço após o qual, depois de deixado secar, realizou-se a fixação, passando a lâmina um pouco acima da chama. Feito este procedimento, deu-se início a coloração que incluiu a cobertura do esfregaço com cristal violeta por 1 minuto, seguido de lavagem em água corrente, cobertura com lugol (iodo e iodeto de potássio) por mais um minuto, descorou-se em seguida com álcool 95%, lavou-se com água corrente, contra corou-se com safranina, lavou-se novamente em água corrente e secou-se, sendo por fim realizada a observação em microscópio óptico em objetiva de imersão (aumento de 100x).

## 2.6. Prova de Catalase

Para identificação da produção de catalase, foi usada a metodologia preconizada Vanderzant e Splittstoesser (1992). Foram selecionadas as colônias características e repicadas para tubos contendo 5 mL de agar BHI, as mesmas incubadas a 35°C por 24 horas e, após este período, utilizou-se peróxido de hidrogênio (Laborclin) a 3% (3 a 5 gotas) e observou-se o tubo para avaliar se ocorreu o borbulhamento imediato (teste positivo) ou não (teste negativo). As amostras foram feitas em triplicata, totalizando 108 amostras, correspondente às amostras por tipo de colônia encontrada, levando-se em consideração o meio de crescimento (ágares MRS e ou M-17).

## 2.7. Métodos bioquímicos para identificação dos gêneros de BAL

Como as colônias encontradas e identificadas pela coloração de Gram foram classificadas apenas como cocos, e comprovadas como catalase negativa, procedeu-se então a diferenciação dos gêneros de acordo com a metodologia usada por Harrigan (1998). A diferenciação de gênero para as BAL, com a morfologia de cocos (*Lactococcus sp*, *Leuconostoc sp*, *Streptococcus sp* e *Enterococcus sp*) pode ser efetuada com base nos testes de crescimento dos isolados nas seguintes condições: temperaturas de 10 e 45°C, pH de 4,4; e 9,6, teor de NaCl 6,5% e produção de CO<sub>2</sub> a partir da glucose, conforme a Tabela 1.

**Tabela 1.** Identificação do crescimento das BAL em relação à temperatura, concentração salina, pH e produção de CO<sub>2</sub> a partir da glucose.

Testes	Enterococcus	Lactococcus	Streptococcus	Leuconostoc
10°C	+	+	-	+
45°C	+	-	+	-
6,5% NaCl	+	-	-	-
pH 9,6	+	-	-	-
pH 4,4	+	-	-	-
Produção CO <sub>2</sub> a partir da glucose	-	-	-	+

Fonte: Harrigan (1998).

Foi utilizado para o teste de crescimento temperatura de 10°C para os tubos incubados por 10 dias, e 45°C para os tubos incubados por 48 horas, com conteúdo em cada tubo de 5mL de leite desnatado reconstituído (LDR) a 10%. Os testes de crescimento em diferentes pH's e presença de 6,5% de NaCl foram conduzidos em tubos contendo 5mL de Caldo APT (MicroMed) incubados a 35°C por 48 horas. Para produção de gás CO<sub>2</sub> foram usados tubos contendo 5 mL de Caldo MRS (Merck) suplementado com 5% de glucose e utilizando um tubo de Durham invertido e incubado em BOD a 35°C por 48 horas.

## 2.8. Teste de inibição direta

A *Salmonella* Enteritidis ATCC 13706 foi utilizada no teste de inibição direta, para avaliar-se a capacidade de produção de bacteriocina pelas BAL isoladas do presunto de peru controle e pressurizado, com intuito de avaliar se houve diferença entre as atividades microbianas. Para isto, inicialmente foi retirada uma alçada da cultura da *Salmonella* Enteritidis refrigerada e mantida em ágar TSA (Difco) e utilizada a metodologia adaptada de Santos (1993), em que foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo infusão cérebro e coração (BHI) e incubados em BOD a 35°C por 12 horas. No dia seguinte, antes do início da inoculação, foram preparadas as placas de ágar MRS e M-17. Foi inicialmente vertido na placa o meio no qual, após deixado solidificar, realizou-se com auxílio da alça de platina pequenos orifícios para receber as colônias. Posteriormente, o meio adicionado das colônias selecionadas foi deixado em repouso em BOD a 35°C por 2 horas, até que as colônias estivessem incorporadas ao meio e prontas para receber o meio BHI. A partir dos tubos com os cultivos iniciadores do microrganismo indicador, foram pipetados 100 µL e transferidos para um tubo com 5 mL de caldo BHI. Posteriormente pipetou-se 1 mL que foi transferido para outro tubo, também com 5 mL do mesmo caldo. Em seguida, 750 µL do volume desse último tubo foram pipetados e transferidos para um tubo com 10 mL de BHI Agar (Oxoid) a 0,87%, que foi confeccionado com Caldo BHI acrescido de Ágar-Ágar (Merck) na proporção de 100 mL de Caldo BHI para 0,87 g pré-preparado e mantido liquefeito em banho-maria a aproximadamente 37°C. Seu conteúdo foi vertido sobre a placa preparada com as BAL, feito movimentos em forma de oito, deixado solidificar e incubadas em BOD a 35°C por 24 horas e após este período as mesmas foram analisadas para verificação da formação ou não do halo de inibição.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 108 colônias isoladas, 36 colônias (33,3%) são referentes às bactérias isoladas das amostras pressurizadas, onde houve crescimento da colônia curva em ágar MRS e M-17 e colônia puntiforme em ágar M-17, nessa condição não houve crescimento de bactérias com forma achatada, redonda e redonda pequena em nenhum dos meios, provavelmente a pressão interferiu na adaptação e crescimento das mesmas.

Já as 72 colônias restantes (66,6%) foram isoladas das amostras controle, sendo que as formas achatada, redonda e redonda pequena não apresentaram crescimento em ágar M-17, somente em ágar MRS, a forma curva apresentou crescimento nos dois meios e a forma puntiforme apresentou crescimento no ágar M-17 (Tabela 2).

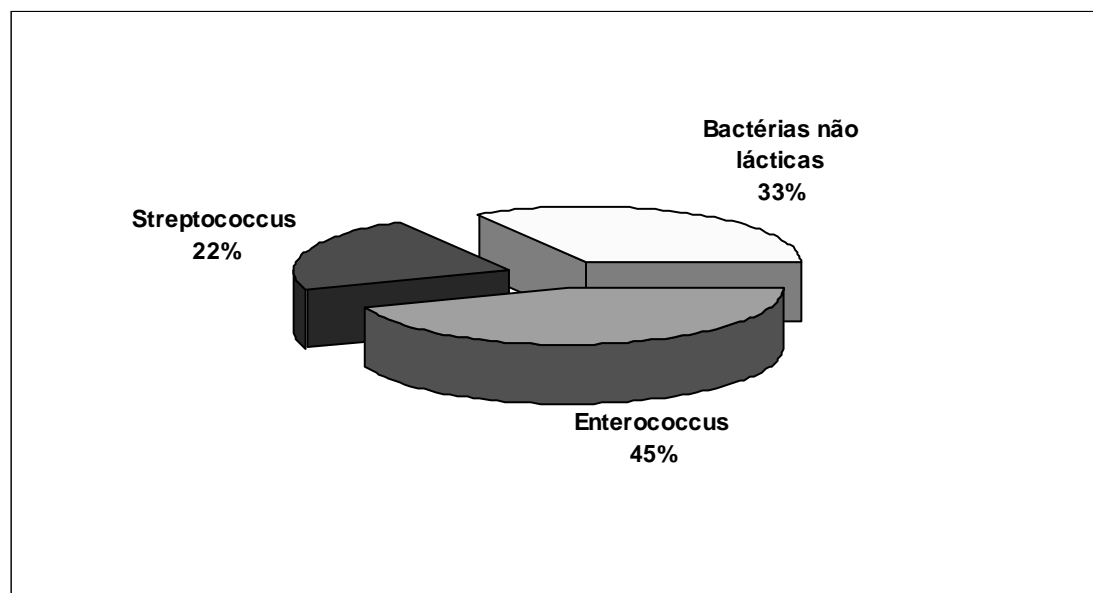
**Tabela 2.** Formas bacterianas isoladas das amostras de presunto de peru nos meios MRS e M-17, coloração de Gram e prova de catalase negativa para comprovação de BAL.

<b>Formas bacterianas isoladas</b>	<b>Cresc. MRS</b>	<b>Cresc. M-17</b>	<b>Gram +</b>	<b>Catalase -</b>
Curva (gota)	+	+	+	+
Achatada	+	-	-	-
Redonda	+	-	+	-
Redonda pequena	+	-	-	-
Puntiforme	-	+	+	+

Das 108 colônias isoladas, 77,7% foram Gram positiva e 66,6% catalase negativa. Tomando-se como base os testes de identificação das BAL, foram descartadas as colônias que não foram diagnosticadas como Gram positiva e catalase negativa, restando 72 colônias de BAL confirmadas, que foram então submetidas aos testes de identificação do gênero, segundo a metodologia de Harrigan (1998).

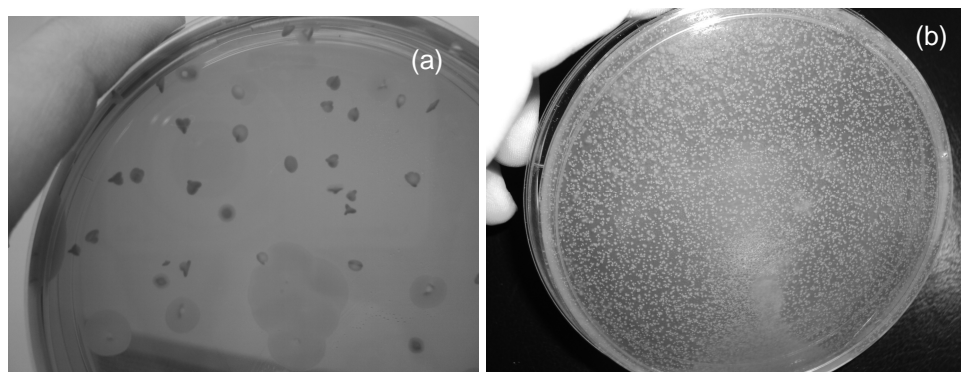
Das 72 colônias de BAL, 48 (66,6 %) colônias foram classificadas como pertencentes ao gênero *Enterococcus sp*, essa classificação teve como critério o fato de serem cocos Gram positivos, não esporulados, catalase negativos, homofermentativos, com capacidade de crescimento em 10 e 45°C e a 6,5% de NaCl, crescerem em pH 4,4 e 9,6.

As 24 colônias restantes foram identificadas através das provas bioquímicas como *Streptococcus sp*, coco Gram positivo, catalase negativo, homofermentativos, com capacidade de crescimento em 45°C, mas não crescem em 10°C, presença de 6,5% NaCl, pH 4,4 e 9,6 (HARRIGAN, 1998; AXELSSON, 1993; HOLT et al., 1994). Em uma visão geral, podemos afirmar que das 108 colônias isoladas inicialmente, 33,3% não são ácido lácticas e as demais são BAL, como mostra a Figura 1.



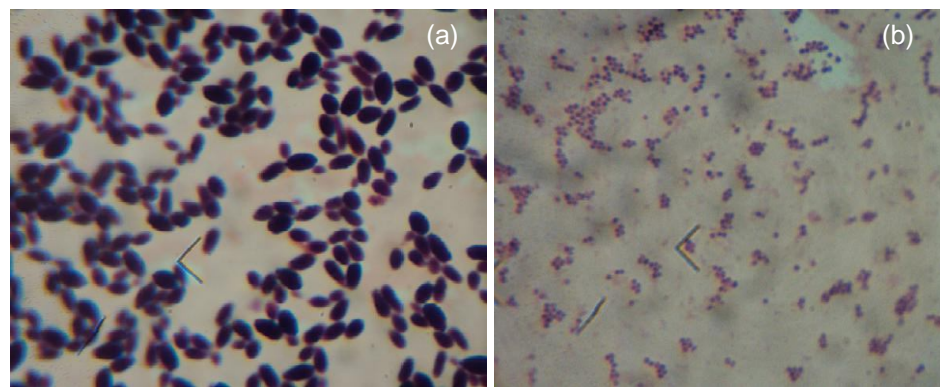
**Figura 1.** Representação da porcentagem de bactérias ácido lácticas e não lácticas presentes nas amostras de presunto de peru.

Na Figura 2 estão representadas as formas correspondentes aos microrganismos isolados, que são bactérias ácido lácticas, a letra (a) é correspondente a forma arredondada e maior, aparência curva, parecida com uma gota, são características das colônias do gênero *Enterococcus sp*, com crescimento em meio ágar MRS e M-17 e a letra (b) representa as colônias de *Streptococcus sp*, com crescimento em meio ágar M-17, são bem pequenas e puntiformes, de difícil visualização, por isso a placa em questão é relativa a uma diluição menor ( $10^{-1}$ ) UFC/g, Com intuito de mostrar melhor o crescimento, nessa mesma placa existe ainda o crescimento de *Enterococcus sp*, com colônias pequenas, devido à diluição menor. De acordo com Potes e Marinho (2007), devido às suas diversas exigências nutricionais, para detectar, isolar e identificar os diversos gêneros que constituem esse grupo microbiano, tem-se utilizado vários meios de cultura que, geralmente, são ricos em nutrientes e possibilitam o crescimento de outros microrganismos, que não as bactérias ácido lácticas. E além disso, muitas das vezes os inibidores usados nos meios para os outros microrganismos, acabam por impedir o crescimento de algumas BAL, tornando dessa forma difícil avaliar seu crescimento. Ainda de acordo com Doming et al. (2003), não existe um método único que satisfaça completamente todos os requisitos necessários para o isolamento, caracterização e identificação dessas bactérias.



**Figura 2.** (a) colônia em forma de gota (*Enterococcus sp*) meio ágar MRS e (b) colônias puntiformes e pequenas em meio ágar M-17 (*Streptococcus sp*). (Fonte: autora).

A Figura 3 mostra as formas das bactérias ácido lácticas isoladas após a confirmação da prova de catalase negativa e coloração de Gram positiva. Pode-se observar que a morfologia para *Enterococcus sp* (a) são cocos ovalados e para *Streptococcus sp* são cocos agrupados (b).

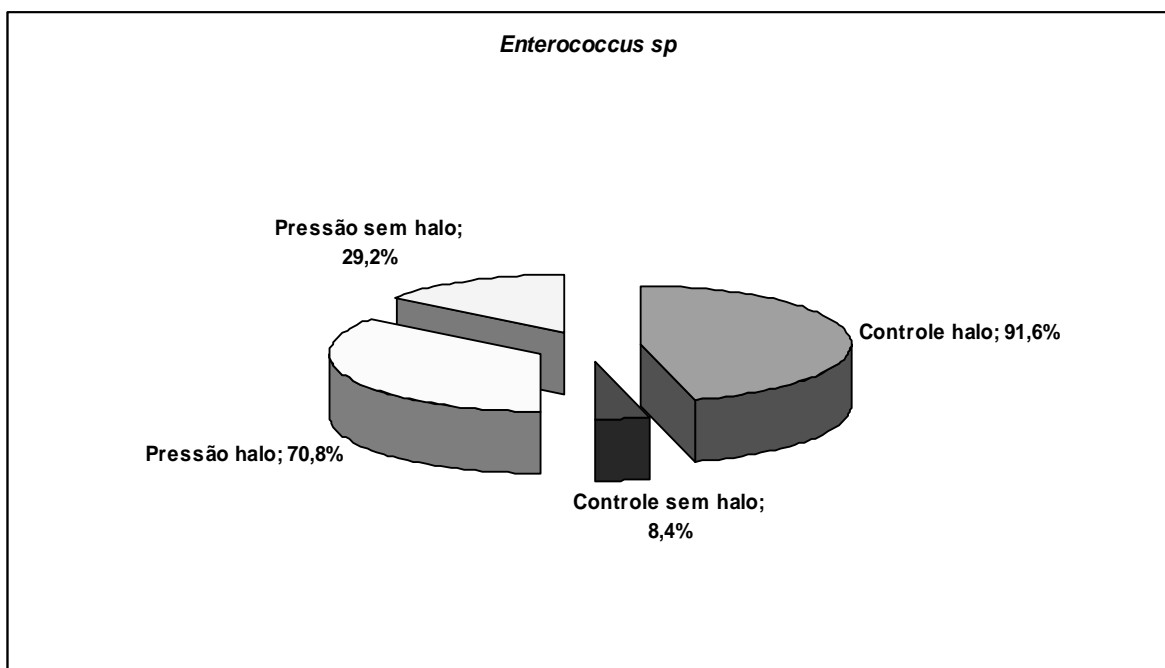


**Figura 3.** Morfologia de *Enterococcus sp* (a) e *Streptococcus sp* (b), identificadas em objetiva de imersão. (Fonte: autora).



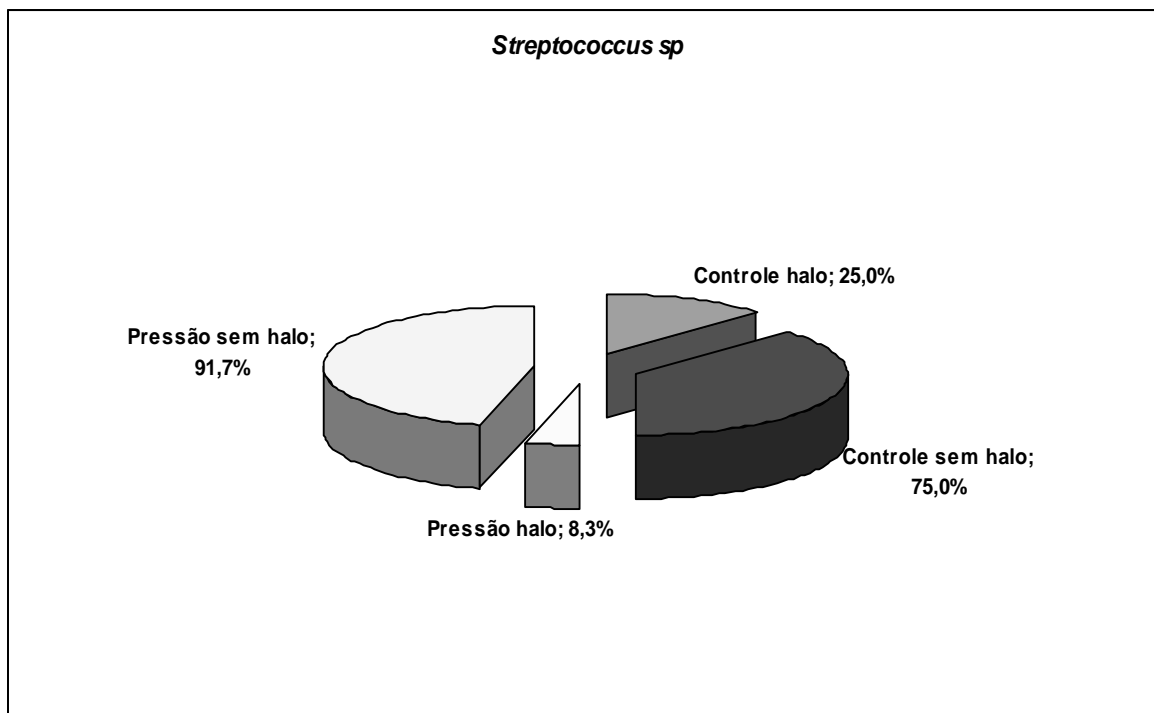
O gênero *Enterococcus sp* foi isolado a partir dos meios de cultura utilizados, o ágar MRS e M-17 e apresentou crescimento abundante em todas as amostras, os meios não foram seletivos no seu desenvolvimento, propiciando o desenvolvimento, assim como constatado em estudos realizados por Poulet et al. (1993); Tornadijo et al. (1995); López-Dias et al. (2000). Já para *Streptococcus sp*, o ágar MRS foi seletivo, pois apresenta alguns componentes que inibem seu crescimento e teve bom crescimento em ágar M-17.

Dos gêneros isolados e submetidos aos testes de inibição frente à *Salmonella* Enteritidis, pode-se observar que das 48 colônias de *Enterococcus sp*, 24 colônias foram obtidas das amostras de presunto de peru controle e apresentaram 91,6% de formação do halo de inibição e das 24 colônias obtidas das amostras de presunto de peru pressurizadas, o halo de inibição foi de 70,8%, além disso, os halos formados nessa condição foram menores quando comparados aos halos formados nas amostras controle (Figura 4).



**Figura 4.** Representação da porcentagem das 48 colônias de *Enterococcus sp* formadoras ou não do halo de inibição frente à *Salmonella* Enteritidis.

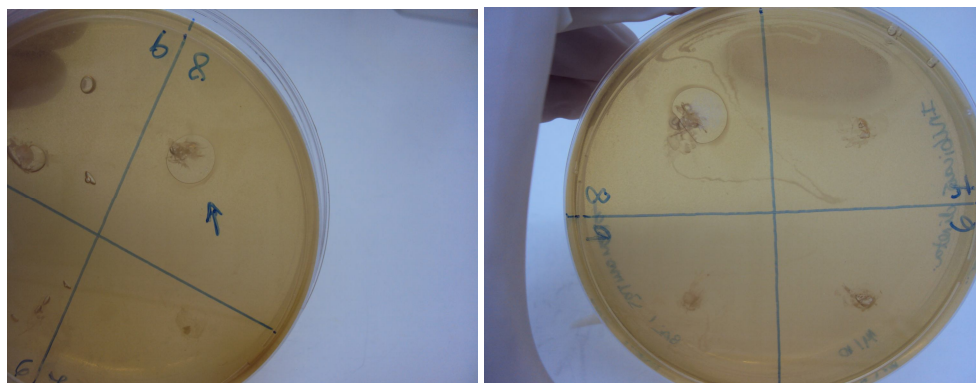
Já para as 24 colônias obtidas das colônias de *Streptococcus sp*, 12 colônias foram obtidas das amostras de presunto de peru controle e somente 25,0% formaram o halo de inibição e para as 12 colônias obtidas das amostras de presunto de peru pressurizadas a formação do halo foi de 8,3%, em ambas as situações, os halos formados foram pequenos. Pode-se concluir que o *Streptococcus sp*, não possuiu um bom desenvolvimento e não conseguiu uma boa condição para a produção dessas substâncias (Figura 5).



**Figura 5.** Representação da porcentagem das 24 colônias de *Streptococcus sp* formadoras ou não do halo de inibição frente à *Salmonella* Enteritidis.

Vários fatores influenciam a produção de bacteriocina pelas bactérias ácido lácticas, como o meio de cultura, a quantidade de nutriente disponível, a temperatura de armazenamento, o microrganismo alvo e a própria cepa de BAL isolada.

Na Figura 5 estão alguns dos exemplos de halos de inibição, característicos da produção de bacteriocina formados pelas BAL frente à *Salmonella* Enteritidis. Considerando-se o armazenamento refrigerado, pode-se prever que talvez a produção do composto inibitório para o crescimento de *Salmonella* não tenha alcançado o seu ponto máximo.



**Figura 6.** Formação do halo de inibição de *Enterococcus sp* em ágar MRS, frente à *Salmonella* Enteritidis. (Fonte: autora).

Em estudos realizados por Bromberg et al. (2006) verificando a produção de bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis sub. ordinae* CTC 484 em carne bovina inoculada com *Listeria monocytogenes*, avaliou-se que o efeito combinado de temperatura e pH ótimos para produção da

bacteriocina podem ser diferentes daqueles necessários para a estabilidade da mesma, conforme observado no estudo, no qual a bacteriocina CTC 484 apresentou maior estabilidade em faixa de pH mais elevado a 4°C e a 25°C que a 37°C. De acordo com Mataragas et al. (2003), o controle das condições ambientais parece desempenhar uma importante função na produção de bacteriocina. Resultados de seus estudos com as bacteriocinas produzidas por *Leuconostoc mesenteroides* L124 e *Lactobacillus curvatus* L442 mostraram que a produção destas bacteriocinas foi afetada pela manipulação dos valores de pH e da temperatura. As condições ótimas de produção das bacteriocinas não coincidiram com as do crescimento bacteriano. Os valores de pH e temperatura para o crescimento foram de 6 a 6,5 a 30°C e, para a produção de bacteriocina, pH 5,5 a 25°C.

Os resultados obtidos com a produção do halo inibitório nas amostras pressurizadas mostraram que, nessa condição, a produção do halo inibitório foi menor quando comparado ao controle, possivelmente pela ação da pressão exercida nas estruturas das células bacterianas, com alterações no metabolismo celular e alterando a produção de compostos.

Segundo Leroy e Vuyst (1999a, 1999b), a produção de bacteriocina por bactérias lácticas é um processo associado ao crescimento do microorganismo e, como consequência, as condições ambientais que estimulam o crescimento celular frequentemente permitem uma produção satisfatória de bacteriocina.

#### 4. CONCLUSÃO

Os gêneros de bactérias ácido lácticas encontrados no presunto de peru foram o *Enterococcus sp* e *Streptococcus sp*, possivelmente oriundos da contaminação das etapas envolvidas com corte, fatiamento, manuseio do produto nas etapas de processamento. Mesmo se tratando da microbiota deteriorante, foi importante isolar e identificar quais as BAL que, fazem parte da microbiota do presunto de peru e avaliar se podem induzir a competição e inibição de patógenos, como a *Salmonella* avaliada. A produção do halo de inibição foi constatada na maioria dos testes realizados com o *Enterococcus sp*, principalmente em amostras controle. Estudos futuros precisam ser realizados para uma melhor compreensão da ação desses compostos em microrganismos patogênicos e avaliar de que forma a pressão alterou a produção desse composto.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYMERICH, M.T.; JOFRÉ, A.; GARRIGA, M.; HUGAS, M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. **Journal of Food Protection**, v.68, p.173–177, 2005.

AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S., WRIGHT, A., (Ed.). **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 1993, cap.1, 63p.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DEBLON, R.; CINTRA, H. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.135-144, 2006.

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

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.1-20, 2001.

DOMIG, K.J.; MAYER, H.K.; KNEIFEL, W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 1 – Media for isolation and enumeration. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.147-164, 2003.

HALL, P.A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R. Acid-Producing Microorganisms. In: DONNES, F.P. ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4ed. Washington: APHA, 2001, cap.16, 201-206p.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3ed. San Diego: Academic Press, 1998.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. **Gram positive cocci**. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. HOLT, J.C.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H et al. 9ed, Williams & Wilkins: Baltimore, 1994, 527p.

HUGAS, M. Bacteriogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v.49, p.S139-S150, 1998.

KALCHAYANAND, N.; SIKES, T.; DUNNE, C.P.; RAY, B. Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.4174-4177, 1994.

LEISTNER, L.; GORRIS, L.G.M. Food preservation by hurdle technology. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, p.2-46, 1995.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin k. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.3, p.974-981, 1999a.

LEROY, F.; DE VUYST, L. The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC494, a potential starter culture for sausage fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n.12, p.5350-5356, 1999b.

LÓPEZ-DÍAZ, T.M.; ALONSO, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L.; MORENO, B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, v.17, p.23-32, 2000.

MATARAGAS, M.; METAXOPOULOS, J.; GALIOTOU, M.; DROSINOS, E.H. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **Meat Science**, v. 64, p. 265-271, 2003.

POTES, M.E.; MARINHO, A.A. Utilização de diferentes meios de cultura na identificação e recuperação de bactérias lácticas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, p.145-151, 2007.

POULLET, B.; HUERTAS, M.; SÁNCHEZ, A.; CÁCERES, P.; LARRIBA, G. Main lactic acid bacteria isolated during ripening of César de Cáceres cheese. **Journal of Dairy Research**, v.60, p.123-127, 1993.

RASTOGI, N.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S.; BALASUBRAMANIAM, V.M.; NIRANJAN, K.; KNORR, D. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.47, p.69-112, 2007.

RODRÍGUEZ, E.; ARQUES, J.L.; NUNEZ, M.; GAYA, P.; MEDINA, M. Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in raw-milk cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.3399-3404, 2005.

SANTOS, W.L.M. **Aislamento y caracterización de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen carnica.** 1993, 244p. Tese Doutor em Veterinária Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Madrid.1993.

SHAHIDI, F. Developing alternative meat-curing systems. **Trends Food Science and Technology**, v.2, p.219-222, 1991.

SHILLINGER, U.; LÜCKE, F.K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1.901-1.906, 1989.

STILES, M.E.; HASTINGS, J.W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: Potential for use in meat preservation. **Trends Food Science and Technology**, v.2, p.247-251, 1991.

TER STEEG, P.F.; HELLEMONS, J.C.; KOK, A.E. Synergistic actions of nisin, sublethal ultrahigh pressure, and reduced temperature on bacteria and yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.4148-4154, 1999.

TORNADIJO, M.E.; FRESNO, J.M.; BERNARDO, A.; MARTÍN SARMIENTO, R.; CARBALLO, J. Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). **Lait**, v.75, p.551-570, 1995.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination in Foods.** 3rd. Washington DC: APHA – American Public Health Association, 1992.

YOUSEF, A.E.; LUCHANSKY, J.B.; DEGNAN, A.J.; DOYLE, M.P. Behavior of *Listeria monocytogenes* in wiener exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or *Pediocin* Ach during storage at 4 or 25°C. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n.5, p.1461-1467, 1991.

## **CAPÍTULO IV.**

### **USO DE CICLOS CONTÍNUO OU MÚLTIPLOS DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA INATIVAÇÃO DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS EM PRESUNTO DE PERU**

## Uso de Ciclos Contínuo ou Múltiplos de Alta Pressão Hidrostática na Inativação de *Salmonella* Enteritidis em Presunto de Peru

Simone Pereira Mathias, Amauri Rosenthal, Arlene Gaspar, Celina Mara Soares e Flávia Reis C. das Neves

### RESUMO

No presente estudo, foi avaliado o efeito do ciclo contínuo (15 minutos) e múltiplo (2 ciclos de 7,5 minutos, 3 ciclos de 5 minutos e 5 ciclos de 3 minutos) com pressões de 300 e 400 MPa a temperatura de 25°C sobre a sobrevivência da cepa de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13706 inoculada em presunto de peru embalado a vácuo. Foi utilizada a concentração inicial de 6,8 log<sub>10</sub> UFC/mL e após 24 horas sob refrigeração observou-se que houve redução decimal das contagens em ágar tripticase de soja (TSA) de 1,5 log<sub>10</sub> UFC/g para as amostras controle. A aplicação de pressão de 300 MPa em ciclo contínuo de 15 minutos propiciou a redução de 2,8 log<sub>10</sub> UFC/g, enquanto que tratamentos a mesma pressão com 2 ciclos de 7,5 minutos, 3 ciclos de 5 minutos e 5 ciclos de 3 minutos resultaram em reduções de 2,9 log<sub>10</sub>, 2,9 log<sub>10</sub> e 3,2 log<sub>10</sub> UFC/g, respectivamente. Já tratamentos a 400 MPa em ciclo contínuo ou múltiplos ocasionou a completa inativação microbiana. A utilização dos tratamentos com ciclo múltiplo mostrou-se mais efetiva na redução e inativação quando comparada com o ciclo contínuo em 300 MPa e a pressão de 400 MPa foi a mais efetiva para a inativação completa do microrganismo.

**Palavras-chave:** Alta pressão hidrostática, ciclos contínuos ou múltiplos, inativação, *Salmonella* Enteritidis, presunto de peru.

---

Simone P. Mathias. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, DTA, Rodovia BR 465, Km7, Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: [spmathias@ufrj.br](mailto:spmathias@ufrj.br)

A. Rosenthal. Embrapa Labex Brazil-Europe, Laboratory of Food and Microbial Engineering (GPMA), University of Bourgogne and Agrosup Dijon, 21000 Dijon, France, +33(0)380774056

Arlene Gaspar. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, DTA, Rodovia BR 465, Km7, Seropédica, RJ, Brasil.

Celina Mara Soares. Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas, 29501, Guaratiba, Rio de Janeiro, R.J, Brasil.

Flávia R.C. das Neves. Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas, 29501, Guaratiba, Rio de Janeiro, R.J, Brasil.

## ABSTRACT

In this study, we evaluated the effect of the continuous cycle (15 minutes) and multiple cycles (2 cycles of 7.5 minutes; 3 cycles of 5 minutes and 5 cycles of 3 minutes) at pressures of 300 and 400 MPa at 25°C on the survival of the strain of *Salmonella* Enteritidis ATCC 13706 inoculated in vacuum-packed turkey ham. The initial *Salmonella* population was set as 6.8 log<sub>10</sub> CFU/mL and after 24 hours under refrigeration was observed with the reduction of decimal counts in tryptic soy agar (TSA) of 1.5 CFU/g in control samples. For continuous pressure at 300 MPa for 15 minutes the microbial population reduction was 2.8 log<sub>10</sub> CFU/g, while at the same pressure by using 2 cycles of 7.5 minutes, 3 cycles of 5 minutes and 5 cycles of 3 minutes, the reductions were 2.9 log<sub>10</sub>, 2.9 log<sub>10</sub> and 3.2 log<sub>10</sub> CFU/g, respectively. As for the pressures of 400 MPa for both the continuous and multiple cycles the microbial load was completely inactivated, allowing a reduction of 5.3 log<sub>10</sub> CFU/g. The use of multiple cycle treatments proved more effective in the reduction and inactivation when compared with the continuous cycle of 300 and 400 MPa pressure was more effective for complete inactivation of the microorganism.

**Keywords:** High hydrostatic pressure, continuous or multiple cycles, inactivation, *Salmonella* Enteritidis, turkey ham.

## 1. INTRODUÇÃO

Produtos alimentícios, que tenham sido submetidos a tratamentos térmicos adequados durante o processamento, geralmente são livres de patógenos. No entanto, estudos relacionados com surtos alimentares em produtos prontos para o consumo têm demonstrado que a presença de *Salmonella* sp nos produtos consumidos é oriunda da recontaminação após processamento (REJI ;DEN AANTREKKER, 2004).

Bactérias do gênero *Salmonella* são importantes causas de infecções alimentares em todo mundo e é frequentemente encontrada no trato digestivo de animais domésticos e selvagens, sendo muito comum em aves (JAY, 2000). Dentre essas, destaca-se a *Salmonella enterica*, causadora de toxinfecções alimentares em seres humanos através do consumo, principalmente, de produtos alimentícios de origem avícola, como carne, ovos e seus derivados, e no qual a transmissão é de difícil controle pela complexidade da sua epidemiologia e por envolver grande número de reservatórios envolvidos na excreção fecal e contaminação ambiental (ADREATTI FILHO, 2007). A prevalência desse microrganismo em produtos de aves domésticas pode chegar a 60%, conforme mostrado em pesquisas realizadas em diferentes países (ANTUNES et al., 2003; CAPITA et al., 2003; SOULTOS et al., 2003; BOHAYCHUCK et al., 2006).

A demanda dos consumidores por produtos avícolas e seus derivados cresce ano após ano e a indústria avícola está interessada, particularmente, em uma nova tecnologia que traga benefícios e inovações para produtos industrializados que contenham carne de ave na formulação (YUSTE et al., 2000). Nesse sentido, tem ocorrido um aumento crescente no uso da tecnologia de alta pressão, como alternativa de processamento comercial aos métodos térmicos tradicionais de conservação de alimentos (GARRIGA et al., 2004; FONBERG; BROCZEK, 2005). A alta pressão hidrostática (APH) é uma tecnologia emergente que tem recebido grande atenção, tanto em termos de pesquisa como de utilização comercial, oferecendo particularmente ao setor de carnes uma valiosa alternativa em relação ao processo térmico de pasteurização, especialmente na fabricação de produtos alimentícios de conveniência (RASTOGI et al., 2007).



A inativação de *Salmonella* realizada através dos tratamentos com APH tem sido investigada em substratos alimentares como ovo inteiro líquido, pedaços de frango, leite, queijo, presunto cozido e fermentados de baixa acidez, como salsichas (GUAN et al., 2005; MARCOS et al., 2005; DE LAMO-CASTELVI et al., 2007; JOFRÉ et al., 2008). Os ciclos múltiplos de APH mostraram ser comumente mais letais do que o ciclo contínuo de pressurização em suspensão de esporos bacterianos em solução salina (HAYAKAWA et al., 1994). No entanto, existem poucos estudos relacionados com o efeito do tratamento de alta pressão por ciclos sobre as células vegetativas bacterianas, tendo-se nos exemplos havidos mostrado ser a pressão em ciclos mais eficaz do que a pressurização contínua (YUSTE et al., 1998; PONCE et al., 1999; CAPELLAS et al., 2000) Em particular com relação a *Salmonella sp.*, tratamentos com ciclos múltiplos foram mais eficazes do que os ciclos contínuos na sua inativação em ovo inteiro líquido (PONCE et al., 1999; HUANG et al., 2006; BARI et al., 2008). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ciclo único contínuo em comparação com ciclos múltiplos, utilizando pressões de 300 ou de 400 MPa na inativação de *Salmonella* Enteritidis, inoculada em presunto de peru.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção do presunto de peru

O trabalho experimental foi desenvolvido nas plantas pilotos e laboratórios da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Foram usadas coxas de peru congeladas. Para fabricação do presunto de peru, seguiu-se a metodologia de Mathias (2008), onde foi realizado a “toalete” e empregando-se, para a formulação, aditivos e condimentos, adquiridos da empresa Duas Rodas Industrial®. Os componentes da salmoura foram pesados e diluídos em água gelada, sob agitação constante para completa dissolução e, em seguida, incorporou-se a carne, sendo a mistura processada em “cutter” (*Geiger* e modelo UM12) e depois transferida para um recipiente plástico com tampa e armazenada em câmara frigorífica a 7°C por 24 horas. Após este período, a massa obtida subdividida, em porções de em média 2,5 kg cada, foi colocada em embalagem plástica resistente a altas temperaturas (*cook-in*), fechada com seladora a vácuo (*Engevac* e modelo 30 gás) e colocada em formas de aço inoxidável para o cozimento, o qual foi realizado em autoclave até atingir-se 72°C internamente no produto. Após cozimento, o produto foi resfriado em banho de gelo por 40 minutos e, posteriormente, armazenado em BOD a 4°C durante 24 horas.

### 2.2. Aquisição do microrganismo

As análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de microbiologia, utilizando-se a cepa de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13706, mantida congelada para manutenção em 15% glicerol a uma temperatura média de -20°C.

### 2.3. Preparo do inóculo

A cultura foi reativada, realizando-se o repique para tubos contendo 5 mL de ágar TSA (Difco), incubados em BOD por 24 horas a 35°C, de onde foram feitos testes de plaqueamento por estrias para se avaliar a qualidade da cultura e descartar possíveis contaminações, utilizando os meios de cultura ágar XLD (Merck) e ágar TSA. Após ativação e confirmação da qualidade, a mesma foi repicada e incubada em BOD por 24 horas a 35°C, em tubos de ágar TSA até o dia seguinte, onde foi manuseada para se alcançar a concentração desejada.

Para se alcançar a concentração média de  $10^6$  UFC/g, as culturas foram repicadas com alçadas leves em tubos contendo solução salina de 5 mL a 0,85%, levadas ao agitador tipo vortex e depois feita a medição em *Densimat*, do valor encontrado, adicionado-se de 0,3 ao valor com base em procedimento pré-determinado em testes anteriores pelo laboratório, para se alcançar a concentração desejada. Posteriormente, foram então feitas diluições decimais seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  e plaqueamento por espalhamento em superfície em ágar TSA para certificação da concentração desejada a ser usada para inoculação, a qual resultou em  $10^6$  UFC/g.

#### **2.4. Preparo da amostra**

Para inoculação do presunto de peru, a amostra foi manuseada e cominuída em câmara de fluxo laminar (marca Veco, modelo VLS12) de onde foram separados 10 g presunto de peru em sacos estéreis (*vaccum bags*) e adicionados de 0,4 mL da alíquota de  $7,1 \times 10^6$  UFC/mL do inóculo ( $6,8 \log_{10}$  UFC/mL). Feito isto, o presunto de peru foi deixado descansar por 10 minutos para que houvesse uma melhor incorporação do inóculo à amostra. Após tal procedimento, o saco estéril foi selado em uma mini seladora a vácuo (*vacuum Sealer*), colocado em um saco estéril maior e selado novamente com intuito de garantir uma maior segurança no momento da pressurização. Baseando-se em trabalhos experimentais realizados por Ritz et al. (2006); Morales et al. (2008), as amostras foram armazenadas em BOD a  $4^\circ\text{C}$  por 24 horas antes da pressurização.

#### **2.5. Tratamento a alta pressão hidrostática**

As amostras deixadas em BOD a  $4^\circ\text{C}$  por 24 horas, foram submetidas ao tratamento de alta pressão hidrostática. O equipamento de alta pressão hidrostática (*Stansted Fluid Power* e modelo S-FL-850-9-W) utilizado é um modelo laboratorial, possuindo capacidade para operar em uma faixa de pressão de 100 a 900MPa, em temperaturas variando de 0 a  $80^\circ\text{C}$ , e intervalos de tempos variados.

As amostras do presunto de peru foram colocadas dentro do suporte de adição de amostras, em forma de cilindro, de aço inoxidável e com aproximadamente 7,0 cm de diâmetro e 20,0 cm de comprimento, com vários orifícios por onde circula o líquido pressurizador, neste caso álcool 70%. A câmara contendo o suporte de amostras foi hermeticamente fechada e vedada para evitar vazamentos.

A aplicação da alta pressão hidrostática com ciclo contínuo e ciclos múltiplos foi realizada em temperatura ambiente de  $25^\circ\text{C}$ . O tempo necessário para se chegar a pressões de 300 ou 400 MPa (*come up time*) foi de aproximadamente 1 minuto, o de descompressão foi de 10 segundos e o tempo de parada entre os ciclos de pressão foi de aproximadamente 1 minuto. A Tabela 1 mostra a representação destes tempos no processo sendo que, ao término do ciclo, após a despressurização, a câmara foi aberta e as amostras pressurizadas foram retiradas do cilindro, mantidas refrigeradas em BOD a  $4^\circ\text{C}$ , e enviadas em seguida para as análises microbiológicas.

**Tabela 1.** Representação das pressões de 300 e 400 MPa, número de ciclos, tempo de retenção, representação em minutos e o código das amostras de presunto de peru.

Pressão	Nº ciclos	Tempo de retenção (min.)	Representação (minutos)	Código
300 MPa	1	15	1x15	3P1
	2	7,5	2x7,5	3P2
	3	5	3x5	3P3
	5	3	5x3	3P5
400 MPa	1	15	1x15	4P1
	2	7,5	2x7,5	4P2
	3	5	3x5	4P3
	5	3	5x3	4P5

## 2.6. Enumeração de células viáveis de *Salmonella Enteritidis*

Para enumeração das células viáveis de *Salmonella Enteritidis*, as amostras foram analisadas 2 horas após o tratamento de alta pressão, de acordo com Ritz et al. (2006); Morales et al. (2008). Foram realizadas análises em duplicata de amostras do presunto pressurizado, conforme a Tabela 1, e de amostras do presunto controle positivo (inoculada e sem pressão). O conteúdo de cada saquinho foi transferido assepticamente para sacos estéreis com tarja divisória (*Nasco Wirlpack*), adicionado de 90 mL de água peptonada a 0,1%, e levado ao stomacher por 2 minutos. Feito isto, foram realizadas as diluições decimais seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  em tubos contendo 9 mL de água peptonada a 0,1% e, em seguida, procedido plaqueamento pour-plate em duplicata em ágar TSA e incubadas em BOD por 24h a 35°C, para posterior contagem em contador de colônias (CP600 Plus-Phoenix) e avaliação da inativação, expressa em log<sub>10</sub> UFC/g.

## 2.7. Análise microbiológica complementar

Foram realizadas com intuito de se avaliar a qualidade do presunto de peru enviado para as análises de enumeração de *Salmonella Enteritidis* que, por se tratar de um produto não esterilizado, foi necessário descartar possíveis contaminações que poderiam interferir na contagem final, bem como descartar a presença de algum gênero de *Salmonella* no produto.

### 2.7.1. Detecção de *Salmonella sp.*

A análise microbiológica para detecção de *Salmonella sp.* seguiu a metodologia de Andrews et al.(2001). Para as análises, 25 g de amostra de presunto de peru controle negativo (não pressurizado e não inoculado) foram colocados em sacos estéreis com tarja de separação (Nasco WHIL-PACK®) e acrescidos de 225 mL de água peptonada a 0,1%. A detecção envolveu as etapas de pré-enriquecimento seletivo, onde as amostras foram transferidas para caldo TT da Difco (tetracionato) incubada em BOD por 24 horas a 35°C. Posteriormente, foi realizado plaqueamento em meio seletivo-indicador ágar XLD e foi incubado em BOD por 24 horas a 35°C e, após este período, foi então realizada a leitura das placas. Em caso positivo realizam-se provas bioquímicas e sorológicas complementares para comprovação do gênero *Salmonella sp.*

### 2.7.2. Contagem Padrão de Bactérias Aeróbias Mesófilas e Bactérias Ácido Láticas (BAL)

A análise microbiológica de bactérias ácido-láticas (BAL) seguiu a metodologia preconizada por Hall et al. (2001) e de contagem padrão em placas de mesófilos aeróbios (MORTON, 2001).

Para ambas as metodologias, foram utilizadas amostras de presunto de peru controle negativo (não inoculada e não pressurizada) e amostras pressurizadas embaladas a vácuo em sacos estéreis (Nasco WHIL-PACK®) contendo 10 g cada. Para as análises os 10g de amostra foram colocados em sacos estéreis com tarja de separação (Nasco WHIL-PACK®) e acrescidos de 90 mL de água peptonada a 0,1%. Homogeneizou-se a amostra por 2 minutos em *stomacher* (Nova Ética), e foram realizadas diluições decimais seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ , retirando-se 1 mL e fazendo plaqueamento *pour-plate* em duplicata. Para BAL utilizou-se sobrecamada em ágar de Man, Rogosa, Sharp - MRS (Oxoid), seguido de incubação em BOD a 30°C de 3 a 5 dias e, para aeróbios mesófilos, utilizou-se o meio ágar PCA (Merck), seguido de incubação em BOD a 35°C por 48 horas. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram analisados em contador de colônias (CP600 Plus-Phoenix) e expressos em UFC/g.

### 2.8. Análise estatística

Os dados foram analisados por análise de variância, seguida do teste de Tukey. As diferenças entre os tratamentos foram consideradas estatisticamente significativas em um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0.05$ ).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos tratamentos por alta pressão e também da amostra controle estão representados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Tratamentos, média (UFC/g), log<sub>10</sub> UFC/g e redução logarítmica de *Salmonella* Enteritidis inoculada em amostras de presunto de peru, comparada com amostra controle, baseando-se na inoculação inicial de 6,8 log<sub>10</sub> UFC/mL (n=36) para amostra controle e 5,3 UFC/g para as amostras pressurizadas (base na amostra controle).

Tratamentos	Média UFC/g	log <sub>10</sub> UFC/g	Redução log
Controle positivo	2,08E+05 <sup>a</sup>	5,3	1,5
3P1	1,75E+03 <sup>b</sup>	2,5	2,7
3P2	1,24E+03 <sup>c</sup>	2,4	2,9
3P3	1,20E+03 <sup>c</sup>	2,4	2,9
3P5	5,53E+02 <sup>d</sup>	2,0	3,3
4P1	0,00E+00 <sup>e</sup>	0,0	5,3
4P2	0,00E+00 <sup>e</sup>	0,0	5,3
4P3	0,00E+00 <sup>e</sup>	0,0	5,3
4P5	0,00E+00 <sup>e</sup>	0,0	5,3

Valores com Letras diferentes na coluna da média UFC/g diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ )

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que com relação a amostra controle positivo, houve diferença significativa na inativação resultante dos tratamentos com pressão. Além disso, salienta-se que houve uma redução decimal de 1,5 log<sub>10</sub> UFC/g na

contagem do inóculo, desde o preparo até o momento da pressurização. Tal diferença pode estar relacionada com as condições de armazenamento da amostra, efetuada a temperatura de 4°C por 24 horas, e que consiste em um fator limitante que pode ter causado injúria da *Salmonella enteritidis*, reduzindo desta maneira a sua contagem. Em estudo realizado por Jofré et al. (2008) com presunto cozido controle, tratado por APH de 400 MPa acrescido de antimicrobianos ou tratado somente com antimicrobianos, inoculado com concentração de  $3,4 \times 10^4$  UFC/g de *Salmonella* Enteritidis, foi também observado que a amostra controle apresentou redução decimal de até 1,5 log<sub>10</sub> UFC/g durante o armazenamento a 6°C, confirmando que a temperatura foi um fator determinante ocasionado redução decimal em todas as amostras.

O controle negativo teve ausência de *Salmonella spp* em 25 g da amostra. Para todas as amostras controle e pressurizadas foram realizadas contagens de mesófilos aeróbios e bactérias ácido lácticas e as mesmas apresentaram valores  $< 1,0 \times 10^1$  UFC/g. Essas análises foram realizadas com intuito de averiguar as condições microbiológicas do presunto de peru e para garantir que os resultados obtidos do crescimento em ágar TSA fossem isentas do crescimento de outros microrganismos.

Para a pressão de 300 MPa em ciclo contínuo de 15 minutos a redução foi de 2,7 log<sub>10</sub> UFC/g, com diferença significativa para as demais amostras, para 300 MPa com 2 ciclos de 7,5 minutos e 3 ciclos de 5 minutos a redução foi de 2,9 log<sub>10</sub> UFC/g, não diferindo significativamente entre elas, mas diferindo das demais amostras e para 300 MPa com 5 ciclos de 3 minutos a redução foi de 3,3 log<sub>10</sub> UFC/g, diferindo das demais amostras. Observou-se que a ação dos ciclos múltiplos é mais eficaz quando comparado ao ciclo contínuo, com 5 ciclos de 3 minutos, maior foi a inativação do microrganismo ao ser comparado com 3 ciclos de 5 minutos, que por sua vez possuiu maior inativação quando comparado ao um único ciclo de 15 minutos. Isso se deve à grande injúria causada na membrana celular em função da rápida e grande diferença de pressão na interface da membrana intracelular e extracelular (CHEFTEL, 1995).

Morales et al. (2009) estudaram o efeito da pressão de 300 MPa em ciclo contínuo (0, 1, 3, 5, 10, 15 e 20 minutos) e múltiplo (2, 3 e 4 ciclos de 1 minuto, 2 e 3 ciclos de 3 minutos e 2 ciclos de 5 minutos) na inativação de três cepas de *Salmonella* Enteritidis inoculadas em concentração média de  $10^7$  UFC/g em filés de peito de frango, e observaram que no ciclo contínuo houve redução das contagens em 0,58 log<sub>10</sub> UFC/g para tempo zero e 3,35 log<sub>10</sub> UFC/g para tempo de 20 minutos. Concluíram que os vários ciclos de tratamento não tiveram diferença quando comparados com os ciclos contínuos do mesmo, com exceção para 2 ciclos de 5 minutos, que foi mais eficaz do que um ciclo contínuo de 10 minutos, estando dessa forma de acordo com a presente pesquisa realizada com o presunto de peru.

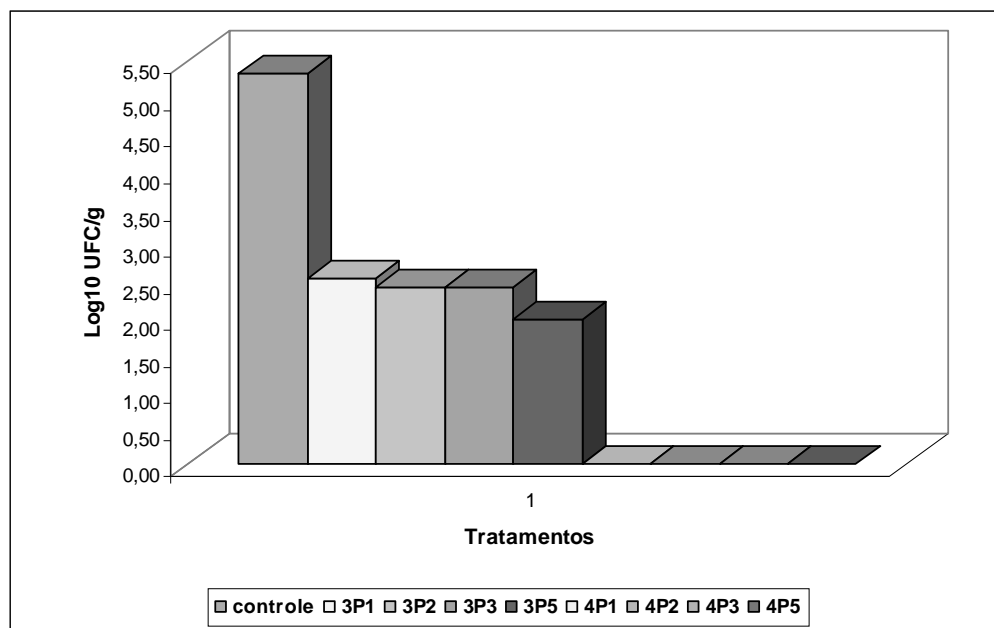
Em trabalhos realizados por Fioretto et al. (2005) inoculando *Salmonella* Enteritidis em caviar e caldo tripticase de soja, tratados com pressões de 150 a 450 MPa, com ciclo contínuo de 15 minutos, ciclos múltiplos de 3 ciclos de 3 minutos, 5 ciclos de 3 minutos, e 7 ciclos de 2 minutos, observou-se que a destruição total foi obtida em 3 ciclos a 350 MPa, 5 ciclos com 300 MPa e 7 ciclos com 250 MPa, mostrando que o aumento do número de ciclos permitiu a redução decimal e, dessa forma, a utilização de pressões menores seria mais eficaz.

Ponce et al. (1999) avaliaram a destruição de *Salmonella* Enteritidis inoculada em concentração média de  $10^7$  UFC/g em ovo inteiro líquido, utilizando pressões de 350 e 450 MPa, com variações de temperatura (50, 20, 2 e -15°C) e tempo (ciclos contínuos de 5, 10 e 15 minutos e ciclos múltiplos de 2 ciclos de 5 minutos e 3 ciclos de 5 minutos). Os autores observaram que a taxa de inativação aumentou com o tempo de pressão e exposição, alcançando a inativação total em vários tratamentos a 50°C, e que os tratamentos com ciclos mostraram uma maior eficácia do que os tratamentos contínuos com o mesmo tempo total. Em outro trabalho com ovo líquido, Bari

et al. (2008) inocularam 8,0 log<sub>10</sub> UFC/g de *Salmonella* Enteritidis e usaram pressões de 350MPa, com temperatura de 50°C, empregando 4 ciclos de 2 minutos com intervalo de 2 minutos, 4 ciclos de 5 minutos com intervalo de 5 minutos, e 4 ciclos de 10 minutos com intervalo de 10 minutos. Avaliaram que o menor intervalo entre os ciclos de pressão possibilitou uma maior inativação, mostrando que há a possibilidade do menor intervalo de modo a não possibilitar a recuperação das estruturas bacterianas, causando maior lesão. No presente trabalho com o presunto de peru, optou-se por usar o menor intervalo possível entre as pressões, no máximo de 1 minuto para ambos os tratamentos.

Já para as pressões de 400 MPa tanto no ciclo contínuo, quanto os ciclos múltiplos, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, mas diferiram da pressão de 300 MPa e controle e a redução decimal foi de 6,85 log<sub>10</sub> UFC/g, inativando completamente o patógeno, e mostrando que a pressão de 400 MPa, independente do ciclo, foi mais eficaz para inativação da cepa de *Salmonella* Enteritidis utilizada. Morales et al. (2009) estudaram também o efeito da pressão de 400 MPa na inativação de três cepas de *Salmonella* Enteritidis inoculadas em concentração média de 10<sup>7</sup> UFC/g em filés de peito de frango e observaram que a proporção de células lesadas do microrganismo foi maior após a aplicação da pressão de 400 MPa quando comparado a pressão de 300MPa, nas mesmas condições de ciclo contínuo e múltiplo, e que a pressão de 400 MPa em 15 minutos também foi suficiente para eliminar completamente o patógeno inoculado.

Na Figura 1 está representado o gráfico de barras que mostra a inativação da *Salmonella* Enteritidis inoculada no presunto de peru para amostra controle e as amostras pressurizadas.



**Figura 1.** Representação da inativação de *Salmonella* Enteritidis (log<sub>10</sub> UFC/g) inoculada em amostras de presunto de peru após aplicação da APH em ciclos contínuo e múltiplo.

A *Salmonella* Enteritidis foi mais sensível a pressões de 400 MPa e dependendo da concentração inoculada as pressões menores podem ser bastante vantajosas, principalmente levando-se em consideração os ciclos múltiplos, que se mostraram ser mais eficazes. Considerando-se que no presente trabalho a inoculação do patógeno foi elevada (em torno de 10<sup>6</sup>

UFC/g) é importante correlacionar a concentração inicial do patógeno nos alimentos, as condições extrínsecas envolvidas, como exemplo a temperatura de armazenamento.

De acordo com Jofré, Aymerich e Garriga (2008) considerando a incapacidade da patógeno de crescer em temperaturas de refrigeração, e a recontaminação pós-processamento da *Salmonella* ser drasticamente reduzida pelos tratamento APH do presunto cozido fatiado e armazenamento a 4°C, parece ser uma forma eficaz de se obter um produto de alto valor agregado e seguro.

#### 4. CONCLUSÃO

A utilização da alta pressão hidrostática a 400 MPa em ciclo contínuo e múltiplo mostrou-se bastante eficiente na inativação completa de *Salmonella* Enteritidis em presunto de peru e que mesmo em pressões de 300MPa onde a inativação foi parcial, houve redução da carga microbiana inoculada, principalmente em ciclos maiores, mostrando que quanto maior o número de ciclos, maior é inativação microbiana. A concentração usada no estudo foi elevada e talvez em concentrações menores, as pressões em torno dos 300 MPa podem ser uma alternativa de trabalho com grande aplicabilidade na inativação do patógeno em matriz alimentar, garantindo assim, uma maior segurança.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREATTI FILHO, R.L. Paratifo aviário. In: ANDREATTI FILHO, R.L. (Ed). **Saúde aviária e doenças**. São Paulo, Roca, 2007, 96-111p.

ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILLIKER, J.; BAILY, J.S. *Salmonella*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4ed. Washington: American Public Health Association, APHA 2001, Cap.37, p.357-380.

ANTUNES, P.; RÉU, C.; SOUSA, J.C.; PEIXE, L.; PESTANA, N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, p.97–103, 2003.

BARI, M.L.; UKUKU, D.O.; MORI, M.; KAVAMOTO, S.; YAMAMOTO, K. Effect of hydrostatic pressure pulsing on the inactivation of *Salmonella* Enteritidis in liquid whole egg. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.5, p.175–182, 2008.

BOHAYCHUCK, V.M.; GENSLER, G.E.; KING, R.K.; MANNINEN, K.I.; SORENSEN, O.; WU, J.T.; STILES, M.E.; McMULLEN, L.M. Occurrence of pathogens in raw and ready to eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. **Journal of Food Protection**, v.69, p.2176–2182, 2006.

CAPELLAS, M.; MOR-MUR, M.; GERVILLA, R.; YUSTE, J.; GUAMIS, B. Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goat's milk fresh cheese. **Food Microbiology**, v.17, n.6, p.633-641, 2000.

CAPITA, R.; ALVAREZ-ASTORGA, M.; ALONSO-CALLEJA, C.; MORENO, B.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M.C. Occurrence of salmonellae in retail chicken carcasses and their products in Spain. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.169–173, 2003.

CHEFTEL, J.C. Review: high-pressure, microbial inactivation and food preservation. **Food Science and Technology International**, v.1, p.75-90, 1995.

DE LAMO-CASTELLVÍ, S.; ROIG-SAGUÉS, A.X.; LÓPEZ-PEDEMONTE, T.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.M.; GUAMIS, B.; CAPELLAS, M. Response of two *Salmonella enterica* strains inoculated in model cheese treated with high hydrostatic pressure. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.99–109, 2007.

FIORETTO, F.; CRUZ, C.; LARGETEAU, A.; SARLI, T.S.; DEMAZEAU, G.; EL MOUEFFAK, A. Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis in tryptic soy broth and caviar samples by high pressure processing. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, v.38, p.1259-1265, 2005.

FONBERG-BROCZEK, M.; WINDYGA, B.; SZCZAWIN SKI, J.; SZCZAWINSKA, M.; PIETRZAK, D.; PRESTAMO, G. High pressure processing for food safety. **Acta Biochemica Polonica**, v.52, p.721–724, 2005.

GARRRIGA, M.; GREBOL, N.; AYMERICH, M.T.; MONFORT, J.M; HUGAS, M. Microbial inactivation after high-pressure processing at 600MPa in commercial meat products over its shelf life. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v.5, p.451–457, 2004.

GUAN, D.; CHEN, H.; HOOVER, D.G. Inactivation of *Salmonella* Typhimurium DT 104 in UHT whole milk by high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, v.104, p.145–153, 2005.

HALL P.A.; LEDENBACH L.; FLOWERS R.S. **Acid Producing Microorganisms**. In: DOWNES F.P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4ed. Washington: American Public Health Association, APHA 2001, Cap.19, p.201-207.

HAYAKAWA, I.; KANNO, T.; YOSHIYAMA, K.; FUJIO, Y. Oscillatory compared with continuous high pressure sterilization on *Bacillus stearothermophilus* spores. **Journal of Food Science**, v.59, p.164–167, 1994.

HUANG, E.; MITTAL, G.S.; GRIFFITHS, M.W. Inactivation of *Salmonella* Enteritidis in liquid whole egg using combination treatments of pulsed electric field, high pressure and ultrasound. **Biosystems Engineering**, v.94, p.403–413, 2006.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 6ed. Maryland: Aspen, 2000, 679p.

JOFRÉ, A.; AYMERICH, T.; GARRIGA, M. Assessment of the effectiveness of antimicrobial packaging combined with high pressure to control *Salmonella* sp. in cooked ham. **Food Control**, v.19, p.634–638, 2008.



- MARCOS, B.; AYMERICH, T.; GARRIGA, M. Evaluation of high pressure processing as an additional hurdle to control *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in low-acid fermented sausages. **Journal of Food Science**, v.70, p.M339–M344, 2005.
- MORALES, P.; CALZADA, J.; ÁVILA, M.; NUÑEZ, M. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Ground Beef by Single-Cycle and Multiple-Cycle High Pressure Treatments. **Journal of Food Protection**, v.71, n.4, p.811-815, 2008.
- MORALES, P.; CALZADA, J.; RODRÍGUEZ, B.; DE PAZ, M.; NUÑEZ, M. Inactivation of *Salmonella* Enteritidis in Chicken Breast Fillets by Single-Cycle and Multiple-Cycle High Pressure Treatments. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, p.577-581, 2009.
- MORTON, R.D. **Aerobic Plate Count**. In: DOWN, F.P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4ed. Washington, D.C.: APHA, 2001, Cap.7, p.63-67.
- MATHIAS, S. P. **Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial do presunto de peru submetido à tecnologia de alta pressão hidrostática**. 2008, 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.
- PONCE, E.; PLA, R.; SENDRA, E.; GUAMIS, B.; MOR-MUR, M. Destruction of *Salmonella* Enteritidis inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure: comparative study in selective and non-selective media. **Food Microbiology**, v.16, p.357–365, 1999.
- RASTOGI, N.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S.; BALASUBRAMANIAM, V.M.; NIRANJAN, K.; KNORR, D. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.47, n.1, p.69–112, 2007.
- REIJ, M.W.; DEN AANTREKKER, E.D. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.1–11, 2004.
- RITZ, M.; PILET, M.F.; JUGIAU, F.; RAMA, F.; FEDERIGHI, M. Inactivation of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* using high-pressure treatments: destruction or sublethal stress. **Letters in Applied Microbiology**, v.42, p.357-362, 2006.
- SOULTOS, N.; KOIDIS, P.; MADDEN, R.H. Presence of *Listeria* and *Salmonella spp.* in retail chicken in Northern Ireland. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, p.421–423, 2003.
- YUSTE, J.; MOR-MUR, M.; CAPELLAS, M.; GUAMIS, B.; PLA, R. Microbiological quality of mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure and nisin. **Food Microbiology**, v.15, n.4, p.407-414, 1998.
- YUSTE, J.; PLA, R.; MOR-MUR, M. *Salmonella* Enteritidis and aerobic mesophiles in inoculated poultry sausages manufactured with high-pressure processing. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, p.374-377, 2000.

## **CAPÍTULO V.**

### **AVALIAÇÃO DE MEIOS CONVENCIONAIS E METODOLOGIA TAL (*FINA CAMADA DE ÁGAR*) NA RECUPERAÇÃO DE *SALMONELLA ENTERITIDIS* INJURIADA PELA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA**

# **Avaliação dos meios convencionais e metodologia TAL (*Fina Camada de Ágar*) na Recuperação de *Salmonella* Enteritidis Injuriada pela Alta Pressão Hidrostática**

**Simone Pereira Mathias, Amauri Rosenthal, Arlene Gaspar, Celina Mara Soares e Flávia Reis C. das Neves**

## **RESUMO**

A utilização de meios seletivos para isolamento de microorganismos alvo, muitas das vezes acabam inibindo as células injuriadas por tratamentos de conservação, como a alta pressão, por isso alternativas são propostas para se obter resultados mais fiéis e recuperar as células que sofreram injúria. A tecnologia de alta pressão hidrostática (APH) é inovadora, não utiliza calor, mas possui pressões elevadas capazes de alterar estruturas importantes do metabolismo e organização da célula dos microorganismos, levando à inativação ou injúria subletal. No presente estudo foi avaliado o uso de metodologias tradicionais, como o meio não seletivo ágar TSA e meio seletivo ágar XLD para recuperação de células injuriadas pela APH comparando com a metodologia TAL, que traz melhores vantagens na recuperação, por ser um método seletivo e que ao mesmo tempo não inibe células feridas. Para isso foi utilizado o presunto de peru inoculado com *Salmonella* Enteritidis e submetido a pressões de 300 e 400 MPa em ciclo contínuo e múltiplo e armazenado por 10 dias em temperatura de 10°C. Foi observado que houve maior recuperação através da metodologia TAL ao ser comparada com o meio seletivo usual, o XLD. A recuperação nos meios XLD e TAL só foram observadas até o 5º dia, no 10º dia não houve mais recuperação de *Salmonella* Enteritidis, provavelmente a temperatura foi um fator limitante, tornando-se letal para as células injuriadas. A metodologia TAL foi mais eficiente na recuperação do patógeno do que a o meio convencional XLD.

**Palavras-chave:** metodologia TAL, meios convencionais TSA e XLD, *Salmonella* Enteritidis, alta pressão hidrostática.

---

Simone P. Mathias. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, DTA, Rodovia BR 465, Km7, Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: [spmathias@ufrj.br](mailto:spmathias@ufrj.br)

A. Rosenthal. Embrapa Labex Brazil-Europe, Laboratory of Food and Microbial Engineering (GPMA), University of Bourgogne and Agrosup Dijon, 21000 Dijon, France, +33(0)380774056

Arlene Gaspar. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, DTA, Rodovia BR 465, Km7, Seropédica, RJ, Brasil.

Celina Mara Soares. Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas, 29501, Guaratiba, Rio de Janeiro, R.J, Brasil.

Flávia R.C. das Neves. Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas, 29501, Guaratiba, Rio de Janeiro, R.J, Brasil.

## ABSTRACT

The use of selective media for isolation of target microorganisms may often inhibit cells injured by preservation treatments such as high pressure, so alternatives are proposed to obtain more reliable results and recover cells that have suffered injury. High hydrostatic pressure (HHP) is an innovating technology that uses instead of heating elevated pressures capable of altering organization and metabolism of microbial cells, leading to inactivation and sublethal injury. The aim of the present was to evaluate TAL methodology for the recovery of injured cells ocasionated by HHP in comparison to traditional methodologies, such as a non-selective TSA agar and selective medium XLD agar. The TAL assay potentially brings advantages for allowing a better microbial recovery, and in spite of using a selective method does not inhibit wounded cells. For the study we used turkey ham inoculated with *Salmonella* Enteritidis and treated with pressures of 300 and 400MPa in a continuous and multiple cycles, following by storage for 10 days at 10°C. It was observed that there was a greater recovery by TAL methodology in coparison to the usual selective medium XLD. The recovery in the media XLD and TAL were not observed until the 5th day, the 10th day there was no further recovery of *Salmonella* Enteritidis, probably the temperature was a limiting factor, making it lethal to cells injured. The TAL method was more efficient in the recovery of the pathogen than the middle convencional XLD.

## 1. INTRODUÇÃO

O processamento de alta pressão pode ser aplicado para inativação da microbiota de alimentos e bebidas, melhorando a segurança e aumentando a validade comercial. A principal região afetada pela pressão é a membrana citoplasmática, onde a permeabilidade e troca de íons são afetados (HOOVER et al., 1989). De acordo com Patterson et al. (1995), essas alterações da membrana da célula microbiana são provavelmente a causa das lesões subletais geradas pelo tratamento de alta pressão.

A *Salmonella* Enteritidis é uma bactéria Gram negativa, que pode ser isolada do trato gastrointestinal do homem e de animais, contaminando assim os alimentos e a água (FIORETTO et al., 2005). Está envolvida em uma série de surtos de doenças de origem alimentar, sendo uma das maiores causas de preocupação em nível mundial (ANANTH et al., 1998).

Após o processamento de alimentos, por meio de aquecimento, congelamento, secagem, liofilização, irradiação, fermentação ou adição de antimicrobianos e produtos químicos, parte da população de microrganismos estará morta ou letalmente ferida, enquanto que outra parte poderá sobreviver constituindo a população não lesada e havendo, ainda outra parte que poderá ser ferida subletalmente, ficando injuriada (KANG et al., 1998). Do ponto de vista microbiológico, segundo Cheftel e Culioli (1997); Patterson et al. (1995), a tecnologia de alta pressão pode ocasionar lesão irreversível, lesão subletal ou ainda sobrevivência de células.

A injúria microbiana, segundo Hurst (1984), pode ser definida simplesmente como o efeito de um ou mais tratamentos subletais em um microrganismo. De acordo com Wesche et al. (2009), os microrganismos que sobrevivem ao estresse provocado por tratamentos muitas das vezes ganham resistência à essa condição, e por isso o estado fisiológico de uma bactéria é uma consideração importante quando se estuda a sua resposta às técnicas de conservação de alimentos.

Segundo Kang e Fung (2000), muitos estudos têm sido desenvolvidos para métodos de isolamento, identificação e detecção de patógenos de origem alimentar, sendo baseados em

técnicas tradicionais de microbiologia, que incluem enriquecimento, isolamento e confirmação. Segundo esses autores, muitos meios seletivos estão sendo desenvolvidos para isolamento de microrganismos alvo objetivando selecionar microrganismos saudáveis. Os meios comumente usados possuem, em sua formulação, agentes seletivos que incluem corantes orgânicos, antibióticos, sais biliares e surfactantes, que no entanto estes podem inibir o desenvolvimento de células alvo que foram lesionadas.

Durante as primeiras horas de incubação no meio TAL, as células lesionadas se recuperam e começam a crescer na camada superior de TSA e, considerando-se que os agentes seletivos da camada inferior migram para a camada superior após algum tempo, o microrganismo pode então executar a maioria das reações que faria em um meio seletivo, com uma concentração reduzida dos compostos específicos requeridos, aumentando as chances de recuperação (YUSTE et al., 2004).

Ainda de acordo com Kang et al. (1998), agares não seletivos possibilitam o crescimento de células saudáveis e injuriadas de diferentes microrganismos, não sendo portanto usualmente possível identificar o microrganismo (patógeno) alvo, mas por outro lado os agares seletivos não permitem o crescimento de células injuriadas subletalmente. Por este motivo muitos estudos têm tentado melhorar as técnicas de recuperação de células injuriadas.

O objetivo do presente estudo foi a aplicação da metodologia TAL comparada aos métodos tradicionais para recuperação de células injuriadas de *Salmonella* Enteritidis inoculada em presunto de peru tratado pela alta pressão hidrostática.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Processo de fabricação do presunto de peru

O trabalho experimental foi desenvolvido nos laboratórios e plantas pilotos da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Coxas de peru congeladas foram usadas na fabricação do presunto de peru, envolvendo a “toalete” na coxa de peru, formulação e adição dos aditivos segundo a metodologia de Mathias (2008). Em seguida, a carne foi incorporada à salmoura, levando-se a mistura resultante ao “cutter” (Geiger e modelo UM12), com posterior transferência para um recipiente e refrigeração a 7°C por 24 horas. Após este período, a massa de 2,5 kg cada foi colocada em embalagem plástica resistente a altas temperaturas (*cook-in*), fechada com seladora a vácuo (Engevac e modelo 30 gás) e prensada em formas de aço inoxidável. Posteriormente, realizou-se o cozimento em autoclave até que a temperatura interna do produto atingisse 72°C, seguido de resfriamento em banho de gelo por 40 minutos e de armazenamento em BOD a 4°C por 24 horas.

### 2.2. Preparo da cultura bacteriana

Utilizou-se cepa de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13706, mantida congelada em 15% de glicerol a uma temperatura média de -20°C. A cultura foi reativada, utilizando repiques para tubos contendo 5 mL de ágar TSA (Difco), incubados em BOD por 24 horas a 35°C, de onde foram feitos testes de plaqueamento por estrias para se avaliar a qualidade da cultura e descartar possíveis contaminações, utilizando os meios de cultura ágar XLD (Merck) e TSA. Após ativação, realizou-se repique e incubação em BOD por 24 horas a 35°C. Para se alcançar a concentração média de 10<sup>6</sup> UFC/g, as culturas foram repicadas para tubos contendo solução salina de 5 mL a 0,85%, levadas ao agitador tipo vortex e depois feita a medição em *Densimat* (marca),

adicionado-se 0,3 ao valor encontrado com base em testes anteriores realizados no laboratório em, para obtenção da concentração desejada. Feito esse procedimento, foram então feitas diluições decimais seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  e plaqueamento por espalhamento em superfície em ágar TSA para certificação da concentração desejada a ser usada para inoculação, que resultou em  $10^6$  UFC/g.

### **2.3. Preparo da amostra**

Para inoculação do presunto de peru, a amostra foi manuseada e cominuída em câmara de fluxo laminar (Veco, modelo VLS12) de onde foram separados 10 g presunto de peru em sacos estéreis (vaccum bags) e adicionados de 0,4 mL da alíquota de  $7,1 \times 10^6$  UFC/mL do inóculo ( $6,8 \log_{10}$  UFC/mL). Feito isto, o presunto de peru foi deixado descansar por 10 minutos para que houvesse uma melhor incorporação do inóculo à amostra. Posteriormente, o saco estéril foi selado em uma mini seladora a vácuo (*Vacuum Sealer*), sendo depois colocado em um saco estéril maior o qual foi também selado com intuito de garantir uma maior segurança no momento da pressurização. Baseando-se em trabalhos experimentais realizados por Ritz et al. (2006); Morales et al. (2008), as amostras foram armazenadas em BOD a 4°C por 24 horas, antes da pressurização.

### **2.4. Uso da alta pressão hidrostática**

As amostras acondicionadas foram submetidas ao tratamento de alta pressão hidrostática utilizando-se equipamento laboratorial (*Stansted Fluid Power* e modelo S-FL-850-9-W) com capacidade de operação a pressões de 100 a 900 MPa, e com variação de temperatura de 0 a 80°C.

As amostras do presunto de peru foram colocadas dentro do suporte de adição de amostras, em forma de cilindro e de aço inoxidável, possuindo vários orifícios por onde circula o líquido pressurizador, neste caso álcool 70%. A câmara contendo o suporte de amostras foi hermeticamente fechada e vedada para evitar vazamentos. Foi realizada a aplicação da alta pressão hidrostática com ciclo contínuo de 300 ou 400 MPa por 15 minutos e ciclos múltiplos com 2 ciclos de 7,5 minutos, 3 ciclos de 5 minutos e 5 ciclos de 3 minutos, realizada em temperatura ambiente. O tempo necessário para se chegar às pressões estabelecidas foi de aproximadamente 1 minuto, sendo necessários 10 segundos para descompressão e estabelecido em 1 minuto o tempo de parada entre os ciclos de pressão. Ao término do ciclo, após a despressurização, a câmara foi aberta e as amostras pressurizadas foram retiradas do cilindro, mantidas refrigeradas em BOD a 4°C e enviadas para as análises microbiológicas.

### **2.5. Contagem de células injuriadas de *Salmonella* Enteritidis**

Após uma primeira análise para enumeração das células de *Salmonella* Enteritidis, realizada com 2 horas após o tratamento de alta pressão, as amostras foram armazenadas em BOD a 7°C por 10 dias e posteriormente em temperatura de 35°C por 4 horas, antes de serem analisadas novamente.

Foram realizadas análises em duplicata de amostras do presunto de peru pressurizada e controle positivo (inoculada e sem pressão). O conteúdo de cada saquinho foi transferido assepticamente para sacos estéreis com tarja divisória (*Nasco Wirlpack*) adicionado de 90 mL de água peptonada a 0,1%, sendo então homogenizado no stomacher por 2 minutos. Feito isto,

foram realizadas as diluições decimais seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  em tubos contendo 9 mL de água peptonada a 0,1%, e depois foi feito plaqueamento *pour-plate* de 1 mL do inóculo em duplicata no ágar TSA e plaqueamento por espalhamento em superfície de 0,1mL da diluição com alça de drigalski nos meios seletivo com agar XLD e em meio de recuperação. Tal procedimento baseou-se na metodologia TAL (*Thin Agar Layer*), que serve para recuperação da célula injuriadas, descrito por Kang e Fung, 2000; Wu e Fung, 2001; Wu, 2008, conforme Figura 1.



**Figura 1.** Representação esquemática da metodologia TAL. Fonte: adaptado de Wu e Fung (2001).

## 2.6. Análise estatística

Foi realizada análise de variância, seguida do teste de Tukey para análise das diferenças entre as amostras ao longo dos dias, em um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0.05$ ).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 1), pode-se verificar que as amostras controle tiveram contagens significativamente diferentes dos demais tratamentos, tanto em ágar TSA e XLD, quanto no TAL nos três períodos de análise.

**Tabela 1.** Condição operacional, tratamento de APH, tempo e meios de cultura ágar TSA, TAL (fina camada de ágar) e ágar XLD da inativação de *Salmonella* Enteritidis inoculada em presunto de peru, comparada com amostra controle, baseando-se na concentração inicial de  $6,8 \log_{10}$  UFC/g ( $n=81$ ).

Condição operacional		Ágar TSA			TAL (fina camada de ágar)			Ágar XLD		
Tratamentos (Pressão MPa)	Tempo (min.)	Dia 1	Dia 5	Dia 10	Dia 1	Dia 5	Dia 10	Dia 1	Dia 5	Dia 10
Controle	-	5,30 <sup>b</sup>	5,35 <sup>b</sup>	6,04 <sup>a</sup>	5,21 <sup>b</sup>	5,19 <sup>b</sup>	5,12 <sup>b</sup>	4,98 <sup>c</sup>	4,92 <sup>c</sup>	4,89 <sup>c</sup>
300 (3P1)	15	3,40 <sup>d</sup>	1,90 <sup>f</sup>	0,82 <sup>g</sup>	3,23 <sup>d</sup>	1,76 <sup>f</sup>	0,00 <sup>g</sup>	2,03 <sup>e</sup>	1,35 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>
300 (3P2)	2 x 7,5	3,21 <sup>d</sup>	1,85 <sup>g</sup>	0,61 <sup>g</sup>	2,82 <sup>e</sup>	1,59 <sup>f</sup>	0,00 <sup>g</sup>	1,91 <sup>f</sup>	1,10 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>
300 (3P3)	3 x 5	3,17 <sup>d</sup>	1,20 <sup>g</sup>	0,54 <sup>g</sup>	2,78 <sup>e</sup>	1,54 <sup>f</sup>	0,00 <sup>g</sup>	1,77 <sup>f</sup>	0,90 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>
300 (3P5)	5 x 3	1,45 <sup>g</sup>	0,78 <sup>g</sup>	0,12 <sup>g</sup>	1,23 <sup>g</sup>	0,48 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,42 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>
400 (4P1)	15	0,00 <sup>g</sup>	0,54 <sup>g</sup>	0,70 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>
400 (4P2)	2 x 7,5	0,00 <sup>g</sup>	0,32 <sup>g</sup>	0,56 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>
400 (4P3)	3 x 5	0,00 <sup>g</sup>	0,21 <sup>g</sup>	0,47 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>
400 (4P5)	5 x 3	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,18 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>	0,00 <sup>g</sup>

Letras diferentes na coluna da média UFC/g diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ), teste de Tukey.

Salienta-se que a maior contagem verificada no 10° dia em meio ágar TSA deveu-se, provavelmente, ao crescimento de outros microrganismos, além do microrganismo alvo, no meio, pelo fato deste não ser seletivo e, resultando em possível interferência na análise.

Para os tratamentos com 300 MPa a injúria ocasionada foi subletal, as mesmas foram recuperadas em etapas posteriores utilizando-se meios específicos para este fim. Para tratamento a 300 MPa com ciclo contínuo, no 1° dia a diferença na recuperação do meio TAL para XLD foi de 1,2 log<sub>10</sub> UFC/g, para 5° dia de análise a diferença foi de 0,41 UFC/g. Para a condição 300 MPa com 2 ciclos de 7,5 minutos, no 1° dia a diferença na recuperação entre o meio TAL e XLD foi de 1,01 log<sub>10</sub> UFC/g e para o 5° dia foi de 0,49 log<sub>10</sub> UFC/g, já para o 10° dia não houve recuperação. Para a condição de 300 MPa 3 ciclos de 5 minutos, a diferença na recuperação foi de 1,01 do meio TAL comparado com o XLD, para o 5° dia essa diferença foi de 0,64 log<sub>10</sub> UFC/g. Para 300 MPa com 5 ciclos de 3 minutos houve diferença na recuperação de 1,03 log<sub>10</sub> UFC/g entre meio TAL e XLD e para o 5° dia foi de 0,48 log<sub>10</sub> UFC/g. Para as condições de 300MPa não houve crescimento no 10° dia de análise para os meios TAL e XLD, indicando que não houve recuperação da *Salmonella* Enteritidis, mas houve crescimento de outros microrganismos no ágar TSA.

Em trabalhos realizados por Roberts, Parker-Baird e Tompkin (1996), avaliaram que durante o armazenamento refrigerado de presunto pressurizado inoculado com *Salmonella*, a 6°C não houve recuperação posterior do patógeno e eles consideram que este fator foi referente ao fato da temperatura ser um fator limitante para o crescimento do microrganismo, que não suporta temperaturas baixas.

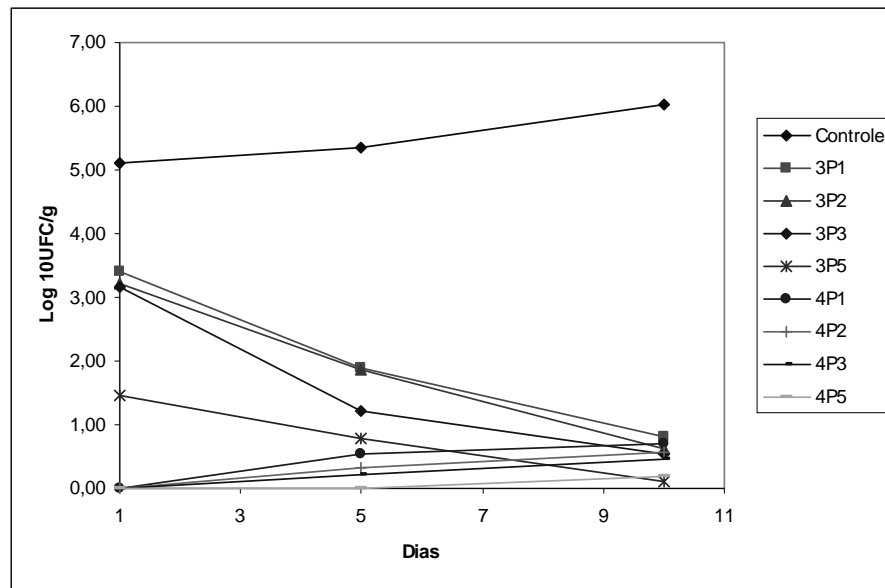
Levando-se esse fato em consideração, pode-se concluir que a partir do 10° dia não houve mais recuperação nos meios XLD e TAL, porque a temperatura foi um fator limitante para o desenvolvimento da *Salmonella* Enteritidis injuriada pela alta pressão hidrostática, levando à sua inativação completa nas pressões de 300 MPa.

Para as condições em 400 MPa não houve recuperação em nenhum dos meios XLD e TAL, mostrando que a houve inativação completa da *Salmonella* e que a APH nessas condições causa uma injúria letal, mas houve crescimento no meio TSA, provavelmente oriundo de outros microrganismos.

A seguir estão representadas as Figuras relacionadas com a recuperação de *Salmonella* Enteritidis nos três meios utilizados. Na Figura 2 pode-se verificar que a recuperação no meio TSA foi bem maior quando comparado aos outros meios. O meio TSA é considerado um meio não seletivo, onde o crescimento é maior devido ao crescimento de outros microrganismos.

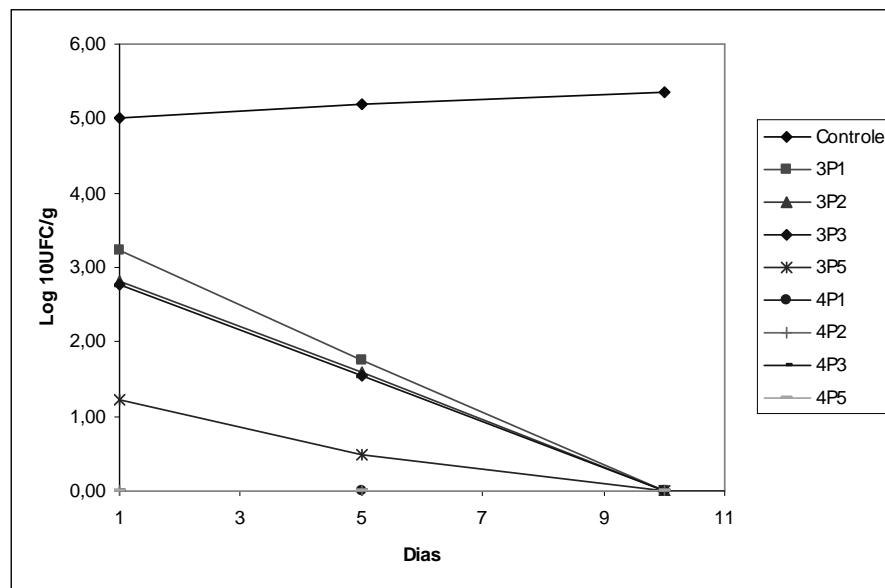
De acordo com relatos de Andrew e Martin (1979) um dos inconvenientes dos ágar não seletivos é que eles permitem a multiplicação de microrganismos normais e injuriados, levando assim a resultados contraditórios, pois não se pode diferenciar os agentes patogênicos alvo a partir de uma população mista, e para esses os meios devem ser suplementados com nutrientes específicos que permitam que as células injuriadas recuperem suas habilidades e se multipliquem.





**Figura 2.** Contagens da recuperação de *Salmonella* Enteritidis (log 10 UFC/g) inoculada em amostras de presunto de peru, em ágar TSA ao longo do 1, 5° e 10° dia de armazenamento a 7°C.

A seguir, a Figura 3 representa a recuperação, através da metodologia TAL e, neste caso, a recuperação das células injuriadas foi efetuada com maior desempenho quando comparado ao meio agar XLD (Figura 4).



**Figura 3.** Contagens da recuperação de *Salmonella* Enteritidis (log 10 UFC/g) inoculada em amostras de presunto de peru, em TAL ( *fina camada de ágar*) ao longo do 1, 5° e 10° dia de armazenamento a 7°C.

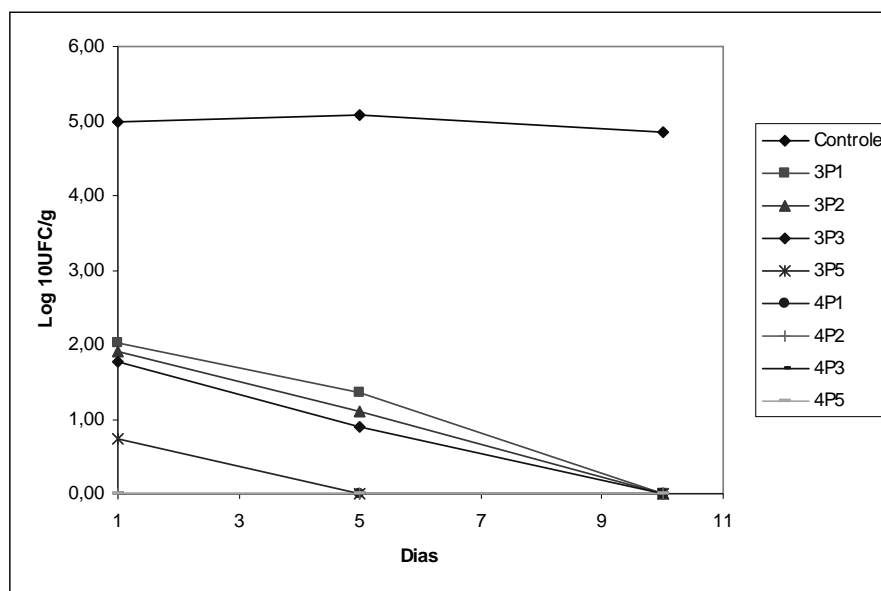
De acordo com Wu e Fung (2001); Wu et al. (2001 a, 2001b); Wu (2008), o meio não seletivo (TSA), em fina camada, não dificulta a morfologia típica das colônias produzidas pelos microrganismos patogênicos em questão, além de eliminar qualquer possibilidade de novas

lesões subletais pelo calor gerado pela adição do ágar fundido. Este método apresenta valor significativo na recuperação de células injuriadas por calor, frio e ácidos de *E. coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* e *Yersinia enterocolitica*.

Kang e Fung (1999) relataram a facilidade de reparação das células de *L. monocytogenes* injuriadas por calor pelo método TAL, quando comparadas com a utilização apenas do ágar TSA, método de sobreposição de ágar (por profundidade ou superfície) e a utilização de apenas um meio seletivo (ágar Oxford modificado-MOX), e puderam observar que a recuperação celular dos métodos TAL e de sobreposição obtiveram resultados semelhantes e superiores a utilização apenas do ágar seletivo (MOX).

Hajmeer et al. (2001) mostraram que o método TAL foi mais eficaz do que a inoculação no ágar MacConkey sorbitol NaCl na recuperação de *E. coli* O157: H7, e Chang et al. (2003) relataram que este método recuperou efetivamente as células injuriadas de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, e *Campylobacter coli* em carne de porco.

A seguir (Figura 4) está representado a recuperação do patógeno no meio seletivo XLD. Pode-se observar que a recuperação nesse meio foi menor do que o TAL e TSA, conforme anteriormente considerado. Quando comparados os meios seletivo XLD e TAL não foram observadas diferenças em relação à cor característica, mesmo após a adição da fina camada de ágar TSA, e a única diferença se mostrou na absorção do mesmo no momento do espalhamento em superfície, com o XLD apresentando maior facilidade de espalhamento e absorção quando comparado ao TAL.



**Figura 4.** Contagens da recuperação de *Salmonella* Enteritidis (log 10 UFC/g) inoculada em amostras de presunto de peru, em ágar XLD ao longo do 1, 5° e 10° dia de armazenamento a 7°C.

Em trabalho realizado por Yuste et al. (2004) com seis patógenos inoculados em solução tampão, o método serviu para avaliar a lesão ocasionada após tratamento com alta pressão. Para isso, foram utilizados os meios TSA, seletivo (XLD) e a metodologia TAL, e pode-se verificar que para as amostras relativas à *Salmonella* Typhimurium inoculada em água peptonada tamponada pH 7,4, pressurizada em 100, 200, 300 e 400 MPa, com tempos de 1 e 5 minutos, as

contagens reduziram de 4 para 1,2 e 2 log UFC/g em 200 e 300 MPa em 1 minuto, e nenhum cercamento foi detectado em pressões de 300 em 5 minutos e 400 MPa em 1 minuto. Relataram que, para a maioria das amostras tratadas, as contagens em TSA foram significativamente superiores ao XLD e TAL indicando a presença de células que sofreram lesão subletal e foram recuperadas.

Em estudos realizados por Ritz et al. (2006) na inativação de *Salmonella* Typhimurium, com concentração inicial de 8,2 log<sub>10</sub> UFC/g usando tratamentos de 300 e 400 MPa em solução salina com pH 7,0 armazenada a 20°C, demonstrou-se que houve recuperação e aumento da população microbiana de até 4,3 log<sub>10</sub> UFC/g. Verificaram, ainda, que o armazenamento a 4°C por 7 dias resultou em crescimento menor que 2,0 log<sub>10</sub> UFC/g, permanecendo com essa contagem até 20 dias, após o que verificou-se um declínio.

De acordo com Metrick et al.(1989) e Patterson et al.(1995), na maioria dos casos em que se utilizam solução tampão, os resultados com meios seletivos TSA e TAL não são significativamente diferentes, devido a ausência de efeito baroprotetor. Nesse caso, a solução tampão não protege o microrganismo, tornando-o mais sensível do que quando está no alimento, aumentando o nível de inativação e reduzindo o nível de lesões subletais.

A hipótese de que a presença de uma proporção maior de células lesadas são recuperadas mais facilmente pela metodologia TAL, quando comparado aos meios seletivos, foram relatados por Wu e Fung (2001); Wu et al.(2001), com base em contagens elevadas de patógenos feridos por ácidos e tratamento térmico. Yuste e Fung (2002, 2003); Yuste et al.(2002) relataram a recuperação de alevado número de patógenos a partir do tratamento térmico em leite e suco de maçã. Segundo Yuste et al. (2004), a metodologia TAL permite a diferenciação do microrganismo alvo presente no alimento o que não se consegue com meios não seletivos, como TSA, e essa consite na principal vantagem de se utilizar o TAL em alimentos processados pela alta pressão, para avaliação de injúrias ocasionadas em *Salmonella* Enteritidis.

#### 4. CONCLUSÃO

A recuperação de células injuriadas de *Salmonella* Enteritidis pela metodologia TAL foi mais eficiente ao ser comparada com a recuperação através de meio seletivo (XLD), mostrando que as células que foram recuperadas poderiam ter o mesmo comportamento no alimento em condições especiais e de desenvolver. A recuperação consiste em uma etapa importante na análise do alimento, pois dependendo da forma em que é realizada pode dar margem a resultados que não são reais, levando a um perigo potencial.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, G.P.; MARTIN, S.E. Catalase activity during recovery of heatstressed *Staphylococcus aureus* MF-31. **Applied and Environmental Microbiology**, v.38, n.3, p.390-394, 1979.

ANANTH, V.; DICKSON, J.S.; OLSON, D.G.; MURANO, E.A. Shelf-life extension, safety, and quality of fresh pork loin treated with high hydrostatic pressure. **Journal of Food Protection** v.61, p.1649-1656, 1998.

CHANG, V. P.; MILLS, E. W.; CUTTER, C. N. Comparison of recovery methods for freeze-injured *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Campylobacter coli* in cell

suspensions and associated with pork surfaces. **Journal of Food Protection**, v.66, n.5, p.798-803, 2003.

CHEFTEL, J.; CURIOLI, J. Effects of high pressure on meat: a review. **Meat Science**, p.46, n.3, p.211-236, 1997.

FIORETTO, F.; CRUZ, C.; LARGETEAU, A.; SARLI, T.A.; DEMAZEAU, G.; EL MOUEFFAK. Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis tryptic soy broth and caviar samples by high pressure processing. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.1259-1265, 2005.

HAJMEER, M.N.; FUNG, D.Y.C.; MARSDEN, J.L.; MILLIKEN, G.A. Effects of preparation method, age, and plating technique of thin agar layer media on recovery of *Escherichia coli* O157:H7 injured by sodium chloride. **Journal of Microbiological Methods**, v.47, n.2, p.249-253, 2001.

HOOVER, D.G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A.M.; FARKAS, D.F.; KNORR, D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganism. **Food Technology**, v.43, p.99-107, 1989.

HURST, A. **Revival of vegetative bacteria after sublethal heating**. In: H. E. ANDREW, H.E.; RUSSELL, D. (Ed). The revival of injured microbes. Academic Press. London, 1984, 77-103p.

KANG, D.H.; WONGLUMSOM, W.; FUNG, D.Y.C. Overlay method for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. **The Food Safety Consortium Annual Meeting**, p.263-272, 1998.

KANG, D.H.; FUNG, D.Y.C. Thin agar layer method for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.62, n.11, p.1346-1349, 1999.

\_\_\_\_\_. Application of thin agar layer method for recovery of injured *Salmonella Typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**, v.54, n.1, p.127-132, 2000.

MATHIAS, S. P. **Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial do presunto de peru submetido à tecnologia de alta pressão hidrostática**. 2008, 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.

METRICK, C.; HOOVER, D.G.; FARKAS, D.F. Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*. **Journal of Food Science**, v.54, p.1547-1564, 1989.

MORALES, P.; CALZADA, J.; ÁVILA, M.; NUÑEZ, M. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Ground Beef by Single-Cycle and Multiple-Cycle High Pressure Treatments. **Journal of Food Protection**, v.71, n.4, p.811-815, 2008.

PATTERSON, M.F.; QUINN, M.; SIMPSON, R.; GILMOUR, A. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatments in phosphate-buffered saline and foods. **Journal of Food Protection**, v.58, p.524-529,1995.

ROBERTS, T.A.; BAIRD-PARKER, A.C.; TOMPKIN, R. B. **Microorganisms in foods**. In: B.A. Professional (Ed), 1996, 126-140p.

RITZ, M.; PILET, M.F.; JUGIAU, F.; RAMA, F.; FEDERIGHI, M. Inactivation of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* using high-pressure treatments: destruction or sublethal stress. **Letters in Applied Microbiology**, v.42, p.357-362, 2006.

WESCHE, A. M.; GURTLER, J. B.; MARKS, S. P. RYSER, E. T. Stress, sublethal injury, resuscitation and virulence of bacterial foodborne. **Journal of Food Protection**, v.72, n.5, p.1121-1138, 2009.

WU, V.C.H.; FUNG, D.Y.C. Evaluation of thin agar layer method for recovery of heat-injured foodborne pathogens. **Journal of Food Science**, v.66, p.580-583, 2001.

WU, V.C.H.; FUNG, D.Y.C.; KANG, D.H.; THOMPSON, L.K. Evaluation of thin agar layer method for recovery of acidinjured foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, v.64, p.1067-1071, 2001.

WU, V. C. H.; FUNG, D. Y. C.; KANG, D. H. Evaluation of thin agar layer method for recovery of cold-injured foodborne pathogens. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v.9, n.1, p.11-25, 2001a.

WU, V. C. H.; FUNG, D. Y. C.; KANG, D. H.; THOMPSON, L. K. Evaluation of thin agar layer method for recovery of acid-injured foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 64, n.1, p.1067-1071, 2001b.

WU, V.C.H. A review of microbial injury and recovery methods in food. **Food Microbiology**, v. 25, p.735-744, 2008.

YUSTE, J.; FUNG, D.Y.C. Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A 49594 in apple juice supplemented with cinnamon. **Journal of Food Protection**, v.65, p.1663-1666, 2002.

YUSTE, J.; FUNG, D.Y.C.; THOMPSON, L.K.; CROZIER-DODSON, B.A. Combination of carbon dioxide and cinnamon to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. **Journal of Food Science**, v.67, p.3087-3090, 2002.

YUSTE, J.; FUNG, D.Y.C. Evaluation of *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* and *Staphylococcus aureus* counts in apple juice with cinnamon, by conventional media and thin agar layer method. **Food Microbiology**, v.20, p.365-370, 2003.

YUSTE, J.; CAPELLAS, M.; FUNG, D.Y.C.; MOR-MUR, M. Inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens by high pressure processing: Evaluation with conventional media and thin agar layer method. **Food Research International**, v.37, p.861-866, 2004.

#### 4. CONCLUSÃO GERAL

- ✓ O processo de alta pressão hidrostática de 400 MPa por 15 minutos em temperatura ambiente aumentou a validade comercial das amostras de presunto de peru pressurizado quando comparado às amostras controle;
- ✓ Em um primeiro estudo com as BAL e aplicação dos modelos matemáticos de Gompertz modificado e Baranyi para o ajuste das curvas de crescimento, pode-se observar que ao comparar as amostras de presunto de peru pressurizadas com as amostras controle armazenadas a 4°C o aumento da validade comercial foi de 35 dias, com 8°C foi de 40 dias e com 12°C foi de 6 dias;
- ✓ Para o segundo estudo das BAL em temperatura de 7°C o aumento foi de 56 dias e com 13°C o aumento foi de 21 dias;
- ✓ As colônias de bactérias ácido lácticas presentes no presunto de peru foram isoladas e identificadas como *Enterococcus sp* e *Streptococcus sp*;
- ✓ A colônia de *Enterococcus sp* foi capaz de produzir halo de inibição em maior proporção frente à *Salmonella* Enteritidis que aquelas de *Streptococcus sp* e as BAL procedentes de amostras controle originaram um maior halo de inibição quando comparadas com aquelas procedentes de amostras pressurizadas;
- ✓ Os resultados obtidos com a inativação de *Salmonella* Enteritidis mostraram que quanto maior o número de ciclos, maior é a inativação. O uso de ciclos múltiplos com 5 ciclos de 3 minutos, 3 ciclos de 5 minutos e 2 ciclos de 7,5 minutos em pressões de 300 MPa foi mais eficiente do que o ciclo contínuo com 15 minutos;
- ✓ A inativação em pressões de 400 MPa com ciclo contínuo ou múltiplo foram capazes de inativar completamente a *Salmonella* Enteritidis, sendo portanto uma pressão ideal e confiável para a preservação do produto;
- ✓ Os testes realizados para recuperação da *Salmonella* mostraram que a metodologia TAL ( *fina camada de ágar*) foi mais eficiente do que o meio seletivo ágar XLD na recuperação das células injuriadas pela alta pressão hidrostática, consistindo em um método mais eficaz e seguro para avaliar a quantidade de microrganismos alvo que podem sobreviver após à injúria devido às suas condições que não são inibitórias para os mesmos, propiciando um melhor desenvolvimento;
- ✓ O ágar TSA não consistiu em um método adequado para a recuperação da *Salmonella* Enteritidis, pois possibilitou o crescimento de outros microrganismos que não o microrganismo alvo, interferindo nos resultados;
- ✓ A tecnologia de alta pressão hidrostática mostrou-se um método bastante eficiente para a inativação de *Salmonella* Enteritidis em amostras de presunto de peru inoculadas, aumentando a segurança microbiológica e aumentou a validade comercial, sendo portanto um grande atrativo, principalmente para a indústria de produtos cárneos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ALEMÁN, G.D.; TING, E.Y.; MORDRE, S.C.; HAWES, A.C.O.; WALKER, M.; FARKAS, D.F.; TORRES, J.A. Pulsed ultra high pressure treatments for pasteurization of pineapple juice. **Journal of Food Science**, v.61, n.2, p.388-390, 1996.

ALMEIDA, R.C.C.; SCHNEIDER, I.S. Aspectos microbiológicos e químicos de produtos alimentícios elaborados com carnes moídas vendidas no varejo no município de Campinas. **Higiene Alimentar**, v.2, n.12, p.37-41, 1993.

ALPAS, D.; KALCHAYANAND, N.; BOZOGLU RAY, B. Intection of high hidrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p.33-42, 2000.

ANDERSON, R.C.; ZIPRIN, R.L. Bacteriology of *Salmonella*. In: HUI, Y.H.; PIERSON, M.D.; GORHAM, J.R. (Ed.) **Food Born Disease Handbook - Bacterial Pathogens**, 2ed. USA: Marcel Dekker, Inc. 2001, vol.1, 247-263p.

ANSTINE, T.T. High pressure processing for safe: Quality Foods. **Cereal Food World**, v.48, n.1, p.5-8, 2003.

ARCHER, D.L. Preservation microbiology and safety: evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, n.3, p.91-95, 1996.

ASHRAE. **Refrigeration Handbook**. Atlanta: American Society of Heating, Refrigerating and Air Conditioning Engineers, 1998, 667p.

AUDIA, J.P.; WEBB, C.C.; FOSTER, J.W. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v.291, p.97-106, 2001.

AVURE. **The Global Leader in HPP Food Processing**. Disponível: <http://www.avure.com/food/> . Acesso em 05 janeiro. 2009.

AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S., WRIGHT, A. (Ed.) **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 1993, cap.1, 63p.

BACK, A.; BELTRÃO, N. Monitoria e Controle de Salmonela: aspectos práticos. In: VII Simpósio Brasil Sul de Avicultura, 2006, Chapecó(SC). **Anais...Chapecó: Núcleo Oeste de Médicos Veterinários**, 2006. 95-103p.

BACK, A. Manejo sanitário de perus. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.322-327, 2007.

BARANYI, J.; ROBERTS, T.A.; MCCLURE, P. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. **Food Microbiology**, v.10, p.43-59, 1993.

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

\_\_\_\_\_. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, 199-218, 1995.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; RODRÍGUEZ, J.J. Update on non-thermal food processing technologies, irradiation and ultrasound. **Food Australia**, v.54, p.11, 2002.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; POTHAKAMURY, U.R.; PALOU, E. **Conservación no térmica de alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1999.

BARROW, P.A. *Salmonella* infections in poultry – problems and new thoughts on the possibilities of control. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.1, p.9-16, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.

BEIJERINK, M.W. Sur les ferments de lactique de l'industrie (Lactic acid bacteria of the industry.) **Arc Néerland des Sciences Extractes et Naturelles**. v.6, p.212-43, 1901.

BENNICK, M.H.; VANLOO, B.; BRASSEUR, R.; GORRIS, L.G.; SMID, E.J. A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1373, p.45-58, 1998.

BLASER, M. J.; NEWMAN, L. S. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. **Journal of Infections Diseases**, v.4, p.1096-1106, 1982.

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

BORSOI, A. **Ocorrência, contagem e resistência antimicrobiana de Salmonella isoladas de carcaças de frango resfriadas e pesquisa de Salmonella em galpões de frango de corte**. 2005, 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal Rio Grande do Sul, 2005.

BREDHOLT, S., NESBAKKEN, T., HOLCK, A. Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. **International Journal of Food Microbiology**, v.66, p.191-196, 2001.

BRENNER, D.J. Family I. *Enterobacteriaceae*. In: KREIG, N. R. & HOLT, J. G. (ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore: Williams and Wilkins, 1984, vol.1, p.408-420p.



BUCHANAN, R.L. Developing and distributing user friendly application software. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.12, p.251-255, 1993(a).

BURR, M.D.; JOSEPHSON, K.L.; PEPPER, I.L. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating Salmonella serotypes. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, n.1, p.24-30, 1998.

BUSTA, F.F. Practical implications of injured microorganisms in food. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, v.39, n.2, p.138-45, 1976.

BUTZ, P.; TAUSCHER, B. Emerging Technologies: chemical aspects. **Food Research International**, v.35, p.279-284, 2002.

BUZRUL, S.; ALPAS, H. LARGETEAU, A. Compression heating of selected pressure transmitting fluids and liquid foods during high hydrostatic pressure treatment. **Journal of Food Engineering**, v.85, p.466-472, 2007.

CALDERÓN-MIRANDA, M.L.; GONZÁLEZ, M.F.S.M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. SWANSON, E.G. Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: variables e inactivación microbiana. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v.1, p.3-11, 1998.

CAMPOS, F.P; DOUSUALDO, G.L.; CRISTIANINI, M. Utilização da tecnologia de alta pressão no processamento de alimentos. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v.6, n.2, p.351-357, 2003.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.50, n. 1-2, p.131-149, 1999.

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

CHEFTEL, J.C.; CURIOLI, J. Effects of high pressure on meat: a review. **Meat Science**, v.46, p.211-236, 1997.

CHEFTEL, J.C. Review: high-pressure, microbial inactivation and food preservation. **Food Science and Technology International**, v.1, p.75-90, 1995.

CHIAVARO, E.; BONARDI, S. Tecnologia ad alta pressioni e trattamento combinate pressione/temperatura. **Industrie Alimentari**, v. 38, n.384, p.921-925, 1999.

CINTAS, L.M.; CASAUS, P.; HAVARSTEIN, L.S.; HERNANDEZ, P.E.; NES, I.F. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel  $\text{sec}$ -dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.11, 4321-4330, 1997.

COLE, M.B. Opinion: predictive modeling. Yes it is! **Letters in Applied Microbiology**, v.13, p.218-219, 1991.

CORRADINI, M.G., PELEG, M. Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experimental. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, n.1, p.187-200, 2005.

CORRY, J.E.L.; CURTIS, G.D.W.; BAIRD, R.M. **Handbook of culture media for food microbiology**. 2ed. Hardbound: Elsevier, 2003, 662 p.

COTTER, P.C.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews**, v.3, p.777-788, 2005.

COSTA, M.C.; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A. Revisão: Tecnologias não convencionais e o impacto no comportamento do consumidor. **Boletim do CEPPA**, v.17, n.2, p.187-210, 1999.

CREMER, M.L.; CHIPLEY, J.R. Microbiological problems in the food service industry. **Food Technology**, v.34, p.59-68, 1980.

CUNHA, M.L.R.S.; NERVINO, C.V.; HIROOKA, E.Y. Parâmetros causadores de injúria celular em estafilococos, com ênfase a microrganismos competidores. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.19, n.2, p.167-182, 1998.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p.405-428, 1999.

DAVEY, K. R.; DAUGHTRY, B. J. Validation of a model for predicting the combined effect of three environmental factors on both exponential and lag phases of bacterial growth: temperature, salt concentration and pH. **Food Research International**, v.28, p.233-237, 1994.

DELLAGLIO, H.; ROISSART, H.; TORRIANI, S.; CURK, M.C.; JANSSENS, D. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: ROISSART, H., LUQUET, F.M. **Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques**. Paris: Loriga, 1994. v.1, 25-139p.

DELIZA, R.; ROSENTHAL, A.; ABADIO, F.B.D., SILVA, C.H.O., CASTILLO, C. Application of high pressure technology in the fruit juice processing: benefits perceived by consumers. **Journal of Food Engineering**, v.67, p.241-246, 2005.

DE MARTINS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G.M. Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias ácido lácticas e suas bacteriocinas para garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.29, p.114-119, 2003a.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Microbiology, Genetics and Application. London: Chapman & Hall, p.1-12, 1994.

DOGMAN, C.; ERKMEN, O. Ultra high hydrostatic pressure inactivation of *Escherichia coli* in milk, an orange and peach juice. **Food Science and Technology International**, v.9, n.6, p.403-405, 2003.

\_\_\_\_\_. High pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation in broth, milk, peach and orange juice. **Journal of Food Engineering**, v.62, p.47-52, 2004.

DONSÍ, G.; FERRARI, G.; DI MATTEO, M. High Pressure Stabilization of Orange Juice: Evaluation of the Effects of Process Conditions. **Italian Food & Beverage Technology**, v.8, p.10-14, 1996.

DONSÍ, G.; FERRARI, G.; MARESCA, P. Pulsed high pressure treatment for the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of process parameters. **Journal of Food Engineering**, v.78, p.984-990, 2007.

DOYLE, E.M.; MAZZOTTA, A.S. Review of studies on the thermal resistance of *Salmonella*. **Journal of Food Protection**, v.63, p.779-795, 2000.

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

EGAN, A.F. Lactic acid bacteria of meat and meat products. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.49, p.327-336, 1983.

EWING, W.H. **Edward's and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**. 4ed. New York: Elsevier Science Publishing Co., 1986.

ERKMEN, O.; ALBEN, E. Mathematical and modeling of citric acid production and biomass formation by *Aspergillus niger* in undersized semolina. **Journal of Food Engineering**, v.52, p.161-166, 2002.

ESPUÑA, 2009. **Producción/ Alta Presión**. Disponível: <http://www.espuna.es/esp/home.htm>. Acesso em 10 junho. 2009.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies**. High Pressure Processing. U. S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000.

FAO, 2001. **Technical Elements of New and Emerging. Non-Thermal Food Technologies**. Disponível em: [http://www.fao.org/ag/ags/agsi/Nonthermal/nonthermal\\_1.htm#](http://www.fao.org/ag/ags/agsi/Nonthermal/nonthermal_1.htm#). Acesso em 02 junho 2010.

FARBER, J.M. Predictive modeling of food deterioration and safety. In: PIERSON, M.D.; STERN, N.J. **Foodborne microorganisms and their toxins**, p.57-90, 1986.

FARKAS, D.F.; HOOVER, D.G. High pressure processing. **Journal of Food Science**, Chicago, suplement, p.47-64, 2000.

FEHLHABER, K.; JANETSCHKE, P. **Higiene Veterinária de los alimentos**. Zaragoza: Acribia S.A, 1995.

FERREIRA, C.L.L.F. Grupo de bactérias lácticas - caracterização tecnológica e aplicação de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C.L.L.F. ed. **Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa, 2003, cap.1, 7-33p.

FLORES, M.L. **Avaliação da técnica da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Salmonella sp* em ovos de galinha artificialmente contaminados, em ovos comerciais do tipo colonial e em alimentos a base de ovos, envolvidos em surtos de infecções alimentares**. 2001Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

FOEGEDING, P.M. Driving predictive modeling on a risk assessment path for enhanced food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.36, p.87-95, 1997.

FOLQUE-MORENO, M.R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSACALIDOU, E., DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.24, 2006.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**, Porto Alegre: Artmed, 2002.

\_\_\_\_\_. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. São Paulo: Artmed, 2000.

FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. (Ed) São Paulo: Atheneu. 2003, cap.4, 55-60p.

FRANZ, C.M.A.P.; SCHLEIFER, K.H.; HOLZAPFEL, W.H. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE900 from black olives. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p.255-270, 1996.

FRANZ, C.M.A.P.; STILES, M.E.; SCHLEIFER, K.H.; HOLZAPFEL, W.H. *Enterococci* in foods - a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.105-122, 2003.

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

GALIA, W.; PERRIN, C.; GENAY, M.; DARY, A. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. **International Dairy Journal**, v.19, p. 89-95, 2009.

GARCIA-GRAELLS, C.; MASSEHALEK, B.; MICHIELS, C.W. Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high-pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1248-1254, 1999.

GARRIGA, M.; GREBOL, M.T.; AYMERICH, J.M. et al. Microbial inactivation after high-pressure processing at 600MPa in commercial meat products over its shelf-life. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.5, p.451-457, 2004.

GRANT, S.; PATTERSON, M.; LEDWARD, D. Food processing gets freshly squeezed. **Chemistry & Industry**, n.2, p.55-58, 2000.

GAST, R. K. *Salmonella* Infections. In: SAIF, Y. M. et al. **Diseases of Poultry**, 11ed. Iowa State University Press, 2003, cap.16, p.567-599.

GEORGE, S.; RICHARDSON, L.C.C.; PECK, M.W. Predictive models of the effect of temperature, pH and acetic and lactic acids on the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.32, p.73-90, 1996.

GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; CONDON, S.; SWINGS, J.; COGAN, T.M. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.177-188, 2001.

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

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **Journal of Food Protection**, v.60, p.732-738, 1997.

GIRAFFA, G.; Enterococci in food. **FEMAS Microbiology Reviews**, v.26, p.163-171, 2002.  
\_\_\_\_\_. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.215-222, 2003.

GODFREE, A.F.; KAY, D.; WYER, M.D. Faecal streptococci as indicators of faecal contamination in water. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, v.83, p.110S-119S, 1997.

GOLDBLITH, S.A.; JOSLYN, M.A.; NICKERSON, J.T.R. An introduction to thermal processing of foods. Vol. 1, Westport: AVI, 1961. 1128p. Apud: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology - fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, p.728-739, 1997.

GORMAN, R.; BLOONFIELD, S.; ADLEY, C.C. A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic Kitchen in the Republic of Ireland. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.143-150, 2002.

GOULD, G.W. Emerging technologies in food preservation and processing in the last 40 years. In: Barbosa-Cànovas, G.; Gould, G.W. **Food Preservation Technology Series Innovations in Food Processing**. USA: Lancaster, 2000. Cap.1, p.1-11.

HARDIE, J.M.; WHILEY, R.A. The genus *Streptococcus*. In: *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Ed. WOOD, B.J.D.; HOLZ, W.H. vol.2, 1995, 55-124p.

\_\_\_\_\_. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology - Symposium Supplement**, v.83, p.1S-11S, 1997.

HARTMAN, P.A.; DEIBEL, R.H.; SIEVERDING, L.M. Enterococci. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. (Ed). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination in Foods**. 3rd. Washington DC: APHA – American Public Health Association, 1992, Cap.32, 523-531.

HARTSELL, S. E. The longevity and behavior of pathogenic bacteria in frozen food: the influence of plating media. **American Journal of Public Health**, v.41, n.9, p.1072–1077, 1951.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Starter cultures and their use. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**, 2ed. New York: Marcel Decker, 2001.

HAYERT, M.; PERRIER-CORNET, J-M.; GERVAIS, P. A simple method for measuring the pH of acid solutions under high pressure. **Journal of Physical Chemistry**, v.103, p.640-645, 1999.

HAYASHI, R. Application of high pressure to food processing and preservation: philosophy and development. **In: Engineering and Food**. (W.E.L. Spiess and H. Schubert(ed). London: Elsevier Applied Science, 1989, v.2, 815p.

HAUBEN, K.J.A.; BENAERTS, K.; MICHIELS, C.W. Protective effect of calcium on inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.678-684, 1998.

HEYNDRICKX, M.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. Recent changes in *Salmonella* nomenclature: the need for clarification. **Veterinary Journal**, v.170, p.275-277, 2005.

HENDRICKX, M.; LUDIKHUYZE, L.; VAN DEN BROECK, I.; WEEMAES, C. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, p.97-203, 1998.

HEREMANS, K. 1995. High pressure effects on biomolecules. **In: High Pressure Processing of Foods**. LEDWARD, D.A.; JOHNSTON, D.E.; EARNSHAW, R.G.; HASTING, A.P.M. (ed). Nottingham University Press: Nottingham, England, 1995, 81-97p.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. Gram positive cocci. In: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. HOLT, J.C.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H et al. 9ed, Williams & Wilkins: Baltimore, 1994, 527p.

HOLZAPFEL, H.W.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.365S-373S, 2001.

HORROX, N.E. *Salmonella* - a practical overview. **International Hatchery Practice**, v.12, n.2, p.15-17, 1997.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; MONFORT, J.M. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. **Meat Science**, v.62, p.359-371, 2002.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v.49, p.S139-S150, 1998.

HUMPHREY, T. J.; SLATER, E.; McALPINE, K.; ROWBURY, R.J.; GILBERT, R.J. *Salmonella Enteritidis* Phage Type 4 isolates more tolerant of heat, acid or hydrogen peroxide also survive longer on surfaces. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, n.8, p.3161-3164, 1995.

HUMPHREY, T. J. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Science and Society**, v.2, n.6, p.504-509, 2004.

IGARASHI, M.; LIYAMA, Y.; KATO, R.; TOMITA, M.; ASAMI, M.; EZAWA, I. Effect of *Bifidobacterium longum* and lactulose on the strenght of bone in ovariectomized osteoporosis model rats. **Bifidus**, v.7, p.139-147, 1994.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 6ed. Maryland: Aspen, 2000.

\_\_\_\_\_. **Microbiologia de Alimentos**. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 712p.

JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. 7ed. New York : Springer, 2005. 790 p.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia Médica**. 18ed Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1991, 519p.

JONES, D. **Compostion and differantiation of the genus Streptococcus**. In: SKINNER, F.A.; QUESNEL, L.B. Streptococci. Academic Press, p.49, 1978.

JORDAN, S.L.; PASCUAL, C.; BRACEY, E.; MACKAY, B.M. Inactivation and injury of pressure-resistant strains of *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.463-469, 2001.

JOSEPH, B.; OTTA, K.K.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella sp.* On food contact and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, p.367-372, 2001.

KALCHAYANAND, N.; SIKES, A.; DUNNE, C.P. ; RAY, B. Factors influencing death and injury off foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. **Food Microbiology**, v.15, p. 207-214, 1998.

KLAEHAMMER, T. Bacteriocins of acid lactic bacteria. **Biochime**, v.70, p.337-349, 1988.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastric intestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.1-9, 2003.

KICH, J.D.; CARDOSO, M. **Salmonella em suínos: segurança alimentar e situação no sul do Brasil. Embrapa – suínos e aves.** 2004. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/?artigos/2004/artigo-2004-n022.html>. Acesso em 26 junho. 2010.

KIM, H.S.; GILLILAND, S. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. **Journal of Dairy Science**, v.66, p.959-966, 1983.

KNORR, D. Effects of high hydrostatic pressure processes on food safety and quality. **Food Technology**, v.47, n.6, p.156-161, 1993.

KREBBS, B.; MATSER, A.M.; HOOGERWERF, S.W.; MOEZELAAR, R.; TOMASSEN, M.M.M.; BERG, R.W. Combined high-pressure and thermal treatments for processing of tomato puree: evaluation of microbial inactivation and quality parameters. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.4, p.377-385, 2003.

KÜHN, I. Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to antibiotic resistance strain, in animals, humans and the environment. Exemple of an ongoing project within the European reseach programme. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, p.337-342, 2000.

LABUZA, T.P.; FU, B. Growth kinetics for shelf-life prediction: theory and practice. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, p.309-323, 1993.

LACONHA, I.; BAGGESEN, D.L.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 1, 4, 6 and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. **Veterinary Microbiology**, v.75, p.155-165, 2000.

LEITÃO, M.F.F. Microbiologia de Alimentos. In: ROIMAN, L.R.; TRAVASSOS, J.L, AZEVEDO. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Manole, 1988, 30-75p.

\_\_\_\_\_. A injúria microbiana e sua importância na avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos. **Boletim do ITAL**, Campinas, v.22, n.4, p.397-416, 1985.

LEYER, G.J.; JOHNSON, E.A. Acid adaptation induces cross protection again environment stresses in *Salmonella* Typhimurium. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, p.1842-1847, 1993.

LINTON, M.; MCCLEMENTS, J.M.J.; PATTERSON, M.S. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during storage of pressure-treated orange juice. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1038-1040, 1999.



LOPALCO, P.L.; GERMINARIO, C.; DI MARTINO, V.; FRISOLI, L.; PAGANO, A.; QUARTO, M.; BARBUTI, S. Epidemiologic study and coast analysis o fan *Salmonella* Enteritidis epidemic. **Ann Ig**, v.12, n.4, p.279-285, 2000.

MACKEY, B.M. Injured bacteria. In: LUND, A.M.; BAIRD-PARKER, T.C.; GOULD, G.W. **The microbiological safety and quality of food**, v.1. New York: Springer, 2000. cap.15, p.315-354.

MANAS, P.; PAGAN, R. Review: microbial inactivation by new technologies of food preservation. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, 1387-1399, 2005.

MARTEAU, P.; FLOURIÉ, B.; POCHART, P, CHASTANG, C.; DESJEUX, J.F.; RAMBAUD, J.C. Role of the microbial lactase (EC 3.2.123) activity from yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase deficient humans. **Journal of Nutrition**. v.64, p.71, 1990a.

MASSON, Y.; AINSWORTH, P.; FULLER, D.; BOZURT, H. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in homogenized mushrooms under modified atmosphere. **Journal of Food Engineering**, v.54, p.125-131, 2002.

MATHIAS, S. P. **Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial do presunto de peru submetido à tecnologia de alta pressão hidrostática**. 2008, 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.

MEYER, R.S.; COOPER, K.L.; KNORR, D. et al. High pressure sterilization of foods. **Food Technology**, v.54, n.11, p.67-72, 2000.

MERTENS, B. Hydrostatic pressure treatment off food: equipment and processing. In: GOULD, GW. ed.. **New methods off food preservation**. Glasgow: Chapman & Hall, 1995, 135-158p.

MERTENS, B.; DEPLACE, G. Engineering aspects of high-pressure technology in the food industry. **Food Technology**, v.47, n.6, p.164-169, 1993.

McCLURE, P. J.; BLACKBURN, C.W.; COLE, M.B.; CURTIS, P.S.; JONE, J.E.; LEGAN, J.D.; OGDEN, I.D.; PECK, M.W.; ROBERTS, P.A.; SUTHERLAND, J.P.; WALKER, S.J. Modelling he growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.265-275, 1994.

McCLURE, P. J.; BEAUMONT, A.L.; SUTHERLAND, J.P.; ROBERTS, T.A. Predictive modelling of growth of *Listeria monocytogenes*. The ejects on growth of NaCl, pH, storage temperature and NaNO<sub>2</sub>. **International Journal of Food Microbiology**, v.34, p.221-232, 1997.

McMEEKIN, T.A.; ROSS, T. Shelf life prediction: status and future possibilities. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, p.65-83, 1996.

\_\_\_\_\_. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.133-153, 2002.

- McMEEKIN, T.A.; OLLEY, J.N.; OLLEY, J.; ROSS, T.; RATKOWSKY, A. 5ed. **Predictive microbiology: theory and application**. Taunton: Research Studies, 1993, 1-86p.
- MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; BALDINI, V. L. S.; LEITÃO, M. F. F. Characterization of bacteriocinas produced by *Lactococcus lactis* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.3, p.183-191, 2000.
- O'SULLIVAN, L.; ROSS, R. P.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v.84, p.593-604, 2002.
- PAGAN, R.; MACKEY, B. Relationship between membrane damage and death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential and stationary phase cells and variation among strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66. n.7, p.2829-2834, 2000.
- PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; WELTI-CHANES, J.; SWANSON, B.G. Combined effect of high hydrostatic pressure and water activity on *Zygosaccharomyces bailii* inhibition. **Letters in Applied Microbiology**, v.24, p.417-420, 1997.
- PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; WELTI-CHANES, J.; DAVIDSON, P.M.; SWANSON, B.G. Effect of oscillatory high hydrostatic pressure treatments on *B. nivea* ascospores suspended in fruit juices concentrates. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.375-378, 1998c.
- PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CANOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. High-pressure treatment in food preservation. In: RAHMAN, M. S. (Org.) **Handbook of Food Preservation**. New York: Marcel Dekker, 1999, 533-576p.
- PALUMBO, S. A. Injury in emerging foodborne pathogens and their detection. **In: RAY, B.** Injured index and pathogenic bacteria: occurrence and detection in food, water and feeds. Boca Raton: CRC Press, cap. 4, p.115–132, 1989.
- PARISH, M.E. High pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, endogenous microflora an pectinmethylesterase in orange juice. **Journal of Food Safety**, v.18, n.1, p.57-65, 1998.
- PATTERSON, M.F.; QUINN, M.; SIMPSON, R. et al. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate buffered saline and foods. **Journal of Protection**, v.58, n.5, p.524-529, 1995.
- PATTERSON, M.F. A Review: Microbiology of pressure-treated foods. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1400-1409, 2005.
- PELEG, M.; CORRADINI, M.G.; NORMAND, M.D. The logistic (Verhulst) model for sigmoid microbial growth curves revisited. **Food Research International**, v.40, p.808–818, 2007.
- POOPE, C. Salmonellosis in poultry and people. **Supplement of World Poultry – Misset**, p.13-14, 1996.

- POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. **Antigenic formulas of the Salmonella serovars**. 7. rev. Paris: Institut Pasteur, 1997.
- POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F.W. Supplement 1998 (42) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v.151, n.1, p.63-65, 2000.
- POT, B.; LUDWING, W.; KERSTERS, K.; SCHLEIFER, K.-H. Taxonomy of lactic acid bacteria. In: DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. ed. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Microbiology, Genetics and Applications**. Chapman & Hall: London, UK, 1994, 13-90p.
- QUADROS, D.A.F. **Avaliação da bacteriocina P34 no crescimento de *Listeria monocytogenes* em lingüiça frescal de frango**. 2007. f.66. (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do sul, 2007.
- RASO, J.; BARBOSA-CANOVAS, G.V. Non-thermal preservation of foods using combined processing techniques. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.43, n., p.265–285, 2003.
- RAY, B. Methods to detect stressed microorganisms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.42, p.346–355, 1979.
- \_\_\_\_\_. Introduction. In: RAY, B. **Injured index and pathogenic bacteria: occurrence and detection in food, water and feeds**. Boca Raton: CRC Press, cap.1, p.1–8, 1989.
- RAY, B.; ADAMS, D.M. Repair and detection of injured microorganisms. In: SPECK, L.M. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 2ed. Washington: American Public Health Association, 1984, 112–123p.
- RATKOWSKY, D.A. Principles of nonlinear regression modelling. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.12, p.195-199, 1993 (b).
- REUTER, G. Composition of the microflora of human small intestine and the behaviour of some microorganisms after oral intake. Proc. 1<sup>st</sup> Intersectional Congr. of Intern. Assoc. of Microb. Soc., Tokyo, ed. By Hasegawa, T.: **Science Council of Japan** 2: 327-339p, 1975.
- RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos**. 2ed. São Paulo: Atheneu, 1992.
- RILEY, M.; WERTZ, J. Bacteriocins: evolution, ecology and application. **Annual Review of Microbiology**, v.56, p.117-137, 2002.
- ROBAZZA, W.S.; TELEKEN, J.T.; GOMES, G.A. Modelagem matemática do crescimento de microrganismos em alimentos. **Tendências em Matemática Aplicada e Computacional (TEMA)**, v.11, n.1, p.101-110, 2010.
- ROSENTHAL, A.; SILVA, J.L. Alimentos sob pressão. **Engenharia de alimentos**, v.14, p.37-39, 1997.

ROOS, R. **USDA says *Salmonella* in meat and poultry is declining; further control steps planned.** Disponível em: [www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/fs/fod-disease/news](http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/fs/fod-disease/news) Acesso em: 12 de julho de 2010.

ROSS, T.; McMEEKIN, T.A. Predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.241-264, 1994.

ROUSE, S.; HARNETT, D.; VAUGHAN, A. et al. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.915-923, 2007.

RUSSELL, A. D. Potential sites of damage in microorganisms exposed to chemical or physical agents. In: ANDREW, M. H. E; RUSSELL, A. D. **The revival of injured microbes**. London: Academic Press, 1984. p.1-18.

SÁ, I.V.A.; DE SOLARI, C.A. *Salmonella* in Brazilian and imported pet reptiles. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.293-297, 2001.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. (Ed.) **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Decker, 1993. 442p.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. **Food Microbiology**, v. 17, p. 327-340, 2000.

SAN MARTÍN, M.F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Food processing by high hydrostatic pressure. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.42 , n.6, p.627-645, 2002.

SANGRONIS, E.; POTHAKAMURY, U.; RAMOS, A.M.; IBRAZ, A.; BARBOSA, G.V. La alta presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento no térmico de alimentos. **Alimentaria**, v.33, p.33-43, 1997.

SARANTINOPOULOS, P.; LEROY, F.; LEONTOPOULOU, E.; GEORGALAKI, M.D.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, p.125-136, 2002.

SCHAFFNER, D.W.; LABUZA, T.P. Predictive microbiology: where are we and where are we going. **Food Technology**, v.51, p.95-99, 1997.

SHELOBOLINA, E.S.; SULLIVAN, S.A.; O'NEILL, K.R.; NEVIN, K.P.; LOVLEY, D.R. Isolation, characterization, and U (VI) reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate - and U (VI) - contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella* subterranean sp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.5, p.2959-2965, 2004.

SHERMAN, J.M. The streptococci. **Bacteriology Reviews**, v.1, n.1, p.3-97, 1937.

- SHINTANI, H. Importance of considering injured microorganisms in sterilization validation. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.11, n.3, p. 91–106, 2006.
- SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F.K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1901-1906, 1989.
- SILVA, M.C.D.; RAMALHO, L.S.; FIGUEIREDO, E.T. *Salmonella sp* em ovos e carcaças de frango in natura comercializadas em Maceió, AL. **Higiene Alimentar**, v.18, n.1221, p.84-84, 2004.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. **Manual Técnico**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, n.14, 1995.
- SIMPSON, R.K.; GILMOUR, A. The effects of high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* in phosphate buffered saline and models food systems. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p.181-188, 1997.
- SKINNER, G.E., LARKIN, J.W., RHODEHAMEL, E.J. Mathematical modelling of microbial growth: a review. **Journal of Food Safety**, v.14, p.175-217, 1994.
- SLONGO, A.P. **Uso de Alta Pressão Hidrostática em Presunto Fatiado: Avaliação Físico-Química e Sensorial e Modelagem do Crescimento Microbiano**. 2008, 163f, Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, 2008.
- SMELT, J.P.P.M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, p.152-158, 1998.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELOS, D.; MORES, N. **Clínica e Patologia Suína**. Goiânia: Art.3, 1999, 464p.
- SPIILIMBERGO, S.; ELVASSORE, N.; BERTUCCO, A. Microbial inactivation by high-pressure. **Journal of Supercritical Fluids**, v.22 (1), p.55–63, 2002.
- STILES, M.E.; HOLTZAPFEL, W.H. Review article. Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v.36, p.1-29, 1997.
- SUTHERLAND, J.P.; BAYLISS, A.J. Predictive modeling of growth of *Yersinia enterocolitica*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. **International Journal of Food Microbiology**, v.21, p.197-215, 1994.
- SUTHERLAND, J.P.; BAYLISS, A.J.; BRAXTON, D.S.; BEAUMONT, A.L. Predictive modelling of *Escherichia coli* O157:H7: Inclusion of carbon di-oxide as a fourth factor in a pre-existing model. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p.113-120, 1997.
- TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v.40, n.3, p.722-756, 1976.

TAKAHASHI, K.; ISHII, H.; ISHIKAWA, H. Sterilization of microorganisms by hydrostatic pressure at low temperature. In: HIGH PRESSURE SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY, 1992, Paris. **Proceedings...** Paris: Jonh Libbey Eurotext , 1992. p.303.

TERRA, N. N. Fermentação como fator de segurança e qualidade para o consumidor. **Revista Nacional da Carne**, n.239, p.26-32, 1997.

TEUBER, M. The genus *Lactococcus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995, v.2.

THIERCELIN, M. E. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. **C.R. Seances Societe Biologie**, v.5, p.269-271, 1899.

TORRES, J.A.; VELAZQUEZ, G. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of food. **Journal of Food Engineering**, v.67, p.95-112, 2005.

TORTORA, G.J. ; FUNKE, B.R. ; CASE, C.L. **Introducion a la Microbiologia**. 3ed, Zaragoza : Acribia, 1993, 792p.

TRUJILLO, A.J.; FERRAGUT, V.; GERVILLA, R.; CAPELLAS, M.; GUAMIS, B. High hydrostatic pressure affects milk and milk products, recent research developments. **Agriculture and Food Chemistry**, v.1, p.137-159, 1997.

TOSUN, H.; GÖNÜL, S.A. Acid adaptation protects *Salmonella* Typhymurium from environmental stresses. **Turkish Journal of Biology**, v.27, p.31-36, 2003.

VAM-IMPE, J.F. ; BART M, N. ; TOON, M. ; JOSSE DE, B. ; JOSS, V. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2901-2909, 1992.

VANBOGELEN, R. A.; NEIDHARDT, F. C. Ribossomos as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, p.5589-5593, 1990.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v.96, p.149-164, 2004.

WEGENER, H.C.; BAGER, F. Pork as a source of human salmonellosis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 2.1997. Copenhagen. **Proceedings...**Copenhagen:[s.n], 1997, 3 8p.

WESCHE, A.M.; GURTLER, J.B.; MARKS, S.P.; RYSER, E.T. Stress, sublethal injury, resuscitation and virulence of bacterial foodborne. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.72, n.5, p.1121-1138, 2009.

- WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. Predictive Modeling. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology - fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, 1997, 728-739p.
- WHITING, R.C. Microbial modelling in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, p.467-494, 1995.
- WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. A classification of models for predictive microbiology. **Food Microbiology**, v.10, p.175-177, 1993.
- WILCOCK B.P.; SCHWARTZ K.J. Salmonellosis. In: LEMAN, A.D.; STRAW B.E.; MENGELING W.L.; D'ALLAIRE S.; TAYLOR D.J. **Diseases of Swine**. 7ed. Iowa State University, Ames, USA, 1993, 570-538p.
- WILLIAMS, A. New Technologies in Food Preservation and Processing: Part II. **Nutrition & Food Science**, v.1, p.20-23, 1994.
- WINSOR, C.P. The Gompertz curve as a growth curve. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.18, n.1, p.01-08, 1931.
- WU, V.C.H. A review of microbial injury and recovery methods in food. **Food Microbiology**, London, v.25, p.735– 744, 2008.
- WU, V.C.H.; FUNG, D.Y.C.; KANG, D.H. Evaluation of thin agar layer method for recovery of cold-injured foodborne pathogens. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, Trumbull, v.9, n.1, p.11–25, 2001a.
- WU, V.C.H.; FUNG, D.Y.C.; KANG, D.H.; THOMPSON, L.K. Evaluation of thin agar layer method for recovery of acid-injured foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.64, n.1, 1067–1071, 2001b.
- YALDAGARD, M.; MORTAZAVI, S.A.; TABATABAIE, F. The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects. **African Journal of Biotechnology**, v.7, p.16, p.2739-2767, 2008.
- ZHAO, T.; DOYLE, M. P. Evaluation of universal preenrichment broth for growth of heat-injured pathogens. **Journal of Food Protection**, v.64, p.1751-1755, 2001.
- ZIMMERMAN, F.; BERGMAN, C. Isostatic high-pressure equipment for food preservation. **Food Technology**, v.47, p.162-163, 1993.
- ZWIETERING, M.H.; WIT, J.C.; NOTERMANS, S. Applications of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurized milk at the point of consumption. **International Journal of Food Microbiology**, v.30, p.55-70, 1996.

ZWIETERING, M.H.; KOOS, J.T.; HASENACK, WITT, J.C.; VAN T RIET, K. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.4, p.1094-1101, 1991.

ZWIETERING, M.H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F.M.; VAN T RIET, K. Modeling of bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.6, p.1875-1881, 1990.



## ANEXOS

- Anexo A - Processamento do presunto de peru (todos os capítulos).
- Anexo B - Processamento do presunto de peru (todos os capítulos).
- Anexo C - Processamento a alta pressão hidrostática (capítulos I, II e III).
- Anexo D - Isolamento, identificação e plaqueamento de BAL (capítulos I, II e III).
- Anexo E - Testes bioquímicos e inibição direta de BAL (capítulo III).
- Anexo F - Preparo do inóculo de *Salmonella* Enteritidis (capítulos IV e V).
- Anexo G - Inoculação de *Salmonella* Enteritidis (capítulo V).
- Anexo H - *Salmonella* Enteritidis – meios de cultura (capítulo V).
- Anexo I - *Salmonella* Enteritidis – meios de cultura (capítulo V).
- Anexo J - Formulação do presunto de peru (MATHIAS, 2008).
- Anexo L - Composição dos meios de cultura usados para isolamento de BAL (ágar MRS e M-17).

**Anexo A - Processamento do presunto de peru (todos os Capítulos).**



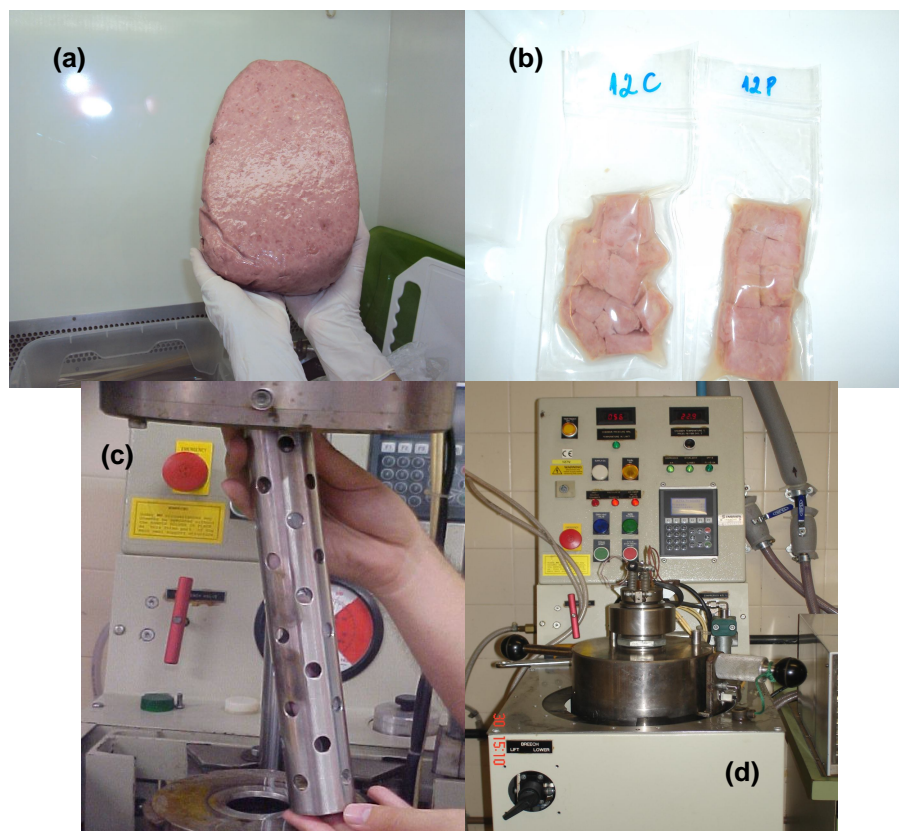
**Figura 1.** (a) e (b). Toaleta da coxa de peru, (c) carne de peru e condimentos e (d) condimentos - Preparo no laboratório da planta piloto I. (Fonte: autora).

**Anexo B - Processamento do presunto de peru (todos os Capítulos).**



**Figura 2.** (a) e (b) “Cutter” com a carne de peru em pedaços e salmoura (c) Autoclave para cozimento e formas de aço inox em banho de gelo e (d) presunto de peru – Processamento na planta piloto II. (Fonte: autora).

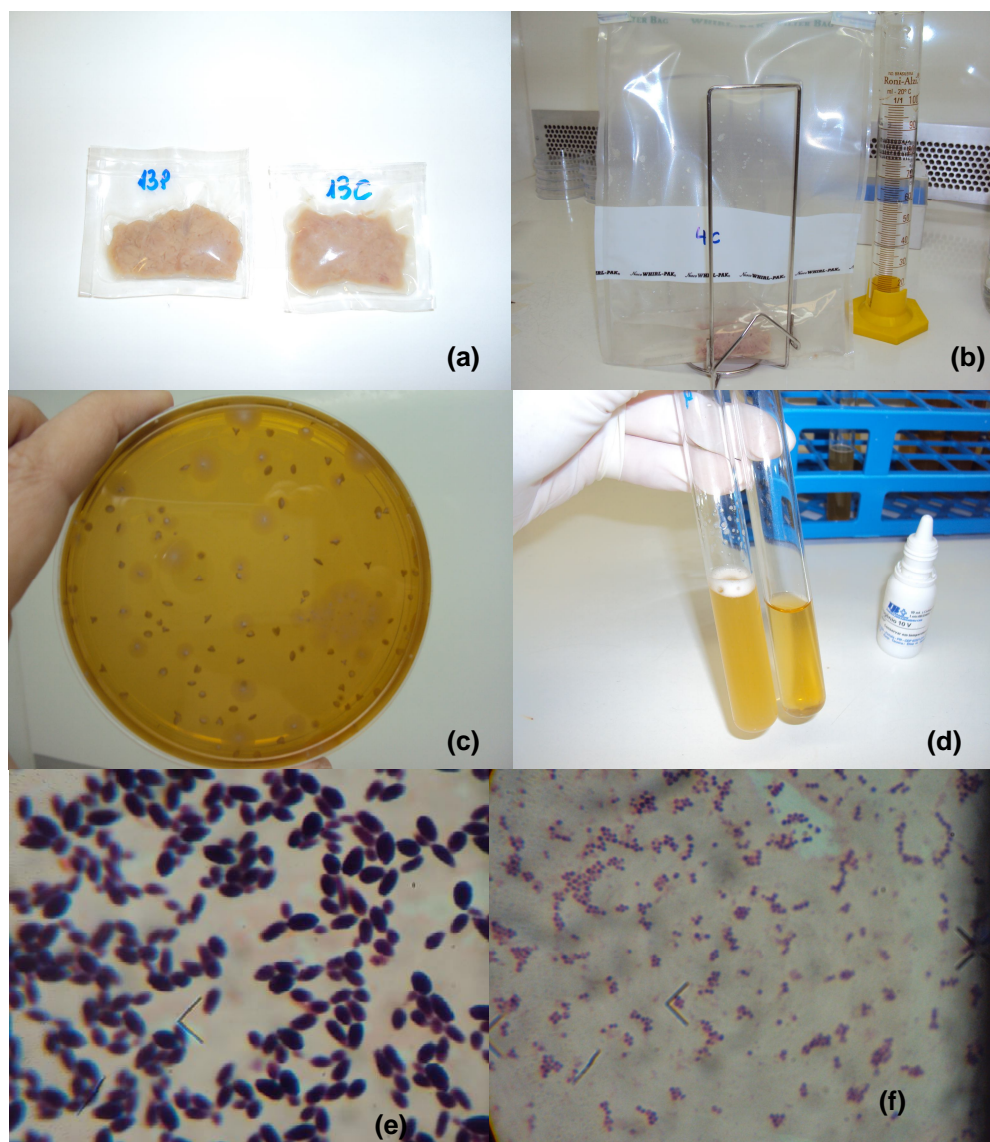
**Anexo C - Processamento a alta pressão hidrostática (Capítulos I, II e III).**



**Figura 3.** (a) Presunto de peru em câmara fluxo, (b) amostras de presunto embaladas a vácuo – laboratório da planta piloto IV (c) cilindro pressurizador com amostras e (d) Equipamento APH (*Stansted Fluid Power*) – Processo de APH na planta piloto II. (Fonte: autora).

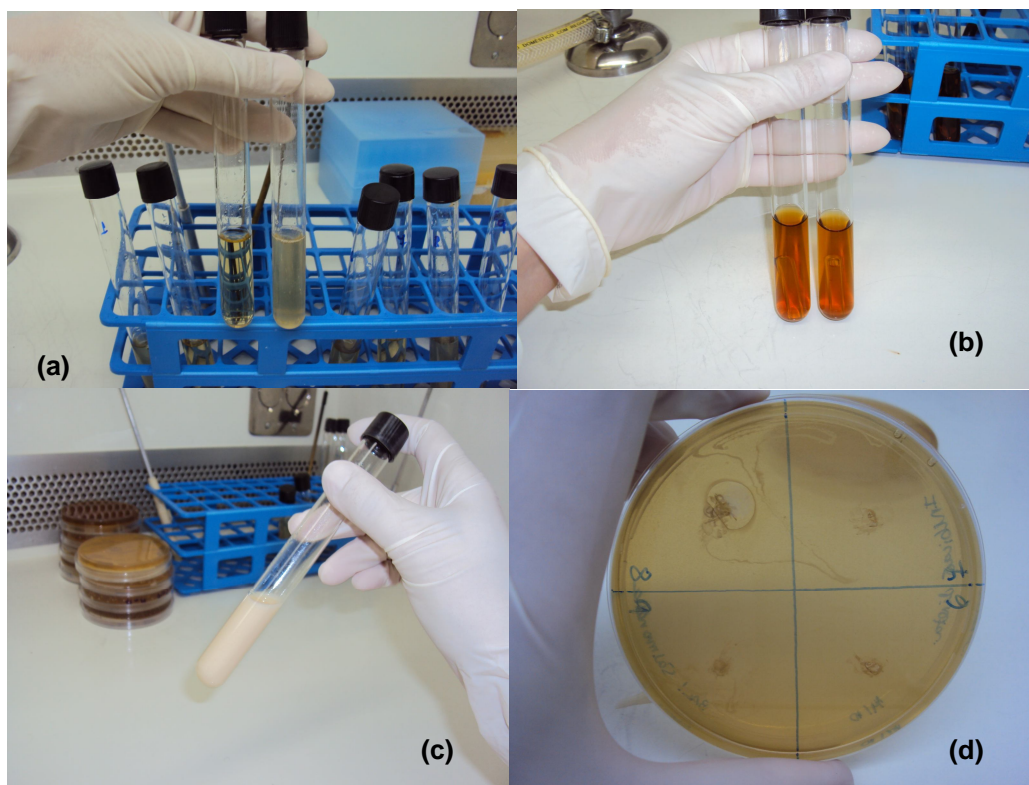


#### Anexo D - Isolamento, identificação e plaqueamento de BAL (Capítulos I, II e III).



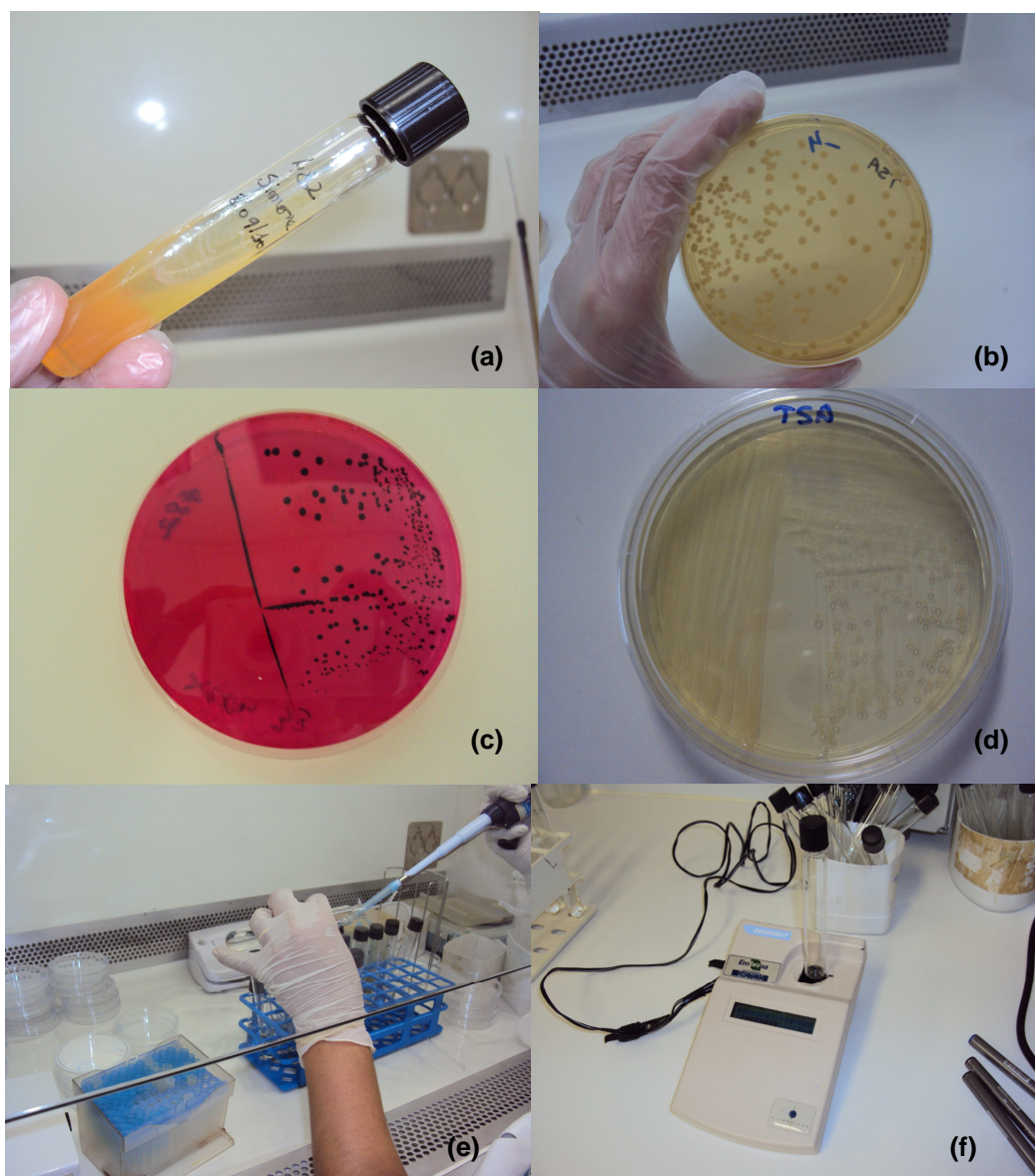
**Figura 4.** (a) Amostras de presunto de peru, (b) diluição decimal seriada do presunto de peru em câmara de fluxo laminar, (c) Placa de ágar MRS com colônias características de BAL (d) Prova de catalase: amostras positiva e negativa, (e) *Enterococcus* sp e (f) *Streptococcus* sp em coloração de Gram e observação por microscopia óptica. (Fonte: autora).

### Anexo E - Testes bioquímicos e inibição direta BAL - Capítulo III.



**Figura 5.** Provas bioquímicas: (a) crescimento de BAL em pH 4,4; 9,6 e concentração de NaCl 6,5% (Caldo APT), (b) produção de CO<sub>2</sub> (Caldo MRS), (c) crescimento em temperaturas de 10 e 45°C (leite desnatado reconstituído). (d) Halo de inibição frente à *Salmonella* Enteritidis pelo *Enterococcus* sp – laboratório de microbiologia. (Fonte: autora).

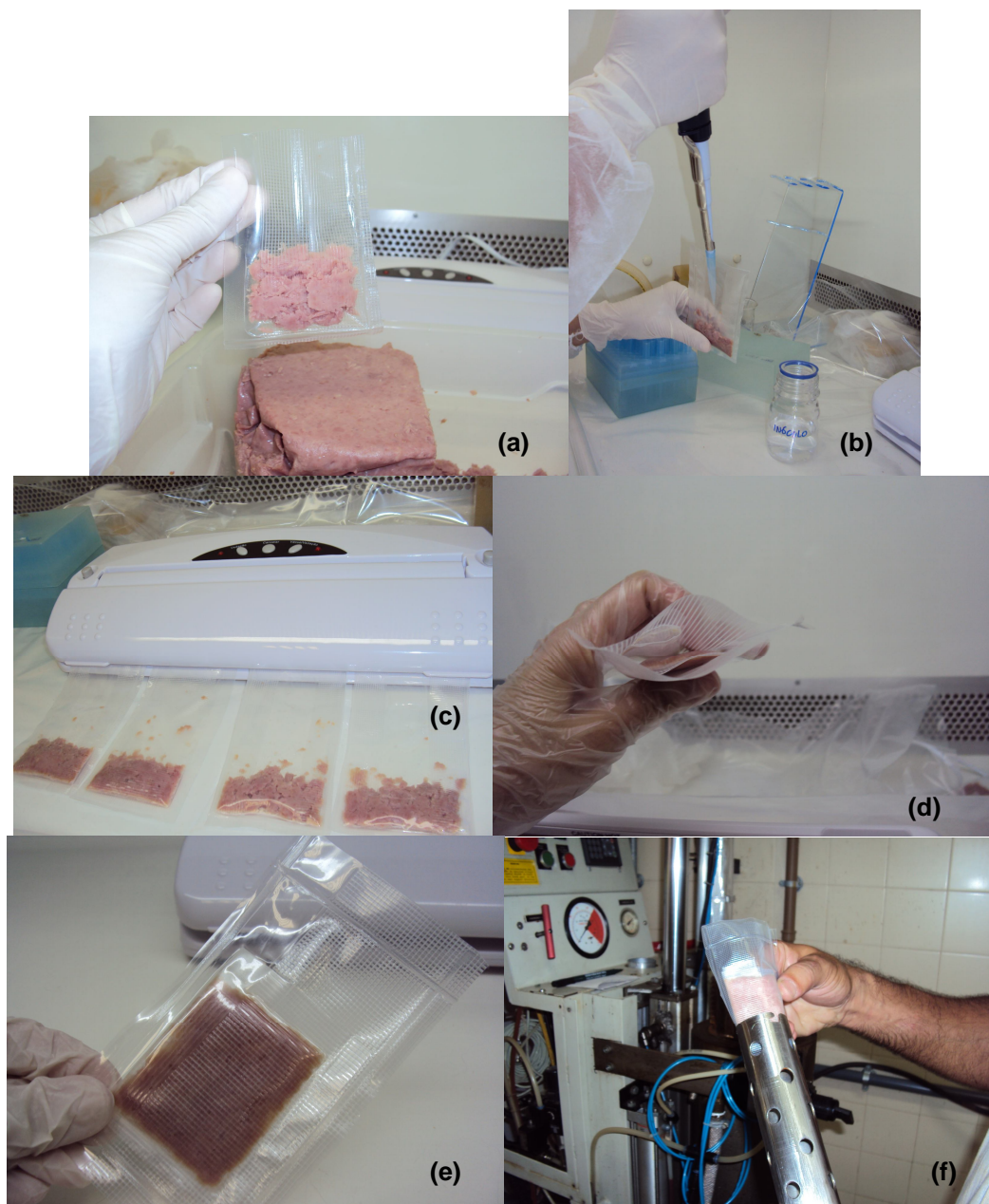
Anexo F - Preparo do inóculo de *Salmonella* Enteritidis - Capítulos IV e V.



**Figura 6.** *Salmonella* Enteritidis: (a) amostra em tubo de ágar TSA para repique, (b) crescimento em placa de TSA por espalhamento em superfície, (c) crescimento em placa XLD agar por espalhamento em superfície, (d) crescimento em placa TSA por estrias, (e) preparo do inóculo em solução salina a 0,85% e (f) leitura da concentração desejada em Densimat – laboratório de microbiologia. (Fonte: autora).



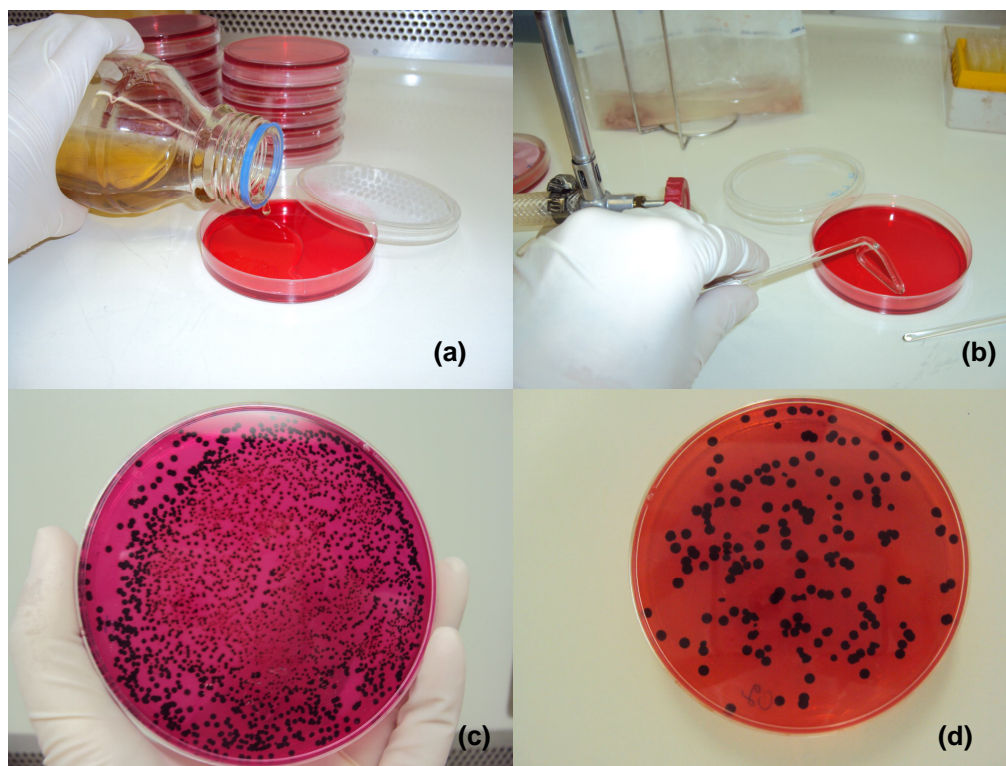
Anexo G - Inoculação de *Salmonella* Enteritidis - Capítulos IV e V.



**Figura 7.** (a) preparo da amostra: cominuição do presunto de peru e pesagem, (b) inoculação da concentração do inoculo, (c) selamento em mini seladora a vácuo (Vaccum sealer), (d) visualização da amostra já embalada em bag sealer, sendo colocada em saco duplo, (e) amostra final em saco duplo – laboratório de microbiologia e (f) pressurização: amostra em vaso pressurizador – planta piloto II. (Fonte: autora).

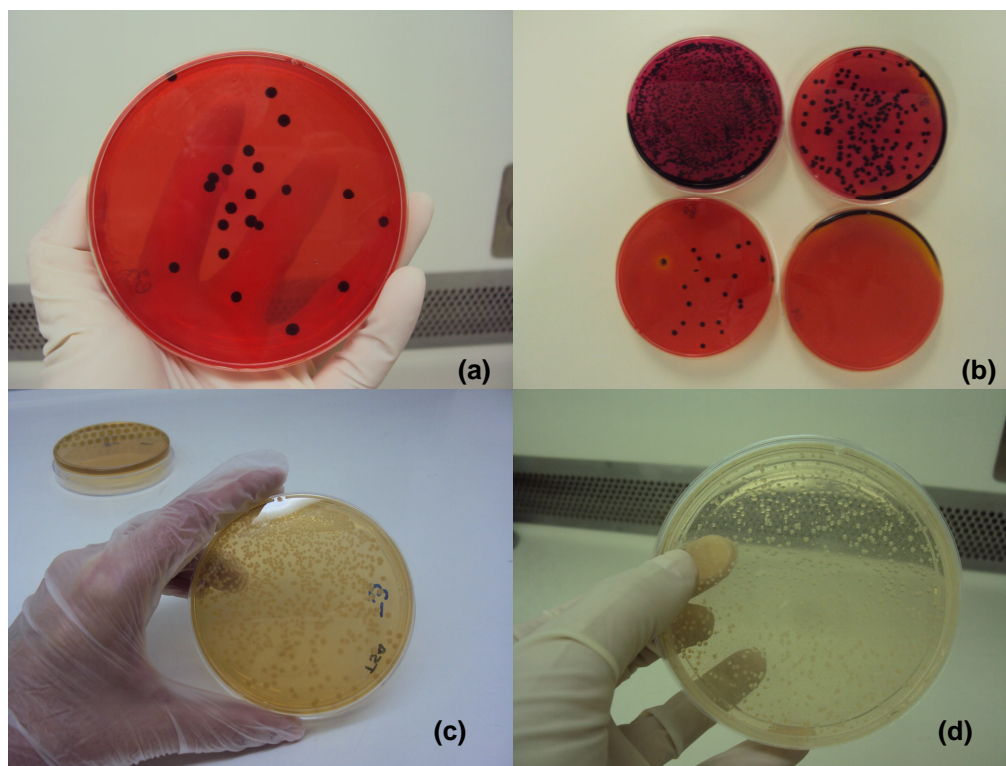


Anexo H - *Salmonella* Enteritidis – meios de cultura - Capítulo V.



**Figura 8.** (a) preparo do meio de cultura TAL: camada inferior com ágar XLD solidificado e na camada superior sendo vertido o meio ágar TSA (b) espalhamento em superfície do inóculo com alça de Drigalski, (c) e (d) crescimento de *Salmonella* Enteritidis em meioTAL (thin agar layer), concentrações decimais diferentes. (Fonte: autora).

Anexo I - *Salmonella* Enteritidis – meios de cultura - Capítulo V



**Figura 9.** Crescimento de *Salmonella* Enteritidis: (a) meio de cultura XLD por espalhamento em superfície, (b) diluições seriadas em meio TAL por espalhamento em superfície, (c) meio ágar TSA por espalhamento em superfície e espalhamento em superfície e (d) meio ágar TSA pour-plate. (Fonte: autora).

## Anexo J – Formulação do presunto de peru.

**Tabela 1.** Formulação do presunto de peru.

<b>Formulação</b>	<b>Quantidade</b>
Coxa de peru em pedaços	2,5 kg
Supergal 202/7®	78,025 g
Condimento Misto para Presunto Califórnia 616/1®	26,250 g
Realçador de Sabor 404®	10,625 g
Açúcar	10,675 g
Sal (NaCl)	37,500 g
Água gelada	300 mL

Fonte: MATHIAS (2008).

**Obs.: Composição Supergal 202/7:** estabilizante fosfato ( $P_2O_5$ ), sal, açúcar e antioxidante eritorbato de sódio.

**Anexo L – Composição dos meios de cultura usados para isolamento das bactérias ácido lácticas.**

**Tabela 2.** MRS Agar (De Man, Rogosa, Sharpe) - OXOID

<b>Typical Formula*</b>	<b>gm/litre</b>
Peptone	10.0
Lab-Lemco' powder	8.0
Yeast extract	4.0
Glucose	20.0
Sorbitan mono-oleate	1 ml
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0
Sodium acetate 3H <sub>2</sub> O	5.0
Triammonium citrate	2.0
Magnesium sulphate 7H <sub>2</sub> O	0.2
Manganese sulphate 4H <sub>2</sub> O	0.05
Agar	10.0
pH 6.2 ± 0.2 @ 25°C	

**Tabela 3.** M-17 Agar- FLUKA

<b>Composition*</b>	<b>gm/litre</b>
Casein peptone	2.5
Meat peptone	2.5
Soya peptone (papainic)	5.0
Yeast extract	2.5
Meat extract	5.0
Dissodium βglycerophosphate pentahydrate	19.0
Magnesium sulphate hydrate	0.25
Ascorbic acid	0.5
Agar	12.75
Final pH (at 37°C) 7.1 ± 0.2	

